



HAL
open science

Analyses d'images de tomographie X chez le petit animal : applications aux études de phénotypage ex vivo et in vivo

Arnaud Marchadier

► **To cite this version:**

Arnaud Marchadier. Analyses d'images de tomographie X chez le petit animal : applications aux études de phénotypage ex vivo et in vivo. Médecine humaine et pathologie. Université d'Orléans, 2011. Français. NNT : 2011ORLE2072 . tel-00779806

HAL Id: tel-00779806

<https://theses.hal.science/tel-00779806v1>

Submitted on 22 Jan 2013

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

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



**UNIVERSITÉ
D'ORLÉANS**



ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

LABORATOIRE PRISME équipe ISS

THÈSE présentée par :

Arnaud MARCHADIER

soutenue le : **13 décembre 2011**
pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : **Imagerie médicale**

Analyses d'images de tomographie X chez le petit animal
applications aux études de phénotypage *ex vivo* et *in vivo*

THÈSE dirigée par :

Christophe LEGER

Catherine VIDAL

Professeur des Universités, Université d'Orléans

Directrice de recherche, Institut Pasteur

RAPPORTEURS :

Emmanuel PERRIN

Jean-Raphaël NEFUSSI

Professeur des Universités, Université Lyon 1

Maître de conférence - Doctorat d'état, Université

Paris 7

JURY :

Michel GOLDBERG

Professeur émérite, Université Paris V - Président
du jury

Emmanuel PERRIN

Professeur des Universités, Université Lyon 1

Jean-Raphaël NEFUSSI

Maître de conférence - Doctorat d'état, Université
Paris 7

Catherine VIDAL

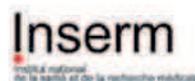
Directrice de recherche, Institut Pasteur

Christophe LEGER

Professeur des Universités, Université d'Orléans

Roger LEDEE

Maître de conférence, Université d'Orléans



Remerciements

Ce mémoire présente l'ensemble des travaux de recherche effectués au cours de ma thèse dans le cadre d'une convention CIFRE entre le laboratoire PRISME de l'Université d'Orléans et la société UsefulProgress.

Je souhaite remercier tout d'abord Sylvain Ordureau en tant que fondateur et gérant de la société UsefulProgress, pour m'avoir accueilli au sein de "l'équipe" mais surtout pour avoir rendu possible la réalisation de ce projet de thèse à l'interface entre des domaines aussi variés que la biologie, le traitement d'image et l'industrie. Je le remercie pour ces quatre années (déjà ...) passées à partager et échanger nos idées "nouvellement technologiques", mais surtout parce qu'elles m'ont permis d'enrichir mes connaissances dans des domaines aussi larges que notre ouverture d'esprit.

Je voudrais remercier Christine Rousselle, directrice du laboratoire PRISME, de m'avoir permis de préparer cette thèse au sein de son laboratoire.

Je tiens à remercier Christophe Léger, Professeur à l'Université d'Orléans, et Roger Lédée, Maître de Conférence à l'Université d'Orléans, en tant que directeur et encadrant de thèse, pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe Images Signaux et Systèmes du laboratoire PRISME tout en me laissant la liberté nécessaire à la réalisation des projets de recherche variés abordés dans cette thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Catherine Vidal, Directrice de recherche à l'Institut Pasteur et directrice de thèse, pour son infatigable optimisme, sa disponibilité et sa patience. Elle a considérablement contribué à bonifier mon travail, notamment lors de la rédaction des articles et du présent manuscrit.

Je remercie Jean-Raphaël Nefussi, Maître de conférence avec un Doctorat d'état de l'université Paris Diderot VII, et Emmanuel Perrin, Professeur de l'université Claude Bernard Lyon 1, qui malgré un emploi du temps serré ont accepté d'être les rapporteurs de ce mémoire, pour la pertinence de leurs remarques et leur participation au jury de thèse.

J'exprime toute ma gratitude à Michel Goldberg, Professeur émérite de l'université Paris V, qui m'a fait l'honneur d'accepter de prendre part à ce jury, de lire et d'expertiser mon travail en tant qu'examinateur et président de jury.

Ce travail résume une partie d'un parcours scientifique initié il y sept ans au laboratoire Inserm de Caractérisation du Tissu Osseux par Imagerie à Orléans. Les rencontres qui ont ponctuées ce parcours ont été pour moi autant d'occasions d'entretenir ma curiosité et d'enrichir mes connaissances, au cours de collaborations diverses, sur des domaines passionnants. Je tiens donc à remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler, puisqu'elles ont contribué à la réalisation de ce travail.

De mon passage à l'unité Inserm 658, je souhaite remercier particulièrement Christine Chappard, également Claude-Laurent Benhamou et Eric Lespessailles, ainsi que toutes les autres personnes du laboratoire et de l'IPROS.

Pour m'avoir fait mettre un pied (scientifique) dans le domaine dentaire, sans savoir si j'en sortirai un jour ..., je tiens à remercier Yohann Simon et Jean-Raphaël Nefussi, ainsi que les membres du laboratoire de Physiopathologie Orale et Moléculaire et en particulier Ariane Berdal.

Grâce à quelques incisives de rat, ma rencontre avec l'équipe Inserm "Cellules souches, Signalisation et Prions" a marqué le début d'une longue collaboration et a été décisive dans mon orientation ... Je tiens pour cela à remercier Odile Kellermann, Michel Goldberg, Sally Lacerda-Pinheiro, Anne Poliard, et plus particulièrement Yassine Harichane pour avoir partagé une des dernières lignes droites ..., et ainsi que tous les autres membres du laboratoire.

Merci aux particules de PE pour avoir créé une articulation entre biologiste, orthopédiste et imagerie 3D au sein du laboratoire de Bio ingénierie et Biomécanique Ostéo-Articulaire, mais surtout un grand merci à Christophe Nich, Morad Bensidhoum, Jean Langlois et Hervé Petite.

Sans oublier mes collègues ISSiens du "deuxième" et ceux du "troisième" avec qui j'ai partagé de nombreux moments de discussion et de pause-café, je remercie : Hazem, Vincent, Anthony, Ahmad, Sylvie, Raphaël, Rachid, Rachid, Gerald, Guy, Rémy, Meriem, Smail, Sonia, Philippe, Rodolphe, Rym, Dalal, Wael, Kamal, Abdenour, Lotfi, Lahouaoui, et Raphaël D. qui a dû me supporter à double titre.

Je remercie également quelques amis et collègues de PRISME MMH : Romain, Aurélie et Damien.

Je tiens également à remercier l'équipe Viscom qui a permis la réalisation d'un grand nombre des expérimentations et pour leur accueil : Christian, Fabrice, Sébastien, Benoît et Ghislaine.

J'adresse une pensée particulière à mes amis "irradiés" et tous ceux qui gravitent autour : Olivier, Aurélien, Thierry, Pierre, William, Paul, Patrice, Philippe, Michel, Jacques, René, et particulièrement Guillaume, Tayeb, Florence pour la fin de la rédaction, ainsi que tous les autres membres du laboratoire

Je témoigne ma profonde reconnaissance à ma famille et mes proches, pour avoir contribué chacun à votre manière à la réalisation de ce travail, pour votre soutien et votre confiance. Et un grand merci à Blandine qui m'a supporté et m'a aidé dans les moments difficiles depuis maintenant dix ans.

Une pensée aux personnes parties et celles à venir

Table des Matières

Table des Matières	i
Liste des Figures	vii
Liste des Tableaux	xv
Introduction générale	1
1 Imagerie de l'animal de laboratoire	5
1.1 Modèles animaux et imagerie en recherche biomédicale	6
1.2 Les modalités d'imagerie	6
1.2.1 Imagerie par rayons X	7
1.2.1.1 Radiographie	7
1.2.1.2 DXA	7
1.2.1.3 Tomographie	8
1.2.2 Imagerie ultrasonore	8
1.2.2.1 Imagerie anatomique	8
1.2.2.2 Imagerie Doppler	10
1.2.2.3 Elastographie ultrasonore	10
1.2.2.4 Agents de contraste et imagerie moléculaire ultrasonore	10
1.2.2.5 Bilan des techniques ultrasonores	11
1.2.3 Imagerie par résonance magnétique	11
1.2.3.1 Principe de la Résonance Magnétique Nucléaire . . .	11
1.2.3.2 IRM anatomique	11
1.2.3.3 IRM fonctionnelle	12
1.2.3.4 IRM moléculaire	12
1.2.3.5 Bilan des techniques d'IRM	12
1.2.4 Imagerie nucléaire	13
1.2.4.1 Imagerie PET	13
1.2.4.2 Imagerie SPECT	13
1.2.4.3 Bilan des techniques nucléaires	14
1.2.5 Imagerie optique	14
1.2.5.1 Fluorescence	14
1.2.5.2 Bioluminescence	15

1.2.5.3	OCT	16
1.2.5.4	Imagerie de tomographie optique de projection	16
1.2.6	Imagerie photoacoustique	17
1.3	Synthèse sur les techniques d'imagerie chez le petit animal	19
1.4	Conclusion	21
2	Tomographie à rayons X	23
2.1	Introduction	24
2.2	Les différentes configurations de tomographes	25
2.2.1	Généralités	25
2.2.2	Différentes configurations d'acquisition	26
2.2.3	Différentes géométries de faisceau	27
2.3	Le rayonnement électromagnétique	28
2.3.1	Production des rayons X	29
2.3.2	La source de rayons X	30
2.3.3	Interaction des rayons X avec la matière	32
2.3.3.1	La diffusion de Thomson-Rayleigh	33
2.3.3.2	L'effet photo-électrique	33
2.3.3.3	La diffusion Compton	33
2.3.3.4	La création de paires électron/positon	34
2.3.3.5	Prédominance des interactions	34
2.3.4	Filtrage du faisceau	34
2.4	Détection des rayons X et formation de l'image radiologique	35
2.4.1	Le détecteur	35
2.4.2	Atténuation et formation de l'image radiographique	35
2.5	Reconstruction tomographique	36
2.5.1	Modélisation du problème de reconstruction tomographique	37
2.5.2	Méthodes de reconstruction analytique	38
2.5.3	Méthodes de reconstruction itératives	39
2.6	Caractéristiques des données	41
2.6.1	Données volumiques	41
2.6.2	Unités Hounsfield	41
2.7	Paramètres caractéristiques d'un tomographe	42
2.7.1	Résolution spatiale	42
2.7.2	Bruit	43
2.7.3	Contraste	44
2.7.4	Résolution temporelle	45
2.7.5	Vitesse d'acquisition	45
2.7.6	Stabilité temporelle	45
2.7.7	Les artefacts	46
2.7.7.1	Le durcissement de faisceau ("Beam Hardening")	46
2.7.7.2	Artefacts en anneaux ("Ring Artefact")	46
2.7.7.3	Artefacts métalliques	48
2.7.7.4	Artefacts de mouvement	48
2.7.7.5	L'effet de volume partiel	49
2.7.7.6	Artefacts "Cone Beam"	50

2.8	Conclusion, quels tissus cibles de l'analyse	51
3	Présentation des matériels d'imagerie utilisés	53
3.1	Introduction	53
3.2	Présentation des matériels d'imagerie utilisés	54
3.2.1	CT Toshiba Aquilon 64	54
3.2.2	CT Siemens Somatom Flash 2	54
3.2.3	Skyscan 1178	56
3.2.4	Viscom 8060 NDT	56
3.2.5	Skyscan 1172	57
3.2.6	Synchrotron ESRF	58
4	Etude des tissus minéralisés de la sphère cranio-faciale : imagerie et développement d'outils d'analyse	61
4.1	Introduction	62
4.2	Protocole expérimental et acquisition des données	62
4.3	Vérification et calibration des niveaux de gris	63
4.3.1	Rappel : Relation entre niveau de gris et degré de minéralisation des tissus	63
4.3.2	Artefacts de "beam hardening"	64
4.3.3	Méthode de correction des niveaux de gris	64
4.4	Analyse qualitative de la mandibule	65
4.4.1	Visualisation de données volumiques	65
4.4.1.1	Visualisation en 2D et visualisation surfacique	65
4.4.1.2	Le "Volume Rendering"	67
4.4.1.3	Principe du "ray casting"	69
4.4.1.4	Exemples de rendus 3D	71
4.4.2	Définitions des fonctions de transferts spécifiques à la mandibule de souris	72
4.4.3	Coupes virtuelles à travers la mandibule	72
4.5	Analyse quantitative de la structure des dents	74
4.5.1	Article : "3D visualization and quantification of bone and teeth mineralization for the study of osteo/dentinogenesis in mice models"	77
4.6	Conclusion	84
5	Etude phénotypique de mandibules de souris invalidées pour le gène de la fibromoduline (Fmod-KO)	87
5.1	Introduction	88
5.2	Article : " <i>Differential Effects of Fibromodulin Deficiency on Mouse Mandibular Bones and Teeth : A Micro-CT Time Course Study</i> "	88
5.3	Discussion	96
5.4	Conclusion	98

6	Etude de l'ostéolyse induite par des particules de polyéthylène	99
6.1	Introduction	100
6.2	Etude A : ostéolyse induite par les particules de PE et interaction avec l'ovariectomie	101
6.2.1	Analyse des données 3D de la calvaria	101
6.2.1.1	Définition de la région d'intérêt	101
6.2.1.2	Paramètres quantitatifs de l'ostéolyse	103
6.2.2	Article : " <i>Decrease in Particle-Induced Osteolysis in Ovariectomized Mice</i> "	103
6.2.3	Résultats complémentaires à ceux de l'article	110
6.3	Etude B : effets de la supplémentation en oestrogènes sur l'ostéolyse induite par les particules de PE	112
6.3.1	Article : " <i>Oestrogen deficiency modulates particle-induced osteolysis</i> "	113
6.4	Conclusion	126
7	Analyse des tissus adipeux	127
7.1	Introduction	128
7.2	Imagerie des tissus adipeux chez l'humain	128
7.3	Imagerie des tissus adipeux chez le petit animal	129
7.4	Analyses des images du tissu adipeux	129
7.5	Article : "Quantitative CT imaging for adipose tissue analysis in mouse model of obesity"	130
7.6	Discussion	139
7.6.1	Imagerie avec le scanner médical CT	139
7.6.2	Classification des voxels du tissu adipeux	139
7.6.3	Validation des outils basée sur les corrélations avec le poids de l'animal	140
7.7	Conclusion	141
8	Analyse phénotypique des souris invalidées pour le gène du récepteur 2B de la sérotonine	143
8.1	Introduction	144
8.2	Etude A : analyse du phénotype des souris R2B-KO à l'échelle du corps entier	145
8.2.1	Protocole expérimental	145
8.2.2	Etude des tissus minéralisés	145
8.2.3	Etude des tissus adipeux	145
8.2.4	Etude des voies respiratoires	148
8.2.5	Conclusion	150
8.3	Etude B : analyse du phénotype du tissu dentaire chez les souris R2B-KO	150
8.3.1	Article : "Enamel alterations in serotonin 2B receptor knockout mice"	151
8.3.2	Conclusion	174

9	Analyse comparative à différentes échelles de différents systèmes de tomographie X	175
9.1	Introduction	176
9.2	Démarche méthodologique	177
9.3	Protocole expérimental	178
9.3.1	Description du fantôme de test	179
9.3.2	Détails des acquisitions	180
9.3.2.1	Siemens Flash CT 2	180
9.3.2.2	Toshiba CT Aquilon 64	181
9.3.2.3	Skyscan 1178	182
9.3.2.4	Viscom 8060 NDT	182
9.3.2.5	Skyscan 1172	183
9.3.2.6	Synchrotron ESRF	184
9.4	Etude comparative des différentes technologies d'imagerie	185
9.4.1	Etude avec le fantôme de test	185
9.4.1.1	Analyse du bruit relatif	185
9.4.1.2	Analyse du contraste	185
9.4.2	Imagerie <i>ex vivo</i> sur la mandibule	186
9.5	Test des outils d'analyse d'image	188
9.5.1	Comparaison entre les techniques d'imagerie en corps entier	188
9.6	Variation dans le temps des effets de l'ovariectomie	189
9.7	Discussion	189
9.8	Conclusion	189
10	Irradiation induite lors d'un acte d'imagerie en tomographie X	195
10.1	Introduction	196
10.2	Radiobiologie : effets biologiques des rayonnements	196
10.3	Méthodes d'évaluation de la dose	198
10.3.1	Evaluation de la dose par simulation	198
10.3.2	Méthodes de mesure de la dose	199
10.4	Imagerie du petit animal et dosimétrie	202
10.5	Dosimétrie expérimentale avec chambre d'ionisation lors d'un examen de micro-CT	202
10.5.1	Protocole expérimental	203
10.5.1.1	La chambre d'ionisation	203
10.5.1.2	Irradiations avec le micro-CT VISCOM 8060	203
10.5.2	Résultats des mesures de dose	204
10.6	Autre méthode : dosimétrie par RPE	204
10.6.1	Principe de la RPE	205
10.6.2	Dosimétrie RPE dans les tissus biologiques	208
10.7	Etude expérimental : évaluation par RPE de l'irradiation induite en tomographie X	209
10.7.1	Protocole expérimental	209
10.7.2	Test 1 : évaluation de la réponse du signal RPE induit par une irradiation	211
10.7.3	Test 2 : évolution du signal avec la dose sur la mandibule	212

10.7.4 Test 3 : évolution du signal avec la dose sur le fémur	212
10.7.5 Test 4 : imagerie de la dose	213
10.7.6 Conclusion sur la dosimétrie par RPE	215
10.8 Conclusion	215
Conclusion générale	217
Bibliographie	220
Bibliographie de l'auteur	237

Table des figures

1.1	Comparaison de la taille d'un cerveau humain et d'un cerveau de rat (en haut) et des échelles d'investigation correspondantes (en bas) [Del Guerra et al., 2008]	7
1.2	Visualisations 3D (à gauche) et coupes virtuelles obtenues par OPT avec un embryon de souris transgénique (E10.6 Pax-6) (illustration modifiée à partir de www.bioptronics.com)	17
1.3	Illustration de l'appareil Nexus128 de tomographie photoacoustique (à gauche) et image de l'abdomen d'une souris (à droite) (Illustration modifiée à partir de " www.endrainc.com ")	18
1.4	Différentes cibles d'investigation pour les modalités d'imagerie du petit animal	19
1.5	Illustration des possibilités d'investigations multi-échelles en tomographie à rayons X proposée par la division d'imagerie biomédicale du "Bioimaging Systems Lab" de l'université "Wake Forest" (source http://www.imaging.sbes.vt.edu/research/sam-ct/)	22
1.6	Illustration de l'augmentation du nombre de publications mettant en oeuvre la tomographie X pour le petit animal en fonction de l'année. Le graphique a été généré à partir de la base de données PUBMED avec l'outil "MEDLINE summary tool" proposé par MJ Galsworthy et disponible à l'adresse www.medsum.info , avec les termes clés : « μ CT OR micro-CT OR mini-CT OR "High Resolution" OR CT AND (animal OR mice OR rat) »	22
2.1	Schéma type d'un tomographe	24
2.2	Les quatre différentes générations de tomographe [Kalender, 2006]	25
2.3	Schéma d'un "Electron Beam CT"	26
2.4	Illustration des deux principales configurations d'acquisition des tomographes	27
2.5	Illustration géométrique de la modification de la distance entre la source et le détecteur. Contrairement au cas A, dans le cas B la totalité du faisceau est utilisée pour la création de l'image	28
2.6	Les trois types de géométries d'acquisitions : parallèle, "fan beam" et "cone beam"	28

TABLE DES FIGURES

2.7	Illustration de la première image radiographique obtenue avec la main de Mme Rontgen	29
2.8	Ondes électromagnétiques.	29
2.9	Illustration du spectre du faisceau d'une source X qui serait constitué uniquement des émissions de raies	30
2.10	Production du rayonnement X de freinage	31
2.11	Spectre continu de freinage	31
2.12	Spectre d'émission des rayons X : somme du spectre de raies et du spectre du rayonnement continu de freinage	31
2.13	Exemples de tubes à rayons X par transmission (A) et par réflexion (C). Illustration du fonctionnement du tube à transmission (B) et à réflexion (D) (Illustration modifiée à partir de [Schambach et al., 2010])	32
2.14	Exemples de spectres obtenus avec une cible en molybden et en tungsten	32
2.15	Intéractions des photons avec la matière	33
2.16	Prédominances des effets d'interaction des photons X avec l'eau, l'hydroxyapatite (Os) et le plomb. Tables modifiées à partir des données disponible sur le site " physics.nist.gov/PhysRefData/Xcom/html/xcom1.html "	34
2.17	Effet du filtrage sur le spectre d'un faisceau polychromatique : spectre avant filtrage à gauche, après filtrage à droite le spectre est globalement atténué et les basses énergies ont été supprimées	35
2.18	Exemple d'atténuation en nombre des rayons X dans un matériau homogène et formation d'une image	36
2.19	Illustration de la projection de Radon dans le cas 2D	37
2.20	Illustration du théorème coupe-projection suivant une incidence θ : la transformée de Fourier de de la transformée de Radon de la fonction f dans la direction θ (à gauche) est égale à la coupe 1D dans la direction θ de la transformée de Fourier 2D de la fonction f (à droite)	38
2.21	Géométrie divergente	39
2.22	Illustration de la géométrie en reconstruction Cone Beam	40
2.23	Projections P_i de la fonction f dans le cas 2D	40
2.24	Système d'équations à inverser pour la résolution du problème de reconstruction tomographique	40
2.25	Illustration de la structure des données obtenues en tomographie . . .	41
2.26	Répartition des tissus du corps humains selon l'échelle de Hounsfield [Kalender, 2006]	42
2.27	Exemple de courbe Housfield "type" d'un humain montrant la répartition des tissus du corps et les valeurs de niveaux de gris correspondantes sur une coupe tomographique	43
2.28	Illustration de la modification du spectre du faisceau de rayons X à travers de l'eau. L'énergie moyenne du faisceau diminue avec la profondeur.	46
2.29	Effet de l'artefact de "Beam Hardening" illustré par des profils de niveau de gris obtenus le long du diamètre d'un fantôme d'eau uniforme (Illustration modifiée à partir de [Barrett and Keat, 2004])	47
2.30	Coupe 2D obtenue en micro-tomographie synchrotron présentant des "ring artefacts"	47

TABLE DES FIGURES

2.31	Image du faisceau obtenu après le monochromateur sur la ligne de micro tomographie ID19 de l'ESRF. Les lignes horizontales sont dues à la structure multicouche du monochromateur et les taches noires sont dues à ses défauts	48
2.32	Artefacts en stries dus à des éléments métalliques dans les dents d'un patient [De Man et al., 2000] (à gauche). Artefacts en stries visibles autour des os d'une souris avec une acquisition en micro-CT [Paulus et al., 2000] (à droite)	49
2.33	Artefacts dus aux mouvements de l'animal lors de sa respiration [Paulus et al., 2000]	49
2.34	Illustration de l'effet de volume partiel avec une région imagée avec deux résolutions. Pour la ligne du haut, la résolution permet de résoudre les différents éléments mais pour la ligne inférieure, la région, imagée par un seul voxel, est représentée par une valeur de niveau de gris apparente	50
2.35	Illustration des distortions causées par l'artefact "cone beam". On constate que la même sphère est déformée si elle est placée pendant l'acquisition dans des zones éloignées du plan médian. La ligne supérieure montre des projections et la ligne inférieure la reconstruction 3D de la sphère de test (Illustration modifiée à partir de [Boyd et al., 2006])	51
3.1	Scanner médical Toshiba Aquilon disposant de 64 détecteurs	54
3.2	Scanner médical double tube Siemens Flash CT 2 équipé de 256 détecteurs	55
3.3	Schéma du scanner double tube Siemens Flach CT 2	55
3.4	Illustration de la différence entre l'acquisition à deux sources et à une seule source	55
3.5	Micro-CT Skyscan 1178 dédié à l'imagerie in vivo	56
3.6	Micro-CT industriel Viscom 8060 NDT	57
3.7	Micro-CT Skyscan 1172 dédié à l'imagerie ex vivo	57
3.8	Site du synchrotron de Grenoble (A) et schéma des "Beam Lines"	59
3.9	Photographies des deux bancs de déplacement mécaniques de l'objet (photos réalisées lors de nos expérimentations). Banc utilisé pour les acquisitions inférieures au μm (à gauche) et pour les résolutions supérieures (à droite)	59
4.1	Représentation de la mandibule au sein de la sphère cranio-faciale de la souris	62
4.2	Schéma du protocole d'analyse des tissus minéralisés de la mandibule de souris	63
4.3	Exemple de coupes extraites d'un volume 3D de mandibule de souris réalisé avec le micro-CT Viscom 8060	63
4.4	Illustration des régions utilisées pour la mesure de valeurs de référence	65
4.5	Visualisation 2D suivant plusieurs orientations	66

TABLE DES FIGURES

4.6	Exemple de visualisation surfacique des données 3D de mandibule de souris. On distingue sur la partie droite les primitives (triangles) calculées à l'interface de l'os avec l'air nécessaires à la représentation surfacique.	66
4.7	Exemples de fonctions de transfert 1D	67
4.8	Principe des fonctions de transfert 2D avec prise en compte du gradient	68
4.9	Histogramme 2D avec gradient de l'image (à gauche) et exemple de définition de fonctions de transfert 2D à l'aide de "widgets" (à droite) (Illustration modifiée à partir de [Kniss et al., 2002])	68
4.10	Illustration du "ray casting" à travers le volume de données pour le calcul d'un pixel de l'image finale en tenant compte des paramètres de la scène 3D	69
4.11	Les différentes étapes du "ray casting"	70
4.12	Profil en valeurs de niveaux de gris d'un rayon lancé dans un volume de données (à gauche) et illustration de rendus obtenus avec quatre types d'accumulation classiques (à droite)	70
4.13	Exemple de fonction de transfert pour les composantes HSVA (du haut vers le bas) et le rendu correspondant à partir des données 3D d'une souris	71
4.14	Différents rendus 3D obtenus à partir d'une même mandibule avec plusieurs fonctions de transfert. Pour chaque rendu, les composantes des fonctions de transfert sont données verticalement de haut en bas en HSVA	72
4.15	Zoom sur une partie des histogrammes moyens de souris KO et WT .	73
4.16	Fonctions de transfert mises en évidence pour l'analyse de la mandibule (à gauche) et rendu 3D correspondant (à droite)	73
4.17	Plan de la coupe virtuelle entre les deux premières molaires	73
4.18	Exemples de coupes virtuelles obtenues entre les deux premières molaires de la mandibule	74
4.19	Coupe virtuelle de la mandibule au niveau des molaires et à travers l'incisive (illustration obtenue à partir de tomographie synchrotron distinctes des données micro-CT discutées dans ce chapitre)	74
4.20	Principe de l'interpolation des ROI entre deux contours initiaux. Sur les deux exemples, les deux contours extérieurs représentent les contours définis par l'utilisateur et les deux contours intérieurs correspondent aux contours interpolés automatiquement sur des coupes intermédiaires	75
4.21	Exemple de définition de ROI pour l'extraction du volume pulpaire (en haut) et zone pulpaire mise en évidence en blanc après binarisation (en bas)	75
4.22	Principe des méthodes de segmentation par croissance de région ("region growing"). Illustration de la méthode "connected threshold" basée sur des seuils fixes	76
4.23	Illustration de la méthode "confidence connected"	76
4.24	Illustration de l'extraction du volume pulpaire (en bleu) de la deuxième molaire par la méthode de "region growing"	77

TABLE DES FIGURES

4.25	Visualisation en "volume rendering" montrant différentes régions au sein de la mandibule	85
4.26	Comparaison entre les images de coupes de mandibules obtenues en microscopie électronique à balayage et en micro-CT	85
5.1	Appréciation qualitative en "volume rendering" de la répartition de la minéralisation sur des mandibules de souris sauvages (a et c) et KO pour la fibromoduline (b et d) âgées de 3 (a et b) et 10 semaines (c et d)	96
5.2	Coupe virtuelles associées au "volume rendering" entre les deux premières molaires de la mandibule de souris WT (a et c) et KO (b et d) âgées de 3 (a et b) et 10 semaines (c et d)	97
5.3	Comparaison entre des images obtenues après section transversale de la mandibule de souris Fmod-KO (KOFM) et de souris sauvage (WT) par au microscope électronique à balayage (à gauche) et d'images non destructives obtenues par micro-CT (à droite)	97
5.4	Reconstruction 3D des molaires (en transparence) et de la pulpe des molaires	97
5.5	Résultats des mesures de volumes pulpaire de la première molaire montrant une différence significative entre WT et KO	98
5.6	Superposition des volumes pulpaire des souris WT et KO de 10 semaines	98
6.1	Radiographie d'un patient avec une prothèse de hanche et photo d'une prothèse (à droite)	100
6.2	Illustration de la région de la calvaria analysée en micro-CT	101
6.3	Visualisation des calvarias en 3D avec deux rendus différents de "volume rendering" permettant d'apprécier les zones d'ostéolyse	102
6.4	Illustration de la ROI sphérique	102
6.5	Illustration de la complexité d'une forme avec le paramètre BS/BV. En 2D BS correspond au périmètre de la forme et BV à sa surface	103
6.6	Illustration 3D en MIP de la réponse osseuse à l'ovariectomie de la calvaria	110
6.7	Illustrations de la réponse osseuse à l'ovariectomie avec les résultats d'analyse quantitatifs	110
6.8	Illustration 3D en MIP de la réponse osseuse à l'implantation de particules de PE sur la calvaria	111
6.9	Analyse quantitative de la réponse osseuse à l'implantation de particules de PE	111
6.10	Illustration 3D en "volume rendering" de l'effet des particules de PE et de l'ovariectomie	112
6.11	Histogramme des valeurs de niveaux de gris du volume 3D	113
7.1	Vues 3D en "volume rendering" obtenues à partir des données d'une seule souris scannée en 1 sec dans un scanner médical (CT)	139

TABLE DES FIGURES

7.2	Représentation 3D des histogrammes 2D de chaque coupe le long du corps de la souris (a), de sa modélisation avec les mixtures de Gaussiennes (b) et des trois Gaussiennes du modèle (c pour la graisse, d pour le muscle et e)	140
8.1	Différences de minéralisation entre les souris femelles contrôles et R2B-KO âgées de 1an	146
8.2	Visualisation 3D en "volume rendering" de l'ensemble des souris âgées de 2 mois	146
8.3	Visualisation 3D en "volume rendering" de l'ensemble des souris âgées de 1 an	147
8.4	Exemples de coupes extraites à l'intersection des vertèbres L5 et S1 pour les 4 groupes de souris. Les tissus adipeux sont représentés en jaunes et la masse maigre en rouge	147
8.5	Résultats des mesures du rapport entre graisse viscérale et graisse sous-cutanée et du volume total pour les souris R2B-KO et WT âgées de 2 mois	148
8.6	Résultats des mesures du rapport entre graisse viscérale et graisse sous-cutanée et du volume total pour les souris KO et WT âgées de 1 an	148
8.7	Visualisation 3D en "volume rendering" des poumons des souris contrôles (WT) et R2B-KO (KO)	149
8.8	Volume pulmonaire (en mm^3) des souris femelles de 2 mois. Les barres indique un seuil de significativité de $p < 0.05$	149
8.9	Illustration de la zone des molaires (B) imagée par micro-CT au sein de la mandibule (A)	151
8.10	Illustrations des vues obtenues en volume rendering" à partir des données micro-CT	151
8.11	Vue 3D en "volume rendering" de l'émaille de molaires de la mandibule	174
9.1	Classification multi-échelle des tissus du corps d'un individu (illustration modifiée à partir de [Mattsson and Thomas, 2006])	176
9.2	Description des étapes de réception et d'élevage des différents groupes de souris	179
9.3	Représentation des étapes du protocole d'imagerie	180
9.4	Exemple de vue de profil d'une acquisition réalisée avec 14 souris et l'objet de test sur le scanner Flash CT 2	181
9.5	Zoom sur la vue de profil d'une l'acquisition permettant de distinguer la souris à l'intérieur du tube et l'objet de test derrière ce tube	181
9.6	Exemple de vue de profil d'une acquisition réalisée avec 7 souris et l'objet de test sur le scanner Toshiba Aquilon 64	182
9.7	Exemple de vue de profil d'une acquisition réalisée sur le micro-CT Skyscan 1178	182
9.8	Exemple de vue de profil d'une acquisition réalisée sur le micro-CT Viscom 8060	183
9.9	Comparaison entre micro-CT et tomographie synchrotron avec une image 3D de mandibule	187

TABLE DES FIGURES

9.10	coupe 3D de la mandibule avec visualisation des tissus mous et minéralisés permettant de visualiser la zone de formation de l'incisive . . .	188
9.11	Vues 3D de la mandibule en coupe dans l'axe des racines (A) et au niveau du ciment (B)	189
9.12	Vue 3D en coupe du bloc molaire de la mandibule permettant de distinguer clairement l'émail, la dentine, la canal pulpaire, le ciment et l'os alvéolaire	190
9.13	Vues 3D de la mandibule avec des coupes successives depuis les pointes des cuspides jusqu'à la base des racines	191
9.14	Vues 3D des deux premières molaires de la mandibule avec des rendus différents permettant de distinguer l'anatomie de la molaire	192
9.15	Vues 3D des deux premières molaires avec des coupes successives depuis les pointes des cuspides jusqu'à la base des racines	192
9.16	Illustration de la comparaison de 4 tomographes avec la visualisation d'une coupe 2D extraite entre les vertèbres L5 et S1 de la souris $n^{\circ}7$ du groupe J60-WT	193
9.17	Poids initial des souris	193
9.18	Poids final des souris	194
9.19	prise de poids des souris	194
10.1	Modèle prédictif de pathologies liées à une irradiation	198
10.2	Schéma d'une chambre d'ionisation	200
10.3	Principe de fonctionnement du dosimètre de type OSL	201
10.4	Illustration de la problématique visant à remplacer les méthodes optiques par le micro-CT dans les études de tératologies. Images obtenues en microscopie avec préparation à l'alizarine (à gauche) et images 3D obtenues après numérisation sur le micro-CT Viscom 8060 (à droite) sur des foetus de rat	203
10.5	Chambre à ionisation de type crayon pour la mesure d'un débit de dose	203
10.6	Résultats des mesures de dose avec variation de la tension entre 30 et 60 kV	205
10.7	Organisation des niveaux d'énergie pour un spin électronique $s = \frac{1}{2}$ en présence d'un champ magnétique	206
10.8	Signal de l'absorbance et sa dérivée qui constitue le spectre RPE . . .	207
10.9	Caractéristiques d'un spectre RPE	207
10.10	Propriétés dosimétriques des matériaux lus par RPE [Herve, 2006] . .	209
10.11	Bruker Eleksys E540 avec un spectromètre en bande X	210
10.12	Exemple de spectre RPE de l'émail d'une dent ayant subi une irradiation [Romanyukha et al., 1999]	211
10.13	Spectre RPE obtenu sur une mandibule de souris ayant subi l'irradiation d'un acte d'imagerie en micro-CT	212
10.14	Superposition des spectres RPE de deux mandibules ayant reçues des irradiations différentes	213
10.15	Superposition des spectres RPE de deux fémurs ayant reçues une irradiation simple (1x) et une irradiation quatre fois plus longue (4X)	214

TABLE DES FIGURES

10.16 Image RPEi 2D de la distribution spatiale du signal induit par l'irradiation (à gauche) et superposition avec une image de mandibule obtenue en micro-CT (à droite) 214

Liste des tableaux

1.1	Liste des micro-CT <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i> disponibles sur le marché	9
1.2	Caractéristiques des différentes techniques disponibles pour l'imagerie non-invasive du petit animal	20
1.3	Critères d'évaluation pour la comparaison des modalités d'imagerie du petit animal	21
7.1	Comparaison des méthodes d'imagerie utilisées pour l'étude de la graisse chez l'humain et la souris	130
8.1	Description des groupes de souris	145
8.2	Valeurs moyennes des mesures de graisse sous-cutanée et viscérale pour chaque groupe de souris	147
9.1	Description des groupes de souris	179
9.2	Illustrations du fantôme de calibration utilisés pour les expérimentations	180
9.3	Description des paramètres d'acquisition sur le scanner Siemens Flash CT 2	181
9.4	Illustration de coupes 2D extraites à partir de 3 acquisitions obtenues sur le fantôme de calibration : l'acquisition (a) a été réalisé avec une tension de $50kV$ et un courant de $2000\mu A$, et les acquisition (b) et (c) avec une tension de $80kV$ et un courant de $1250\mu A$. Un filtre de molybden (Mo) a été utilisé pour l'acquisition (c)	183
9.5	Valeurs de Bruit relatif mesurées à l'aide du fantôme de calibration .	185
9.6	Valeurs de CNR mesurées à l'aide du fantôme de calibration	186
10.1	Coefficients de pondération préconisés par la CIPR en 2007 pour les différents organes du corps humain	198
10.2	Paramètres des acquisitions réalisées avec le micro-CT VISCOM 8060	204
10.3	fréquences de la micro-onde utilisées en RPE pour forcer une transition	206

Introduction générale

L'expérimentation animale est incontournable pour le développement des recherches dans les secteurs de la biologie, de la médecine et de l'industrie pharmaceutique. Les études biomédicales font appel à des modèles animaux qui visent à mimer au plus près les processus physiologiques et pathologiques rencontrés chez l'humain. Les rongeurs sont des animaux de choix à double titre : d'une part par les facilités d'élevage et de stabulation en animalerie, d'autre part en raison de l'avènement des techniques de manipulations génétiques chez la souris.

Les méthodes usuelles d'exploration des animaux vont de l'analyse microscopique des tissus aux études comportementales, en passant par les explorations physiologiques. Dans le domaine de la microscopie, les méthodes d'imagerie récentes ont permis des progrès spectaculaires dans les études cellulaires et moléculaires des tissus. Cette approche nécessite de sacrifier les animaux.

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses modalités d'imagerie développées chez l'humain ont été adaptées à l'animal de laboratoire. Parmi elles, l'imagerie tomographique à rayons X est devenue une référence pour l'analyse des caractères anatomiques et phénotypiques chez la souris. Elle permet notamment d'obtenir sur un même animal des images 2D et 3D sans porter atteinte à son intégrité physique. Cet aspect non invasif permet d'envisager des études longitudinales *in vivo*, qui sont un apport précieux pour le suivi dans le temps de l'évolution d'une pathologie ou d'un traitement. Pour les analyses *ex vivo* d'échantillons biologiques isolés, la tomographie X permet des images 3D de haute résolution rivalisant ainsi avec les méthodes standards d'analyse par microscopie.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail de recherche dont les sujets d'études ont été : (1) le développement d'outils d'analyses spécifiques pour l'imagerie X 3D des tissus minéralisés et adipeux, (2) l'application des méthodologies développées à des problématiques de recherche biomédicale et (3) l'étude comparative et "multi-échelle" de différentes technologies de tomographie X pour l'imagerie du petit animal.

Dans le premier chapitre de cette thèse, nous passons en revue les différentes méthodes d'imagerie du petit animal : imagerie par rayons X, ultrasons, résonance magnétique, nucléaire, optique et photo-acoustique. L'analyse comparative des avantages et inconvénients de ces différentes techniques montre la pertinence et l'intérêt de la tomographie dans l'imagerie pré-clinique.

Le chapitre 2 est consacré à la description détaillée de la tomographie X : les principes physiques du rayonnement électromagnétique X et de ses interactions avec la matière, les méthodes de reconstruction tomographique, les différentes configurations géométriques et les critères permettant l'évaluation des performances d'un tomographe.

Les différents matériels d'imagerie 3D utilisés dans notre travail sont décrits dans le chapitre 3 : scanner humain (CT), micro-tomographie (micro-CT) et tomographie synchrotron.

Les chapitre 4, 5 et 6 sont consacrés à l'étude des tissus minéralisés chez la souris par micro-CT. La mandibule (os et dents) a été utilisée comme modèle pour le développement de nouveaux outils d'analyses qualitatifs et quantitatifs. La visualisation 3D basée sur le "volume rendering" a permis une analyse comparative des mandibules entières, révélant des défauts spécifiques de minéralisation. Des coupes virtuelles de l'os alvéolaire et des dents ont permis d'analyser les anomalies des tissus avec une précision comparable à la microscopie électronique à balayage. Une méthode de segmentation de type "region growing" a permis d'extraire le volume pulpaire des molaires pour caractériser la formation de la dentine. Nous avons appliqué ces outils à l'étude de souris invalidées pour le gène de la fibromoduline, une protéine impliquée dans le développement des os et des dents. Nous avons également étudié les os plats du crâne (calvaria) dans un modèle murin d'ostéoporose induite par des particules de polyéthylène.

Dans le chapitre 7, nous abordons l'imagerie *in vivo* du corps entier de la souris par scanner médical (CT). Nous avons centré notre analyse sur les tissus adipeux. Pour cela nous avons développé des outils permettant la quantification et la répartition 3D des amas de graisse dans le corps de la souris. La modélisation de la courbe Hounsfield avec des mixtures gaussiennes a permis la classification des voxels de graisse et la détection des régions d'intérêts. La discrimination entre la graisse viscérale et sous-cutanée a été effectuée avec une méthode de segmentation 2D+1 en initialisant un contour manuel sur une coupe de référence et en le propageant aux coupes contiguës.

Le chapitre 8 est consacré à une analyse phénotypique globale des différents tissus, os, dents, graisse et poumons, chez des souris invalidées pour le gène du récepteur 2B de la sérotonine. L'analyse par micro-CT et CT nous a permis de révéler des anomalies jusqu'alors inconnues chez ces souris.

Notre objectif dans le chapitre 9 a été d'évaluer les performances et les limites

de différentes technologies de tomographie X, CT médical, micro-CT *in vivo* et *ex vivo* et synchrotron, pour l'imagerie du petit animal. La comparaison porte sur des paramètres tels que le niveau de bruit relatif, le contraste entre plusieurs types de tissus, la résolution temporelle. Pour cela, une série d'expériences a été menée sur le corps entier de souris congelées imagées sur deux scanners médicaux CT (Siemens Flash CT 2 et Toshiba Aquilon 64), un micro-CT industriel (Viscom 8060 NDT) et un micro-CT dédié à l'imagerie *in vivo* (Skyscan 1178). Certaines pièces osseuses (calvarias, tibias, mandibule) ont été prélevées pour une imagerie haute résolution sur un micro-CT *ex vivo* (Skyscan 1172).

Dans le chapitre 10, nous abordons la problématique de l'irradiation. Une série d'expériences a eu pour objectif d'évaluer l'irradiation induite lors des examens d'imagerie. Des mesures de dose avec une chambre d'ionisation ont permis une première évaluation de la dose délivrée lors d'un examen avec le micro-CT industriel Viscom. Cette analyse a été complétée par une étude de dosimétrie par résonance paramagnétique électronique (RPE) sur des mandibules de souris. Cette méthode de spectroscopie, pour la première fois appliquée au petit animal, nous a permis d'obtenir une mesure quantitative de l'irradiation absorbée dans la matrice d'hydroxyapatite de l'émail des dents. De plus, l'utilisation de la RPE en mode imagerie, a donné une image 2D de la répartition de la dose absorbée par la mandibule.

L'innovation technologique va de pair avec la mise au point de nouveaux outils d'analyse d'images adaptés à l'échelle de l'animal de laboratoire. Dans notre travail, nous contribuons à l'évolution des technologies vers une utilisation plus généralisée dans la recherche biomédicale.

Chapitre **I**

Imagerie de l'animal de laboratoire

Sommaire

1.1	Modèles animaux et imagerie en recherche biomédicale	6
1.2	Les modalités d'imagerie	6
1.2.1	Imagerie par rayons X	7
1.2.2	Imagerie ultrasonore	8
1.2.3	Imagerie par résonance magnétique	11
1.2.4	Imagerie nucléaire	13
1.2.5	Imagerie optique	14
1.2.6	Imagerie photoacoustique	17
1.3	Synthèse sur les techniques d'imagerie chez le petit animal	19
1.4	Conclusion	21

1.1 Modèles animaux et imagerie en recherche biomédicale

Les recherches biomédicales font appel à des modèles animaux qui visent à mimer au plus près les processus physiologiques et pathologiques rencontrés chez l'humain. Les rongeurs sont des animaux de choix à double titre : d'une part par les facilités d'élevage et de stabulation en animalerie, d'autre part en raison de l'avènement des techniques de manipulations génétiques chez la souris. Les méthodes usuelles d'exploration des animaux vont de l'analyse microscopique des tissus aux études comportementales, en passant par les explorations physiologiques. Dans le domaine de la microscopie, les méthodes d'imagerie récentes ont permis des progrès spectaculaires dans les études cellulaires et moléculaires des tissus. Cette approche nécessite de sacrifier les animaux.

Plus récemment, le développement des techniques d'imagerie non invasives a ouvert un nouveau champ d'investigation sur des organes isolés et chez l'animal *in vivo* sans impliquer de dissection. L'imagerie tomographique permet notamment d'obtenir sur un même animal des images 2D et 3D sans porter atteinte à son intégrité physique. Cet aspect non invasif permet d'envisager des études longitudinales, qui sont un apport précieux pour le suivi dans le temps de l'évolution d'une pathologie ou d'un traitement.

1.2 Les modalités d'imagerie

Les modalités d'imagerie disponibles chez le petit animal ont pour la plupart été adaptées à partir des modalités utilisées chez l'humain. Cette transposition de l'humain à l'animal n'a pu se faire que grâce à des avancées technologiques permettant l'analyse de structures à l'échelle réduite de l'animal. Par exemple, une étude par imagerie du cerveau dont la résolution est de 6mm chez l'humain passe à 2mm chez le rat et à quelques centaines de μm chez la souris (Figure 1.1) [Del Guerra et al., 2008].

L'augmentation de la résolution implique également une augmentation de la sensibilité des systèmes d'imagerie. Si le volume d'analyse pour le petit animal est 1000 fois plus petit que chez l'humain, alors la concentration de l'élément à mesurer est 1000 fois plus faible et donne 1000 fois moins de signal. Une autre contrainte liée au petit animal dans l'imagerie *in vivo* est liée aux mouvements de l'animal qui doivent être évités, ce qui nécessite le plus souvent une anesthésie susceptible de perturber la physiologie de l'animal.

Les modalités d'imagerie peuvent être classées suivant qu'elles détectent des signaux intrinsèques à l'organisme (IRM, Ultrasons, imagerie X) et/ou des signaux induits par un traceur (nucléaires, optiques).

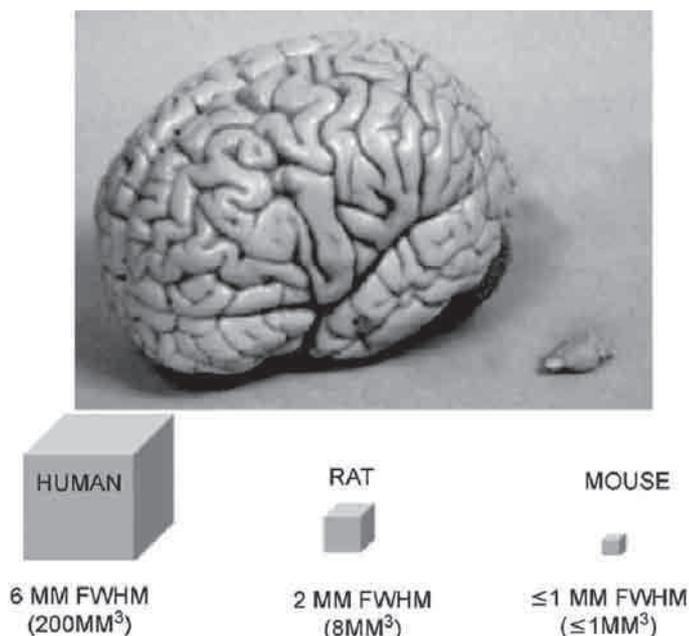


FIGURE 1.1 – Comparaison de la taille d'un cerveau humain et d'un cerveau de rat (en haut) et des échelles d'investigation correspondantes (en bas) [Del Guerra et al., 2008]

1.2.1 Imagerie par rayons X

L'imagerie par rayons X regroupe les méthodes pour lesquelles la création de l'image est basée sur la capacité des tissus à modifier un faisceau de rayons X. La propriété la plus utilisée en imagerie est l'atténuation.

Les techniques d'imagerie par rayons X sont des techniques d'imagerie par transmission : un faisceau de photons X, émis depuis une source, traverse l'objet (ou l'individu) à analyser avant d'arriver sur un détecteur. Les atténuations relatives des photons X par les différents tissus constituant l'objet permettent d'obtenir le contraste de l'image radiologique.

1.2.1.1 Radiographie

La radiographie désigne l'imagerie X en 2D, permettant d'obtenir des projections radiographiques (appelées également radiographies ou radios). En clinique humaine, cette technique représente encore aujourd'hui le plus gros pourcentage des examens d'imagerie médicale. Comme chez l'humain, l'imagerie du petit animal a été d'abord réalisée sur film radiologique avant que des appareils dédiés à l'animal soient développés avec des capteurs numériques plan.

1.2.1.2 DXA

L'ostéodensitométrie désigne une méthode d'imagerie par absorption biphotonique à rayons X (Double X-Rays Absorption : DXA). Elle permet d'obtenir une image de densité surfacique exprimée en g/cm^2 calculée à partir de l'atténuation

relative de deux faisceaux de rayons X d'énergies différentes. La DXA est reconnue par l'organisation mondiale de la santé (OMS) comme la seule méthode permettant de diagnostiquer l'ostéoporose en mesurant la densité des os du squelette. La principale utilisation de cette méthode chez l'humain est donc la mesure de la densité minérale osseuse. Cette technique est également utilisée pour l'étude de la composition corporelle d'un individu. En classifiant les tissus par rapport à leur densité, on peut quantifier les proportions de tissus musculaires, adipeux et minéralisés.

Cette technique est disponible chez le petit animal soit en utilisant un appareil dédié à l'humain qui comporte un module d'analyse adapté au rat et la souris (HOLOGIC), soit avec un appareil exclusivement dédié pour la souris (PIXIMUS).

1.2.1.3 Tomographie

La tomographie est une évolution de la radiographie. Elle repose sur le même principe physique de création de l'image par la mesure de l'atténuation des rayons X dans les tissus mais elle est couplée avec une méthode mathématique permettant de reconstruire en 3D l'objet (tomographie assistée par ordinateur ou "Computed Tomography : CT"). Lors de la phase d'acquisition, un mouvement de rotation relatif est donné entre l'objet et l'ensemble source/capteur permettant l'acquisition de projections autour de l'objet. Le volume de données représentant l'objet est alors constitué de l'empilement des coupes reconstruites mathématiquement à partir de ces projections.

Ce type d'imagerie a été utilisé pour la première fois chez l'humain en 1974 par Sir G. Hounsfield. Cette technique a ensuite connu de nombreuses évolutions et a été adaptée pour des applications dans les domaines de l'industrie et de la recherche avec des problématiques nécessitant une échelle d'investigation plus fine. Les appareils de tomographie dont la résolution est inférieure au mm, couramment nommé micro-CT, ont commencé à être développés dans les années 1980 [Seguin et al., 1985]. L'analyse de la micro-architecture osseuse a grandement participé au développement des micro-CT durant les années 1990 en étant l'une des premières applications [Kuhn et al., 1990] [Dedrick et al., 1993] [Ito et al., 1998] [Engelke et al., 1993] [Rueggsegger et al., 1996] [Peyrin et al., 1998] [Kapadia et al., 1998] [Muller et al., 1998].

C'est seulement en 1999 que le premier micro-CT dédié à l'imagerie *in vivo* du petit animal a été développé par une équipe de l'université de Duke (Oak Ridge, USA) dans le but d'analyser les modifications anatomiques induites lors de modifications génétiques sur des souris [Paulus et al., 1999]. Il existe aujourd'hui de nombreux appareils commerciaux permettant l'imagerie *ex vivo* et aussi *in vivo* (Tableau 1.1).

1.2.2 Imagerie ultrasonore

1.2.2.1 Imagerie anatomique

L'imagerie ultrasonore, technique de mesure par réflexion, repose sur la capacité des ondes mécaniques à se propager dans les tissus biologiques mous et à se

Fabricant	Produits	Site web
Biomedical Imaging Research (BIR), VARIAN Inc., USA	ACTIS 150/90 Desktop, ACTIS 150/130 Desktop, ACTIS 200/225 Desktop	www.bio-imaging.com
Bioscan Inc., USA	NanoSPECT/CT, NanoPET/CT	www.bioscan.com
Caliper LifeSciences, USA	QUANTUM FX μ CT	www.caliperls.com
CT Imaging GmbH, Allemagne	Tomoscope Synergy	www.ct-imaging.de
Echo Medical Systems, USA	LaTheta LCT-200, LaTheta LCT-100A	www.echomri.com
Gamma Medica-Ideas, Inc., USA	FLEX Triumph	www.gm-ideas.com
GE Medical Systems, USA	eXplore Locus, eXplore Locus SP, eXplore CT 120, eXplore Vista PET/CT, Triumph	www.gehealthcare.com
NanoFocusRay Co., Ltd, Korea	NFR Polaris-G90, NFR Polaris-S130	http://nanofocusray.en.ec21.com
Phoenix X-Ray, Allemagne	Nanotom m, Nanotom s, v-tome-x s	www.phoenix-xray.com
SCANCO Medical AG, Suisse	viva CT 75, viva CT 40, extremCT, μ CT 35, μ CT 40, μ CT 50 (nano CT), μ CT 80, μ CT 100	www.scanco.ch
Siemens AG, Allemagne	Inveon Micro CT	www.medical.siemens.com
SkyScan, Belgique	SkyScan 1076 in-vivo, SkyScan 1176 high-resolution, SkyScan 1178 high-throughput, SkyScan 1172 high-resolution, SkyScan 1174 compact	www.skyscan.be
Stratec Medizintechnik GmbH, Allemagne	XCT 3000 Research, XCT Research SA / SA Plus, XCT Research M / M Plus, XCT 2000L Peripheral QCT Scanner, XCT 3000 Peripheral QCT Scanner	www.stratec-med.com
XRadia, USA	VersaXRM-500, MicroXCT-200, MicroXCT-400, UltraXRM-L200	www.xradia.com
YXLON International GmbH, Allemagne	Yxlon Y.Fox μ CT	www.yxlon.com

TABLE 1.1 – Liste des micro-CT *ex vivo* et *in vivo* disponibles sur le marché

réfléchir aux interfaces des milieux d'impédances différentes. Le transducteur ultrasonore est positionné à la surface de la zone d'analyse et est en contact avec celle-ci grâce à l'interférence avec un milieu permettant la propagation du signal. L'image ultrasonore est créée en enregistrant l'écho du signal émis par le transducteur suivant plusieurs orientations, permettant de générer des images 2D ou 3D. La dimension du champ de vue de l'image dépend de la largeur de balayage du faisceau alors que la profondeur d'investigation et la résolution dépendent de la fréquence d'émission des ultrasons. Plus la fréquence est haute, plus la résolution est élevée mais plus la profondeur de pénétration est faible. Il est donc impossible d'imager à haute résolution des organes profonds.

Pour des fréquences comprises entre $3MHz$ et $80MHz$, les résolutions sont comprises entre $1mm$ et $30\mu m$. Pour le petit animal, les fréquences utilisées sont de l'ordre de 20 à $60MHz$ (contre 2 à $12MHz$ chez l'humain) et permettent l'observation anatomique de tissus entre 5 et $15mm$ de profondeur avec des résolutions spatiales de quelques dizaines de μm .

1.2.2.2 Imagerie Doppler

L'échographie Doppler permet de déterminer des paramètres fonctionnels à partir de la mesure de la vitesse de tissus en mouvement (valves cardiaques, sang, ...). Les vitesses sont recueillies par l'analyse de la variation fréquentielle entre les ondes émises et reçues lorsque celle-ci rencontrent une cible en déplacement. La vitesse ou le sens de circulation de sang sont un exemple de paramètres fonctionnels. Ces informations sont de plus superposables à l'imagerie anatomique. Il existe aujourd'hui plusieurs sociétés proposant des systèmes dédiés au petit animal.

1.2.2.3 Elastographie ultrasonore

L'élastographie permet l'analyse des propriétés mécaniques des tissus. Son but est de produire une cartographie relative à l'élasticité à partir de la génération et de l'étude de la vitesse de propagation d'ondes de cisaillement dans les tissus. Cette technique est particulièrement utile pour repérer et analyser des tumeurs cancéreuses dont le développement s'accompagne d'un changement local de propriétés mécaniques [Tanter et al., 2009]. Comme pour les autres techniques ultrasonores, l'élastographie présente une résolution temporelle très bonne [Zhang et al., 2010], permettant une imagerie quasi temps-réel [Tanter et al., 2010]. La résolution spatiale atteinte avec les plus récents appareils permet l'étude du foie dans des modèles de fibrose [Bastard et al., 2011] et même l'étude du cerveau de rat en 3D [Mace et al., 2010].

1.2.2.4 Agents de contraste et imagerie moléculaire ultrasonore

Afin de renforcer le contraste dans les tissus mous, des techniques à base de microbulles de gaz sont en développement [Ferrara et al., 2007]. Ces microbulles, de taille équivalente à des globules rouges, possèdent des propriétés de densité et

de compressibilité différentes des tissus biologiques, permettant le rehaussement du signal ultrasonore. Ces microbulles peuvent de plus être liées à des molécules et servir ainsi de sondes pour une imagerie moléculaire [Voigt, 2009] [Hauwel et al., 2010] [Anderson et al., 2010]

1.2.2.5 Bilan des techniques ultrasonores

L'imagerie ultrasonore permet l'étude haute résolution des organes mous et peu profonds de la souris de façon non invasive et en temps réel. En plus de l'imagerie anatomique qui peut être en 3D, des informations quantitatives fonctionnelles sont possibles avec l'imagerie Doppler. Le renforcement du contraste des tissus mous nécessite l'utilisation d'agent de contraste.

Les systèmes ultrasonores présentent l'avantage d'être relativement peu onéreux, peu encombrants mais surtout d'être non invasif pour l'animal.

1.2.3 Imagerie par résonance magnétique

1.2.3.1 Principe de la Résonance Magnétique Nucléaire

La résonance magnétique repose sur la détection de signaux issus des propriétés magnétiques des noyaux de spin non nul. Les noyaux d'intérêt biologiques possédant de telles propriétés sont les noyaux d'hydrogène (^1H), de l'isotope du carbone (^{13}C), du fluor (^{19}F), du phosphore (^{31}P) et du sodium (^{23}Na). L'imagerie par résonance magnétique (IRM) repose presque uniquement sur l'étude du noyau d'hydrogène qui est présent dans la molécule d'eau et donc en grande quantité dans les tissus biologiques.

En présence d'un champ magnétique stable et intense (60000 fois le champ magnétique terrestre) généré par un aimant supraconducteur, les spins des noyaux s'alignent avec ce champ. Des champs magnétiques oscillants plus faibles, dits radio fréquences, sont utilisés pour induire une légère modification de l'alignement des spins laquelle dépend de la molécule auxquelles ils appartiennent et de l'intensité du champ magnétique. Le retour à la position d'équilibre magnétique (relaxation) va entraîner une perturbation du flux électromagnétique qui peut être mesurée. Les images de contraste magnétique sont le reflet de la mesure de ces temps de relaxation, qui peut être longitudinale ($T1$) ou transversale ($T2$). En appliquant des champs magnétiques non-uniformes (gradients), il est possible d'obtenir une localisation spatiale permettant l'imagerie 2D ou 3D.

1.2.3.2 IRM anatomique

L'IRM anatomique exploite les images de contraste $T1$ ou $T2$, qui reflètent la distribution spatiale des atomes d'hydrogène. Cette imagerie permet intrinsèquement d'avoir un fort contraste dans les tissus mous composés majoritairement d'eau, à l'inverse de la tomographie à rayons X. Alors que chez l'humain les résolutions spatiales sont de l'ordre de 1mm , les résolutions chez le petit animal doivent atteindre quelques dizaines de μm . Ces résolutions ne sont possibles qu'avec des gradients et

des champs magnétiques très intenses (entre 3 et 12 *Tesla*). La sensibilité, qui dépend de la taille du volume élémentaire, implique de faire des compromis entre la durée de l'acquisition et la résolution temporelle. Par exemple, il est impossible d'avoir une imagerie très résolue et très rapide.

1.2.3.3 IRM fonctionnelle

L'IRMf BOLD (pour "Blood Oxygenation Level Dependant") permet d'obtenir des informations fonctionnelles sur l'activité cérébrale en se basant sur l'hypothèse qu'une zone du cerveau en activité voit sa concentration locale en oxygène augmenter. De par la consommation d'oxygène, la concentration dans le sang de l'oxyhémoglobine (qui transporte l'oxygène) diminue au profit de la désoxyhémoglobine. Cette molécule a un moment magnétique non nul et est détectable en IRM. La variation locale de la susceptibilité magnétique permet alors d'observer indirectement des zones consommatrices d'oxygène et donc des zones d'activité du cerveau. Cette technique développée chez l'humain a été adaptée à l'échelle du petit animal [Sanganahalli et al., 2008] [der Linden et al., 2009] [Weng et al., 2010] [Mueggler et al., 2010].

La méthode BOLD est de plus utilisée comme moyen d'investigation de l'oxygénation des tumeurs [Zhao et al., 2009]. La désoxyhémoglobine est alors utilisée comme agent de contraste endogène. Après inhalation d'un gaz hyperoxique (95% O_2 et 5% CO_2), une variation du rapport entre désoxyhémoglobine et oxyhémoglobine peut être induite dans des tumeurs hypoxiques. La modification du signal lié à cette variation permet d'obtenir des informations sur fonctionnalité de la vascularisation du tissu tumoral.

1.2.3.4 IRM moléculaire

En s'appuyant sur l'utilisation d'agent de contraste à base de gadolinium (Gd^{3+}), de manganèse (Mn^{2+}), de fer (Fe^{3+}) ou de marqueurs magnétiques (anticorps associés à une nanoparticule) [Weissleder et al., 2000], l'IRM peut être utilisée comme une imagerie moléculaire [Louie et al., 2000] [Genove et al., 2005].

1.2.3.5 Bilan des techniques d'IRM

Les techniques et les applications de l'IRM sont très nombreuses. Les informations anatomiques haute résolution et les informations physiologiques et pharmacologiques obtenues par IRM ont permis des applications variées dans de nombreux domaines : neurologie, cardiovasculaire, respiratoire, gastro-intestinale, pathologies osseuses, oncologie. Cette technique présente cependant des inconvénients : sa résolution temporelle est limitée par sa sensibilité relativement faible, sa mise en oeuvre est relativement complexe et nécessite une grande expertise [Benveniste and Blackband, 2002] et son coût d'exploitation reste encore aujourd'hui très élevé.

1.2.4 Imagerie nucléaire

Les techniques d'imagerie nucléaire sont basées sur la détection au cours du temps de signaux émis par un traceur radiomarqué, par un isotope β^+ en Tomographie par Emission de Positron (TEP ou "Positron Emission Tomography : PET") ou par un émetteur γ en Tomographie par émission mono-photonique (TEMP ou "Single Photon Emission Computed Tomography : SPECT"). Les traceurs se diluent dans le flux des autres molécules de l'organisme et sont détectés grâce au rayonnement qu'ils émettent. La détermination de la concentration locale de radioactivité permet d'obtenir deux types d'informations : une information spatiale sur la zone de fixation du traceur et une information temporelle sur la cinétique de fixation du traceur. Ces techniques employées chez l'humain en cancérologie, en neurologie ou encore en cardiologie ont pu être adaptées au petit animal grâce au développement dans les années 90 de caméras PET et SPECT avec notamment une meilleure résolution spatiale et une architecture plus compacte [Lecomte et al., 1996] [Jeavons et al., 1999] [Chatziioannou et al., 1999] [Valva Ochos et al., 1997].

1.2.4.1 Imagerie PET

La désintégration des isotopes β^+ (les plus utilisés sont ^{18}F , le ^{11}C et le ^{15}O) émet un positon qui après un court déplacement (de l'ordre du millimètre) va s'annihiler en présence d'un électron du milieu environnant provoquant l'émission de deux photons gamma de $511keV$ à 180° l'un de l'autre. La détection en coïncidence de ces deux photons gamma couplée avec une méthode de reconstruction tomographique permet d'obtenir l'image TEP.

A cause de la durée de vie très courte des radio-isotopes, cette technique nécessite que l'équipement soit installé à proximité d'un cyclotron et d'un laboratoire de biochimie permettant la production et la mise en oeuvre des isotopes.

Les systèmes micro-PET développés pour le petit animal ont une résolution limitée de l'ordre de $1mm$ et $2mm$, mais bénéficient d'une haute sensibilité d'environ $10^{-11}mole/L$ [Dobrucki and Sinusas, 2005]. Les temps d'acquisition d'une image peuvent être relativement courts (de l'ordre de la seconde) permettant par exemple l'étude dynamique du coeur [Schelbert et al., 2003] [Croteau et al., 2003] mais surtout l'étude dans le temps de l'évolution du traceur.

1.2.4.2 Imagerie SPECT

En imagerie SPECT, le signal mesuré est un photon gamma qui est émis par un radiotraceur (le plus utilisé est le ^{99}Tc , les autres sont ^{111}In , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I et ^{201}Tl). Un collimateur est utilisé au niveau de la caméra pour permettre la sélection des photons gamma émis suivant une incidence particulière. L'acquisition d'images autour de l'animal permet d'obtenir après reconstruction tomographique une image SPECT 3D.

Contrairement au PET, les radio-traceurs utilisés pour le SPECT disposent d'une période de demi-vie plus longue ne nécessitant pas de centre de production de

radio-isotope à proximité du laboratoire d'analyse.

Alors que l'efficacité de détection est de l'ordre de 5% pour le PET, elle est limitée à environ 0.05% pour le SPECT notamment à cause de la collimation. Cette faible sensibilité induit une résolution temporelle plus mauvaise que le PET (une acquisition dure en moyenne une heure) rendant impossible l'étude dans le temps du suivi d'un radio-traceur. Les études en SPECT, la plupart du temps statique, permettent d'obtenir la distribution "quasi-stable" du radio-traceur dans un organe.

1.2.4.3 Bilan des techniques nucléaires

Les techniques d'imagerie PET et SPECT appliquées au petit animal se distinguent des autres techniques d'imagerie moléculaire. Leur sensibilité élevée permet la quantification de concentrations moléculaires très faibles (jusqu'à $10^{-12} mole/L$). La grande variété des traceurs radioactifs permet de nombreuses applications en oncologie, pour l'évaluation de nouveaux radiopharmaceutiques ou encore pour l'étude de l'expression des gènes. Ce type d'imagerie apporte également des informations fonctionnelles qui sont complémentaires à l'imagerie anatomique.

Ces techniques présentent plusieurs limitations. Intrinsèquement, elles ne permettant pas d'obtenir d'informations anatomiques et présentant une faible résolution spatiale comprise entre $1mm$ et $2mm$. Ces méthodes sont presque toujours couplées à une imagerie micro-CT (quelques fois avec IRM) permettant d'obtenir une localisation anatomique après recalage des deux acquisitions. La résolution temporelle assez longue est dans le cas du SPECT un élément supplémentaire participant à la complexité de mise en oeuvre de ces deux techniques, générant des coûts d'exploitation élevés. Enfin ce type d'imagerie utilise des rayonnements ionisants qui vont induire des doses élevées lors des examens d'imagerie, ce qui impose de prendre en considération ces doses et leur innocuité par rapport à la problématique de l'étude.

1.2.5 Imagerie optique

1.2.5.1 Fluorescence

Pour obtenir une image de fluorescence, un fluorophore (colorant fluorescent) lié chimiquement à une molécule, est stimulé par une source de lumière externe d'une longueur d'onde donnée (exemple : diode laser) afin de promouvoir l'excitation électronique. Une fois excité, le fluorophore émet de la lumière avec une longueur d'onde plus grande que celle de l'excitation. Un filtre situé devant le détecteur laisse passer la lumière émise mais bloque la lumière d'excitation, permettant ainsi de ne détecter que la fluorescence émise par le fluorophore.

L'imagerie de fluorescence a de nombreuses applications : cancérologie (étude de la genèse des tumeurs, de la détection de cancer, des métastases), développement de nouveaux outils thérapeutiques, la thérapie génique [Ntziachristos et al., 2005] [Graves et al., 2004].

L'imagerie de fluorescence est avant tout une technique de microscopie pour l'investigation *ex vivo*, *in vitro* ou encore *intravital*. Des techniques d'imagerie à

l'échelle macroscopique, permettant l'imagerie du corps entier, ont été développées depuis une dizaine d'années. La tomographie de fluorescence ("Fluorescence Molecular Tomography" : FMT) permet l'imagerie en 3D de la souris entière [Ntziachristos et al., 2002]. La FMT a été utilisée pour l'étude de souris avec des modèles de tumeurs et permet la quantification et la visualisation de l'activité moléculaire dans des souris *in vivo* et en 3D [Graves et al., 2004].

La tomographie de fluorescence désigne deux technologies d'acquisitions. Pour la première, les images obtenues autour de l'animal sur 360° sont reconstruites avec des méthodes tomographique "classiques" [Song et al., 2007] [Lasser and Ntziachristos, 2007] [Deliolanis et al., 2007]. La seconde méthode, moins intuitive, utilise une plaque percée de trous répartis suivant une grille et placée sous l'animal. Une excitation par la source de lumière externe est effectuée au niveau de chaque trou. Il y a alors autant d'images de fluorescence qu'il y a de trous. La méthode de reconstruction utilisée ensuite est basée sur des modèles mathématiques de diffusion de la lumière dans les tissus. En utilisant les différentes images et en tenant compte de la position de la source d'excitation, il est possible de reconstruire la profondeur du signal de fluorescence [Wang et al., 2007]. Cette méthode est celle employée dans le système FMT 2500 LX distribué par la société Perkin Elmer.

1.2.5.2 Bioluminescence

Contrairement à la fluorescence, l'imagerie par bioluminescence réagit à un stimulus donné *in vivo* et ne nécessite pas de source d'excitation externe. L'enzyme utilisée comme stimulus la plus connue est la luciférase (elle permet aux lucioles de produire de la lumière). En présence d'oxygène et d'adenosine triphosphate (ATP), la luciférase se décompose en D-luciférine, produisant ainsi une lumière dans le visible. Comme l'ATP n'est produit que dans des cellules dont le métabolisme est actif, seules ces cellules émettront des photons. Pour capter ces photons émis en faible nombre, il est nécessaire d'utiliser une caméra CCD haute sensibilité refroidie à basse température (autour de -100°C) pour diminuer le bruit électronique. De plus l'animal est placé dans une chambre noire empêchant toute entrée de lumière extérieure afin d'éviter un bruit de fond.

Une description plus détaillée des principes de la bioluminescence est décrite dans la thèse de Smail Akkoul ?? ??.

Parmi les applications les plus connues de l'imagerie par bioluminescence, on compte la détection *in vivo* non invasive de tumeurs, la quantification de la croissance tumorale et la progression du cancer (métastases). Des applications en infectiologie [Hutchens and Luker, 2007] [Francis et al., 2000] et en thérapie génique [Ray et al., 2008] ont également été développées.

Cette technique est non invasive [Contag and Ross, 2002] et présente l'avantage d'être peu onéreuse et rapide à mettre en oeuvre. Il faut remarquer que la résolution, qui peut atteindre $60\mu\text{m}$, se dégrade avec la profondeur à cause de l'atténuation et de la diffusion dans les tissus traversés [Rice et al., 2001]. Ces effets

peuvent biaiser la quantification sur des tissus non superficiels, c'est pourquoi des méthodes de corrections par traitement d'images avec des techniques de déconvolution ont été développées [?] et mises en oeuvre [Pesnel, 2010].

Des travaux ont permis de réaliser des systèmes de bioluminescence en 3D. Un des systèmes commercialisés consiste en un mouvement de translation circulaire de l'animal couplé à une méthode de reconstruction tomographique proposant un gain par rapport au système 2D par l'ajout de la notion de profondeur. Ce système, beaucoup plus bruyant, imposait une complexité de mise oeuvre trop importante, notamment par rapport au temps d'acquisition (cet appareil n'est plus commercialisé). Un autre système propose une reconstruction "pseudo 3D" permettant une reconstruction de la profondeur à partir de l'enveloppe externe de l'animal. Ce système est celui de l'appareil *IVIS Spectrum* proposé par la société Caliper LifeSciences.

1.2.5.3 OCT

La tomographie à cohérence optique ("Optical Coherence Tomography" : OCT) mise au point à partir de 1991 permet d'obtenir une image 3D de la diffusion de la lumière dans des tissus biologiques. C'est une technique d'interférométrie utilisant une lumière dans le proche infrarouge. L'utilisation de ces longueurs d'ondes permet une bonne pénétration dans les tissus. A titre de comparaison, les profondeurs de pénétration de la microscopie confocale sont plus faibles. La résolution des images obtenues peut atteindre des résolutions en dessous du μm .

En 1990, la première application biomédicale de cette technique a permis d'imager en 2D le fond d'un oeil humain [Fercher, 1990]. Elle est aujourd'hui massivement utilisée en 3D en routine par les ophtalmologistes pour l'étude du fond de l'oeil, appliqué au diagnostic de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) ou du glaucome. Ce n'est que très récemment que cette technique a été appliquée au petit animal, d'abord pour des études oculaires à très haute résolution [Ruggeri et al., 2009]. Elle a ensuite été mise en oeuvre pour l'imagerie morphologique de polypes intestinaux [Chen et al., 2010], l'étude de modèles de cancer du colon à l'échelle de l'abdomen [Winkler et al., 2010], l'étude quantitative du flux sanguin cérébrale chez le rat [Srinivasan et al., 2010] ou encore l'étude du système cardio-vasculaire de l'embryon de souris [Luo et al., 2006] [Jenkins et al., 2006].

Cette technique présente l'avantage d'être non invasive et réalisée sans contact (par opposition aux ultrasons). Elle offre une imagerie 3D avec une haute résolution spatiale mais surtout une résolution temporelle très élevée permettant l'imagerie dynamique.

1.2.5.4 Imagerie de tomographie optique de projection

La tomographie optique par projection ("Optical Projection Tomography" : OPT) est une technique récente, développée en 2002 dans le but d'imager en 3D des organismes au cours de leur développement [Sharpe et al., 2002]. Cette technique est particulièrement bien adaptée à l'imagerie de petits échantillons biologiques (de

1 à 10mm de diamètre) comme des foetus de souris [Colas and Sharpe, 2009] ou des invertébrés [Rieckher et al., 2011]. Elle est basée sur la transmission de la lumière visible à travers des tissus biologiques. Des images de projection sont obtenues à travers l'échantillon, puis reconstruites avec des méthodes de reconstruction tomographiques "classiques". L'échantillon doit par contre avoir reçu une préparation spécifique le rendant plus ou moins transparent. Elle peut également être utilisée comme une technique de fluorescence 3D haute résolution.

Cette technique permet une imagerie 3D anatomique haute résolution située entre l'IRM et la microscopie confocale en terme d'échelle d'investigation [Sharpe, 2004]. La visualisation et la quantification 3D de lésions athérosclérotiques dans les artères de souris illustre bien cette échelle d'investigation [Kirkby et al., 2011]. De plus, des études sur le pancréas de souris dans des modèles de pathogénèse de diabète de type 1 en sont des exemples d'applications de cette technique comme imagerie moléculaire [Alanentalo et al., 2008] [Alanentalo et al., 2010].

L'OPT permet l'imagerie spatio-temporelle de l'expression des gènes et des altérations anatomiques avec une résolution de l'ordre de grandeur de la cellule, elle utilise soit la fluorescence soit l'absorption comme source de contraste [Rieckher et al., 2011] (Figure 1.2).

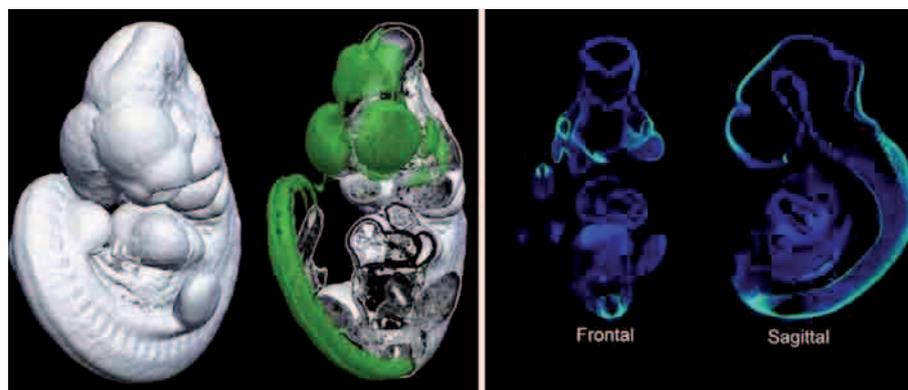


FIGURE 1.2 – Visualisations 3D (à gauche) et coupes virtuelles obtenues par OPT avec un embryon de souris transgénique (E10.6 Pax-6) (illustration modifiée à partir de www.bioptronics.com)

1.2.6 Imagerie photoacoustique

L'imagerie de tomographie photo-acoustique ou opto-acoustique ("Photoacoustic CT") combine les avantages de l'imagerie optique en terme de contraste et la haute résolution de l'imagerie ultrasonore en une seule modalité [Wang, 2008]. La pénétration dans les tissus est plus importante que pour l'imagerie OCT.

Les développements de cette technique sont en pleine évolution. En 2009, Gammelmeier propose un système permettant l'imagerie *in vivo* en 2D en temps réel à

8images/sec avec une résolution inférieure à $200\mu\text{m}$ [Gamelin et al., 2009]. Des travaux plus récents montrent la faisabilité de l'imagerie 3D du corps entier du petit animal avec une résolution 2D de $100\mu\text{m}$, une épaisseur de coupe de 1mm et une acquisition rapide [Xia et al., 2011]. Le seul appareil commercial disponible aujourd'hui est proposé par la société *Endra, Inc.* avec une résolution spatiale inférieure à $280\mu\text{m}$ et un champ de vue supérieur à 20mm (Figure 1.3).

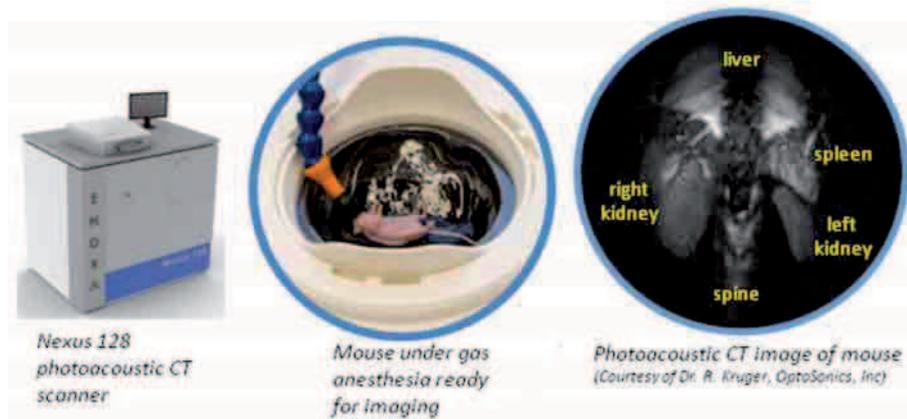


FIGURE 1.3 – Illustration de l'appareil Nexus128 de tomographie photoacoustique (à gauche) et image de l'abdomen d'une souris (à droite) (Illustration modifiée à partir de "www.endrainc.com")

1.3 Synthèse sur les techniques d'imagerie chez le petit animal

Il existe aujourd'hui de nombreuses techniques d'imagerie pour le petit animal. La plupart des modalités présentent des caractéristiques différentes permettant chacune de répondre à des problématiques spécifiques. Le Tableau 1.2 synthétise les caractéristiques des modalités décrites précédemment.

La complémentarité de ces techniques d'imagerie est bien illustrée par les développements récents et la généralisation de l'imagerie multi-modale. Elles peuvent également être concurrentes lorsqu'elles apportent des informations de même nature. Par exemple, en imagerie anatomique, l'IRM peut dans certains cas apporter la même information que la tomographie X, mais avec des caractéristiques d'acquisition différentes.

Que ce soit pour leur complémentarité ou leur concurrence, ces techniques nécessitent une comparaison précise et objective afin d'identifier au mieux la ou les meilleures modalités permettant de répondre à la problématique de l'étude. Trois principaux critères sont admis pour l'évaluation des performances des techniques d'imagerie du petit animal [Corot, 2004] [Guibaud et al., 2005] : la résolution spatiale, le contraste et la résolution temporelle. Afin de compléter cette comparaison dépendante de la performance, il est intéressant de renseigner sur les coût d'exploitation de l'imagerie.

Le Tableau 1.3 illustre la comparaison des techniques suivant les trois critères de performance et les coûts liés à l'imagerie. D'après ces informations la tomographie X est la méthode offrant le meilleur compromis entre résolution spatiale, résolution temporelle et coût d'exploitation.

Une autre approche pour la comparaison des modalités consiste à distinguer les différentes cibles d'investigation : anatomique, physiologique, métabolique et moléculaire (Figure 1.4).

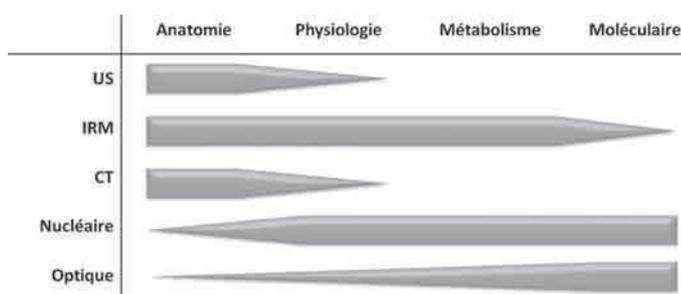


FIGURE 1.4 – Différentes cibles d'investigation pour les modalités d'imagerie du petit animal

1.3. Synthèse sur les techniques d'imagerie chez le petit animal

Technique	Résolution spatiale	Résolution temporelle	Traceurs ou agents de contraste	Applications	Limitations
Micro-CT	10 nm - 1 mm <i>ex vivo</i> , 10 μm <i>in vivo</i>	sec/min/ heure	iode	imagerie anatomique, physiologique et fonctionnelle	contraste tissus mous, rayonnement ionisant
Ultrasons	50-500 μm	10 ms - 1 min	microbulles	imagerie morphologique et physiologique des organes peu profonds	pénétration limitée, artefacts dus à l'air et aux os, interprétation des images
IRM	100 μm - 5 mm	min/heure	Gd^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{3+}	phénotypage anatomique, imagerie physiologique, fonctionnelle et moléculaire	Faible sensibilité, temps d'acquisition et de traitements des données longs, coût élevé
PET	1-2 mm	10 sec/min	^{18}F , ^{11}C , ^{15}O	métabolisme cellulaire, physiologiques et fonctionnelles, pharmacocinétique, moléculaire, expression génique	cyclotron et radiochimie, rayonnements ionisants, faible résolution spatiale, mauvaise quantification
SPECT	1-2 mm	100 sec	^{99}T , ^{111}In , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{201}Ti	anticorps, peptides, pharmacocinétique	collimation, faible sensibilité, mauvaise résolution spatiale, rayonnement ionisant
Optique (fluorescence, bioluminescence)	1 - 5 mm	sec - min	GFP, Cy5.5, Lucifé-rine	imagerie moléculaire, expression génique	résolution spatiale faible, atténuation dans les tissus, profondeur
OCT	μm	< sec		imagerie morphologique et fonctionnelle	profondeur de pénétration limitée, mise en oeuvre
OPT	μm	heure	GFP, Cy5.5	imagerie moléculaire, expression génique	applications limitées, préparation et taille des échantillons
Photo Acoustic CT	100-300 μm	< sec	Traceurs ou agents de contraste	Applications	Limitations

TABLE 1.2 – Caractéristiques des différentes techniques disponibles pour l'imagerie non-invasive du petit animal

	Spatiale	Contraste	Temporelle	Coûts
Rayons X	++++	+	+++	+++
Ultrasons	++	++	+++	++++
IRM	+++	++	++	+
PET	+	++++	++	+
SPECT	+	++++	+	+
Optique	+	++++	+++	++
Photo acoustique CT	++	+++	+++	?

TABLE 1.3 – Critères d'évaluation pour la comparaison des modalités d'imagerie du petit animal

1.4 Conclusion

L'imagerie par tomographie X a été une des première modalité disponible chez l'humain a être adaptée chez le petit animal. Malgré les avancées de l'imagerie X avec notamment les agents de contraste ou la double énergie, l'IRM conserve un avantage théorique en terme de contraste des tissus mous et surtout par rapport au caractère ionisant des rayons X. L'imagerie par tomographie X est cependant devenue une référence dans l'acquisition d'images anatomiques. C'est une méthode simple de mise en oeuvre, permettant des protocoles d'acquisitions rapides avec le meilleur compromis en terme de résolutions spatiales et temporelles. Les couts d'exploitation et de maintenance sont également des points clés de cette modalité lui donnant un avantage supplémentaire par rapport à l'IRM. De plus la recherche et le développement des nouveaux systèmes de tomographie X se focalisent aujourd'hui sur la réduction de la dose d'irradiation, ce qui permet d'envisager des appareils délivrant de très faibles doses.

L'utilisation de micro-CT est également en augmentation à cause des développements des techniques nucléaires et optiques de l'imagerie moléculaire. En effet ces techniques ayant une résolution spatiale très mauvaise, elles sont systématiquement couplées à un micro-CT pour obtenir une cartographie anatomique précise.

La tomographie à rayons X est la seule technique dont la résolution est possible pour toutes les échelles d'investigations. Ce caractère multi-résolution est bien illustré par la plateforme du "Bioimaging Systems Lab" de l'université "Wake Forest" qui proposent l'imagerie par tomographie X entre $30nm$ et $3mm$ (Figure 1.5).

L'utilisation du micro-CT pour l'imagerie du petit animal connaît une augmentation continue depuis l'introduction de méthodes de reconstruction tomographique efficaces [Johnson et al., 1998] [Cavanaugh et al., 2004]. Cette augmentation est associée à une hausse des publications associant étude préclinique et imagerie par micro-CT (Figure 1.6).

L'ensemble de ces éléments font de la tomographie à rayons X la modalité d'imagerie du petit animal la plus utilisée aujourd'hui.

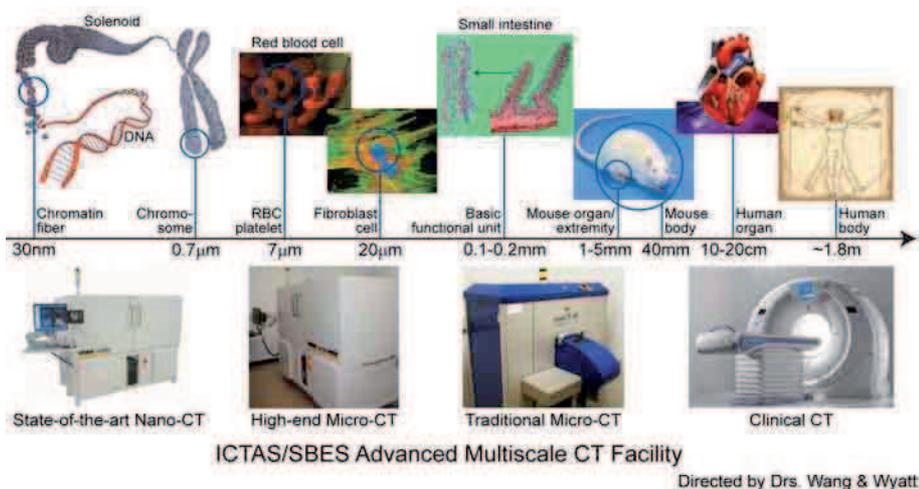


FIGURE 1.5 – Illustration des possibilités d’investigations multi-échelles en tomographie à rayons X proposée par la division d’imagerie biomédicale du "Bioimaging Systems Lab" de l’université "Wake Forest" (source <http://www.imaging.sbes.vt.edu/research/sam-ct/>)

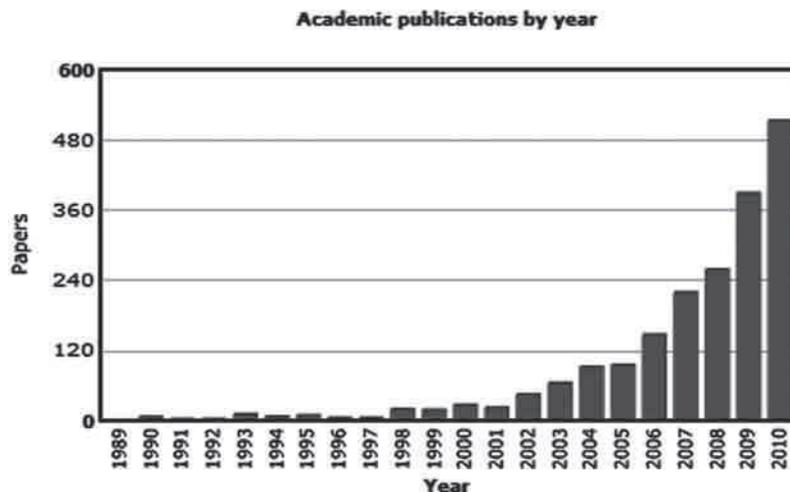


FIGURE 1.6 – Illustration de l’augmentation du nombre de publications mettant en oeuvre la tomographie X pour le petit animal en fonction de l’année. Le graphique a été généré à partir de la base de données PUBMED avec l’outil "MEDLINE summary tool" proposé par MJ Galsworthy et disponible à l’adresse www.medsum.info, avec les termes clés : « μ CT OR micro-CT OR mini-CT OR "High Resolution" OR CT AND (animal OR mice OR rat) »

Dans ce travail de thèse nous avons étudié les possibilités offertes par cette modalité. Les différentes études présentées ici ont pour objectifs de comparer différentes échelles d’investigation avec différents tomographes mais aussi de développer des méthodologies d’analyse permettant d’extraire le maximum d’informations des données 3D afin de répondre à chacune des problématiques biomédicales associées.

Tomographie à rayons X

Sommaire

2.1	Introduction	24
2.2	Les différentes configurations de tomographes	25
2.2.1	Générations	25
2.2.2	Différentes configurations d'acquisition	26
2.2.3	Différentes géométries de faisceau	27
2.3	Le rayonnement électromagnétique	28
2.3.1	Production des rayons X	29
2.3.2	La source de rayons X	30
2.3.3	Interaction des rayons X avec la matière	32
2.3.4	Filtrage du faisceau	34
2.4	Détection des rayons X et formation de l'image radiologique	35
2.4.1	Le détecteur	35
2.4.2	Atténuation et formation de l'image radiographique	35
2.5	Reconstruction tomographique	36
2.5.1	Modélisation du problème de reconstruction tomographique	37
2.5.2	Méthodes de reconstruction analytique	38
2.5.3	Méthodes de reconstruction itératives	39
2.6	Caractéristiques des données	41
2.6.1	Données volumiques	41
2.6.2	Unités Hounsfield	41
2.7	Paramètres caractéristiques d'un tomographe	42
2.7.1	Résolution spatiale	42
2.7.2	Bruit	43
2.7.3	Contraste	44
2.7.4	Résolution temporelle	45
2.7.5	Vitesse d'acquisition	45
2.7.6	Stabilité temporelle	45
2.7.7	Les artefacts	46
2.8	Conclusion, quels tissus cibles de l'analyse	51

2.1 Introduction

La tomographie est une technique d'imagerie qui permet de reconstruire la composition et la structure interne d'un objet. Son nom vient du grec *tomos* (coupe) et *graphein* (écrire). L'objet analysé est représenté par des images en coupes virtuelles dont l'empilement permet de décrire son volume. La reconstruction de ces coupes peut être calculée à partir de la mesure des rayonnements émis, transmis ou réfléchis par l'objet étudié. Il existe différentes méthodes de tomographie, comme la tomographie par ultrasons, par résonance magnétique, par neutrons, par rayons X ou gamma.

Pour la tomographie à rayons X la reconstruction est obtenue par l'analyse des interactions entre le faisceau de rayons X et le milieu traversé. On peut distinguer deux types de tomographie à rayons X, la tomographie classique en absorption et la tomographie à contraste de phase. L'information reconstruite pour la tomographie d'absorption est la fonction d'atténuation des photons X dans la matière. Pour le contraste de phase l'information reconstruite est basée sur la modification de la phase de l'onde électromagnétique par l'objet.

Dans ces deux cas, la tomographie par rayons X est une méthode par transmission : l'objet à analyser est situé entre les deux éléments principaux d'un tomographe, la source de rayons X et le détecteur (Figure 2.1).

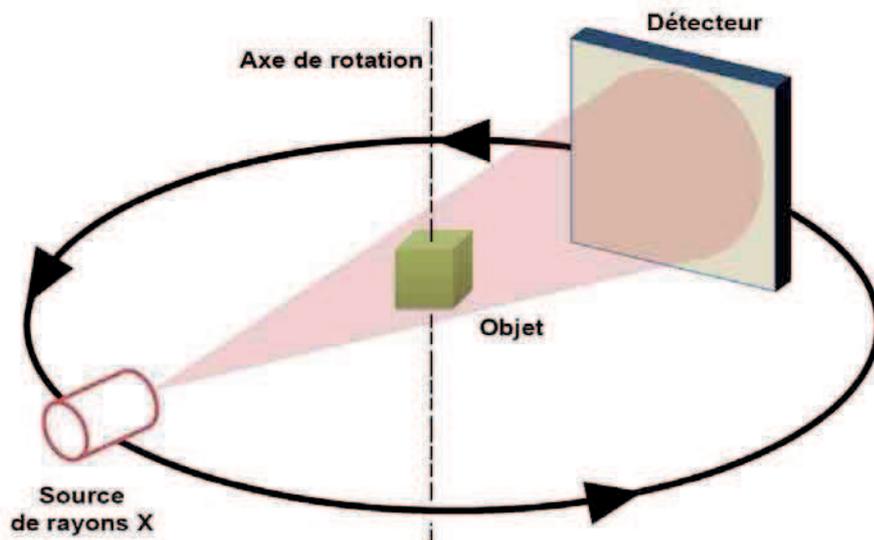


FIGURE 2.1 – Schéma type d'un tomographe

Johann Radon a énoncé en 1917 les bases mathématiques de la reconstruction d'un objet à partir de projections. Le premier appareil de tomographie à rayons X destiné à la radiologie a été conçu en 1972 par Sir Godfrey Hounsfield pour lequel il reçu avec Allan MacLeod Cormack le prix Nobel de médecine en 1979.

2.2 Les différentes configurations de tomographes

2.2.1 Générations

Depuis l'invention du scanner par G. Hounsfield, les appareils de tomographie à rayons X n'ont cessé d'évoluer. Aux quatre catégories classiquement définies [Kalender, 2006], s'ajoute désormais de nouvelles générations de tomographes. Cette classification est illustrée sur la Figure 2.2.

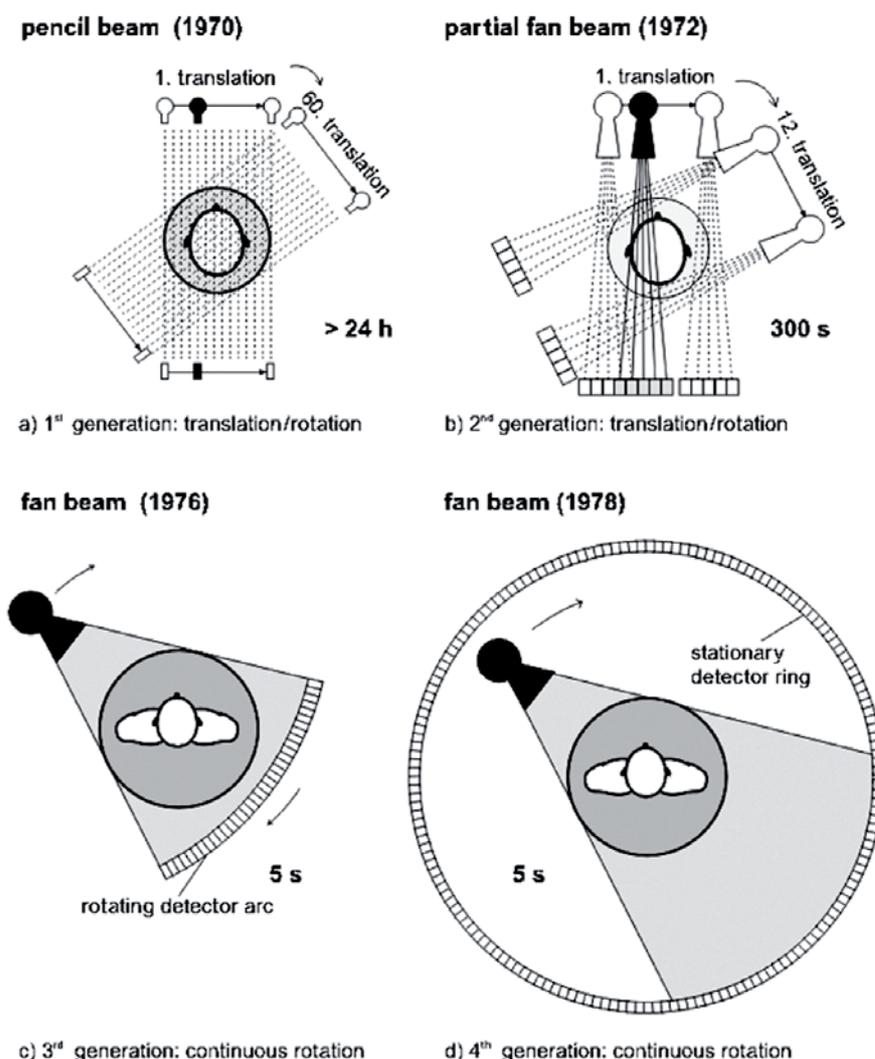


FIGURE 2.2 – Les quatre différentes générations de tomographe [Kalender, 2006]

Dans le système de première génération (Figure 2.2 (a)) présenté en 1972 par Hounsfield et Cormack, la source d'émission de rayons X émet un faisceau très fin intégré sur un seul détecteur [Hounsfield, 1973]. On emploie le terme de faisceau en "pinceau" ("Pencil Beam") pour qualifier ce type d'émission. Une projection 1D est créée en déplaçant l'ensemble source/détecteur en translation. Cet ensemble est

ensuite mis en rotation afin d'acquérir la projection correspondant l'orientation suivante. Le système tourne ainsi sur 180° en une vingtaine de minutes pour acquérir les données d'une seule coupe.

Les déplacements mécaniques dans la seconde génération sont identiques. Un faisceau de rayons X plus large et un détecteur unique remplacé par une série de détecteur (Figure 2.2 (b)), permettent de réduire le temps d'acquisition des données nécessaire à la reconstruction d'une coupe à une trentaine de secondes.

Dans la troisième génération, la translation est supprimée. Un capteur 1D, appelé "barrette" et composé d'un nombre élevé de détecteurs (jusqu'à mille) répartis linéairement ou en arc de cercle, permet l'acquisition des données pour une orientation avec une seule émission. Pour cela, le capteur est couplé à une source dont le faisceau divergent ("Fan Beam") permet de couvrir l'ensemble des détecteurs (Figure 2.2 (c)). La majorité des scanners médicaux disponibles actuellement dispose de cette configuration et permet des temps d'acquisition de quelques secondes.

L'évolution de la quatrième génération concerne le capteur. Les détecteurs sont disposés en couronne sur le pourtour de l'appareil (Figure 2.2 (d)). Seule la source de rayons X est en mouvement de rotation, ce qui facilite une vitesse de rotation plus élevée et donc une diminution du temps d'acquisition.

Il existe un type de scanner médical pour lequel aucune pièce n'est en mouvement : "Electron Beam CT" [Peschmann et al., 1985] [Boyd and Lipton, 1983]. La source de rayons X est remplacée par un système qui émet un faisceau d'électron très intense vers une large anode stationnaire qui entoure le patient (Figure 2.3). Les rayons X sont émis à partir de l'endroit où les électrons viennent frapper la cible autour du patient. La trajectoire du faisceau d'électrons est contrôlée par des champs magnétiques (comme dans un tube cathodique), ce qui permet des temps d'acquisition très rapides (33 ms pour le GE EBT eSpeed). Ce type de scanner, qui correspond à une cinquième génération, n'est plus développé actuellement.

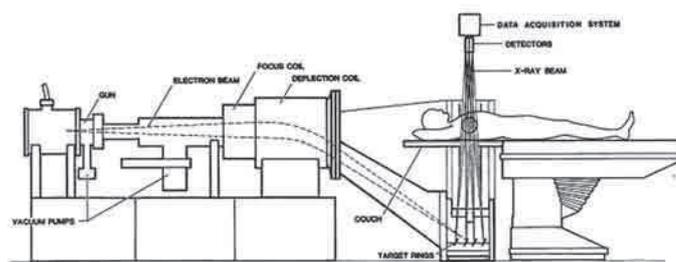


FIGURE 2.3 – Schéma d'un "Electron Beam CT"

2.2.2 Différentes configurations d'acquisition

Il existe principalement deux configurations d'acquisition pour les tomographes. Pour la première, l'objet reste fixe durant l'acquisition. L'ensemble composé de la source X et du détecteur est mis en mouvement de rotation autour de l'objet (Figure 2.4 A). Dans ce type de configuration, la distance entre la source et le détecteur reste fixe. La résolution du système dépend alors principalement de la taille et de

l'écartement des pixels, de la taille de la matrice du détecteur et de la taille du point focal de la source X. Cette configuration est celle des scanner médicaux (CT) et de la grande majorité des micro-CT dédiés à l'imagerie *in vivo*.

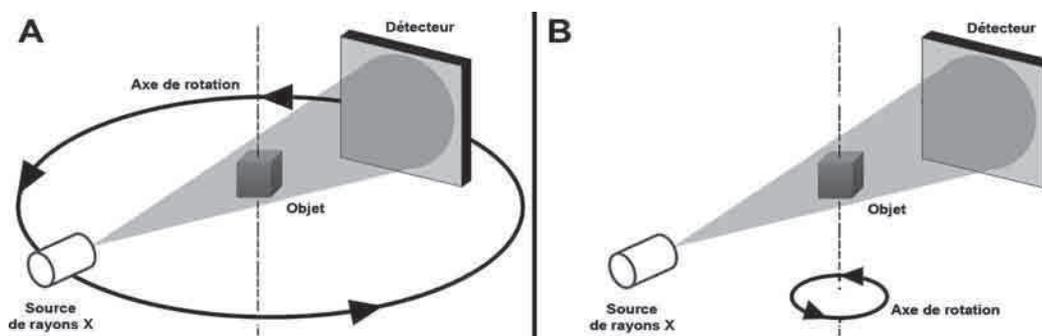


FIGURE 2.4 – Illustration des deux principales configurations d'acquisition des tomographes

Dans la seconde configuration, l'objet est mis en mouvement de rotation et l'ensemble source/détecteur reste fixe durant l'acquisition (Figure 2.4 B). La position de l'objet est la plupart du temps ajustable le long de la distance entre la source et le détecteur permettant une magnification variable. Plus l'échantillon se rapproche de la source, plus la résolution de l'image augmente puisque la projection de l'objet sur le détecteur est plus grande. Cette configuration à géométrie variable est utilisée principalement dans les tomographes *ex vivo*. Certains appareils permettent d'optimiser l'utilisation du faisceau en ajustant en plus la position du détecteur (par exemple le micro-CT Skyscan 1172). Le positionnement du détecteur et de l'objet permet d'utiliser la totalité de l'angle solide d'émission des photons X (qui est donné par la collimation et qui reste fixe) depuis la source pour la création de l'image, permettant ainsi de réduire le temps d'acquisition (Figure 2.5).

2.2.3 Différentes géométries de faisceau

Trois types de géométrie de faisceau existent pour les tomographes. Les sources conventionnelles émettent un faisceau divergent. Lorsque celui-ci a une géométrie en éventail ("Fan Beam"), l'image de projection est 1D (Figure 2.6). Pour acquérir les données nécessaires à la reconstruction du volume 3D d'un objet, il faut combiner le mouvement de rotation avec un mouvement de translation. C'est le cas des scanner médicaux (CT) pour lesquels la trajectoire d'acquisition est en spirale [Kalender et al., 1990]. Lorsque le faisceau émis par la source a une géométrie conique ("Cone Beam") [Feldkamp et al., 1984], l'image de projection est 2D (Figure 2.6). L'acquisition est réalisée en 3D en une seule rotation sans déplacements en translation ou en spirale. La hauteur de la projection sur le capteur définit la hauteur du volume 3D reconstruit. Si la projection de l'échantillon est plus grande en hauteur que le capteur, il est possible de réaliser l'acquisition de son volume complet avec des acquisitions supplémentaires réalisées après un déplacement vertical de

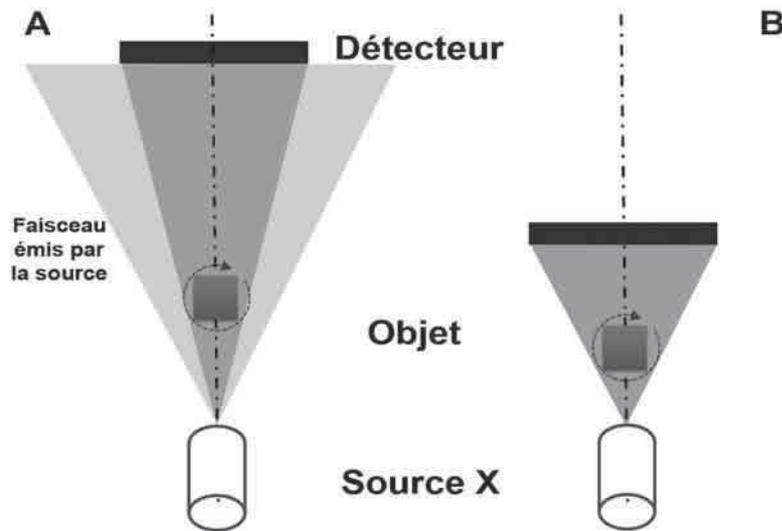


FIGURE 2.5 – Illustration géométrique de la modification de la distance entre la source et le détecteur. Contrairement au cas A, dans le cas B la totalité du faisceau est utilisée pour la création de l'image

l'objet.

Le faisceau à géométrie parallèle (Figure 2.6) nécessite une source de rayons X permettant d'obtenir un faisceau suffisamment large et homogène de photons X dont la trajectoire est parallèle. Une source conventionnelle ne permet pas de produire un tel faisceau. La géométrie parallèle est obtenue grâce à un synchrotron. Dans de tels systèmes, aucune magnification n'est possible puisque le faisceau n'est pas divergent. La résolution est donnée directement par la résolution de l'optique d'acquisition.

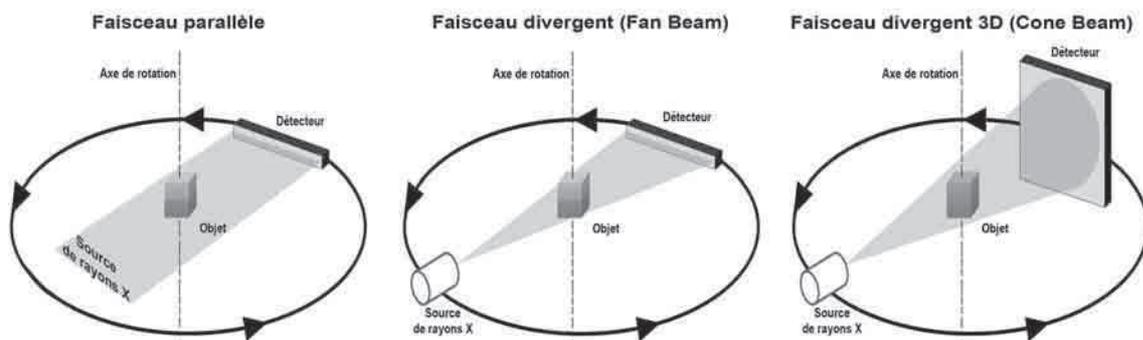


FIGURE 2.6 – Les trois types de géométries d'acquisitions : parallèle, "fan beam" et "cone beam"

2.3 Le rayonnement électromagnétique

C'est en 1895 que le physicien allemand Wilhelm Röntgen découvrit un rayonnement aux propriétés jusqu'alors inconnues, qu'il nomma rayons X (Figure 2.7).

Ses travaux [Rontgen, 1895], récompensés par le premier prix Nobel de physique, sont à l'origine du radiodiagnostic, spécialité médicale utilisant l'imagerie comme outil de diagnostic médical.

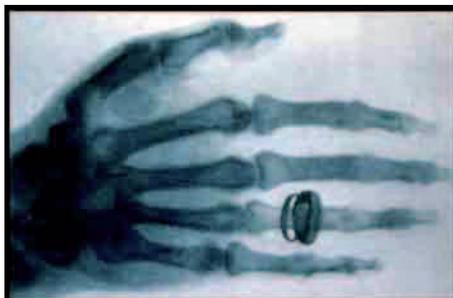


FIGURE 2.7 – Illustration de la première image radiographique obtenue avec la main de Mme Rontgen

Les rayons X sont une forme de rayonnement électromagnétique au même titre que la lumière visible par l'oeil humain mais de longueurs d'onde différentes (Figure 2.8). Les rayons X ont une longueur comprise entre 5 picomètres et 10 nanomètres alors que le spectre du visible se situe entre 380 nanomètres et 780 nanomètres. L'énergie des photons, exprimée en électron-Volt (eV), est inversement proportionnelle à leur longueur d'onde (Equation 2.1).

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.1)$$

Pour les longueurs d'onde inférieures à 248 nanomètres, les rayonnements sont considérés comme ionisants et donc susceptibles d'altérer ou d'endommager les tissus biologiques. Les rayons X comme les rayonnements ultra violet et gamma sont des rayonnements ionisants.

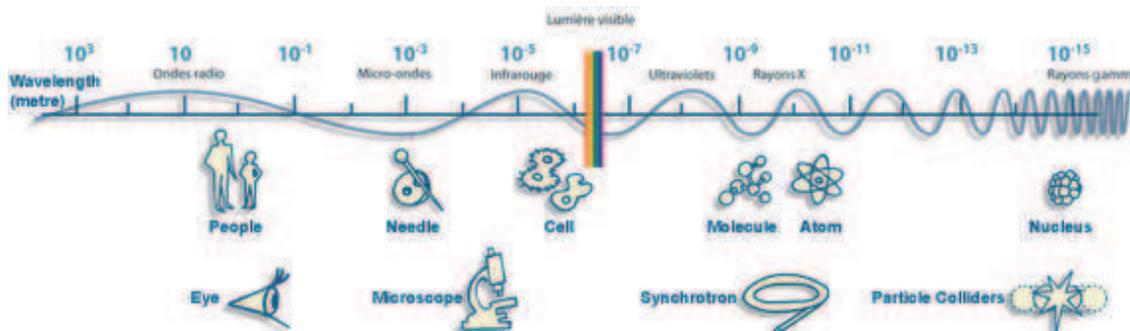


FIGURE 2.8 – Ondes électromagnétiques.

2.3.1 Production des rayons X

La production des rayons peut être obtenue selon deux principes :

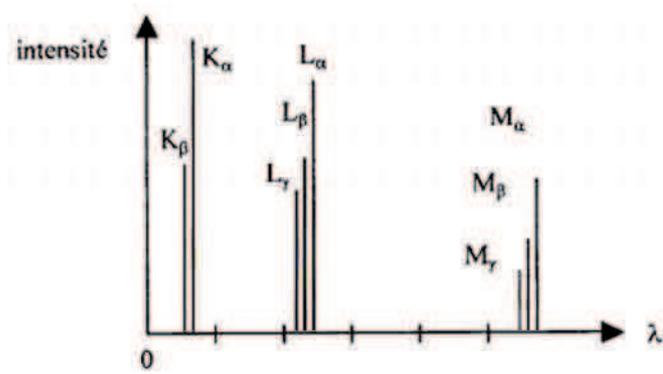


FIGURE 2.9 – Illustration du spectre du faisceau d’une source X qui serait constitué uniquement des émissions de raies

1. Par des changements d’orbite des couches électroniques : des rayons X de fluorescence sont émis par des transitions électroniques faisant intervenir les couches internes, proches du noyau. Ces transitions électroniques peuvent être indirectement provoquées par des rayons X ou bien par un bombardement d’électrons. Le spectre caractéristique de cette émission est appelé spectre de raies (Figure 2.9). Les raies d’émission (K_{α} , K_{β} , ...) dépendent directement des couches d’arrivées des électrons au cours du réarrangement.
2. Par accélération d’électrons : freinage ou changement de trajectoire
 - Freinage des électrons sur une cible : au voisinage du noyau d’un atome, la force attractive d’origine électrostatique modifie la trajectoire et l’énergie cinétique de l’électron incident. Lors de la diminution de l’énergie cinétique de l’électron, un photon est émis (2.10) : c’est le rayonnement de freinage (Bremsstrahlung). L’énergie des photons émis dépend de la distance entre le noyau et l’électron, puisque celle ci définit la force de l’interaction et influe sur la courbure de la trajectoire. Toutes les distances étant possibles, théoriquement toutes les énergies sont possibles. Dans la pratique, une partie du rayonnement est absorbé dans les basses énergies.

Le spectre émis est appelé spectre continu de freinage (Figure 2.11).

- Changement de trajectoire : la courbure de la trajectoire des électrons dans un accélérateur de particule émet un rayonnement "synchrotron".

2.3.2 La source de rayons X

Les sources dites classiques, que l’on utilise par exemple en imagerie médicale, sont composées d’un tube à rayons X et d’une alimentation. Le tube à rayons X est une enceinte sous vide constituée d’une anode et d’une cathode. Un faisceau d’électrons, obtenu depuis la cathode (souvent en tungstène) chauffée par un courant électrique, est accéléré vers une anode par une différence de potentiel de quelques dizaines de kilo-volts. Lors du bombardement des électrons sur l’anode, une partie de leur énergie cinétique est transformée en photons X par le rayonnement continu de

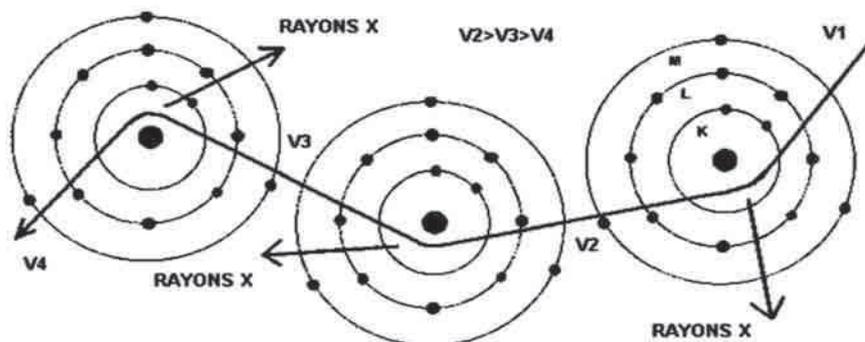


FIGURE 2.10 – Production du rayonnement X de freinage

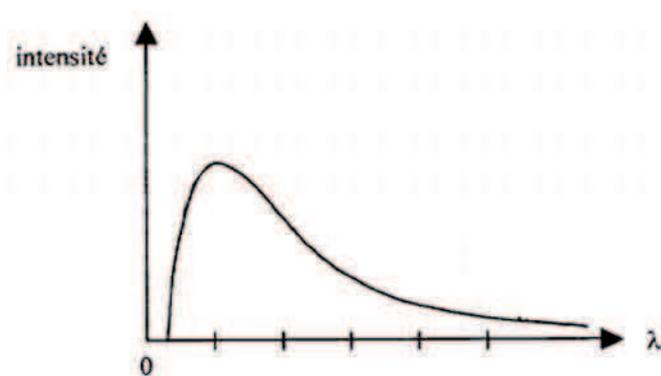


FIGURE 2.11 – Spectre continu de freinage

freinage. Si les électrons sont suffisamment énergétiques, des photons de fluorescence produisent un rayonnement avec un spectre de raies. Le spectre d'émission de la source est donc formé d'un spectre continu de freinage et d'un spectre de raies (Figure 2.12).

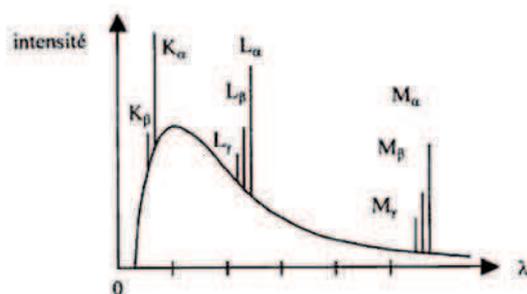


FIGURE 2.12 – Spectre d'émission des rayons X : somme du spectre de raies et du spectre du rayonnement continu de freinage

Le faisceau de photons X est émis soit par transmission à travers une cible (souvent en tungsten) soit par réflexion. La figure 2.13 illustre ces deux types de sources.

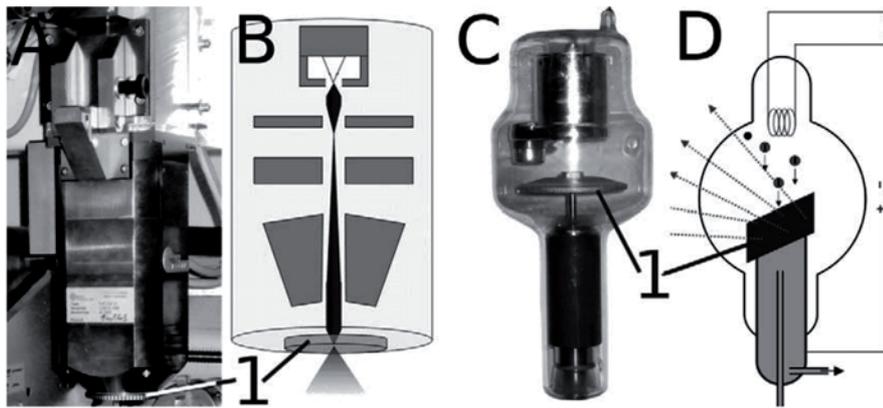


FIGURE 2.13 – Exemples de tubes à rayons X par transmission (A) et par réflexion (C). Illustration du fonctionnement du tube à transmission (B) et à réflexion (D) (Illustration modifiée à partir de [Schambach et al., 2010])

Deux paramètres permettent de régler une source à rayons X lors d'une acquisition : la tension et le courant. La tension, exprimée en kilo-Volt (kV) désigne la tension d'accélération auxquels sont soumis les électrons. Le courant est celui acquis par le faisceau d'électrons (il faut faire la distinction avec le courant parcourant la cathode). Une modification de la tension permet de changer la distribution en énergie des photons à la fois sur le spectre continu de freinage et sur le spectre de raies (Figure 2.14). La modification du courant a pour incidence une variation de la quantité de photons du faisceau.

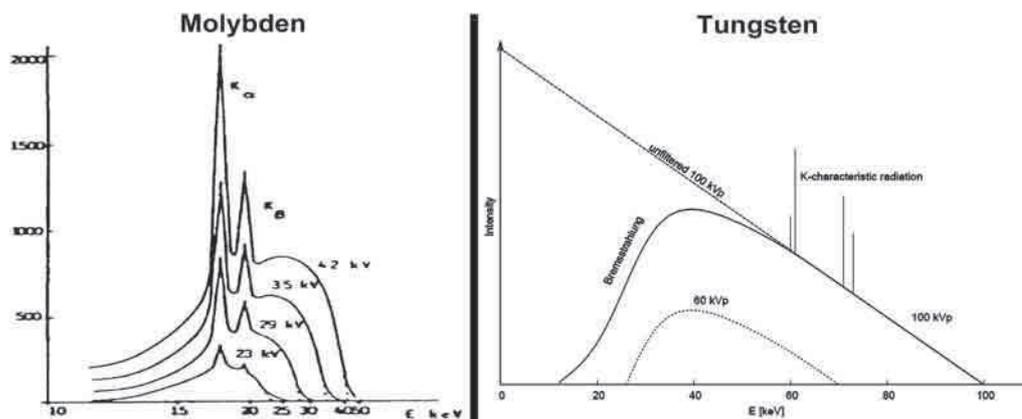


FIGURE 2.14 – Exemples de spectres obtenus avec une cible en molybden et en tungsten

2.3.3 Interaction des rayons X avec la matière

L'interaction des photons X avec la matière est à la base de la création du contraste dans les images radiologiques. Il existe quatre modes d'interaction : la diffusion de Thomson-Rayleigh, la diffusion Compton, l'effet photo-électrique et la création de paires électron/positon.

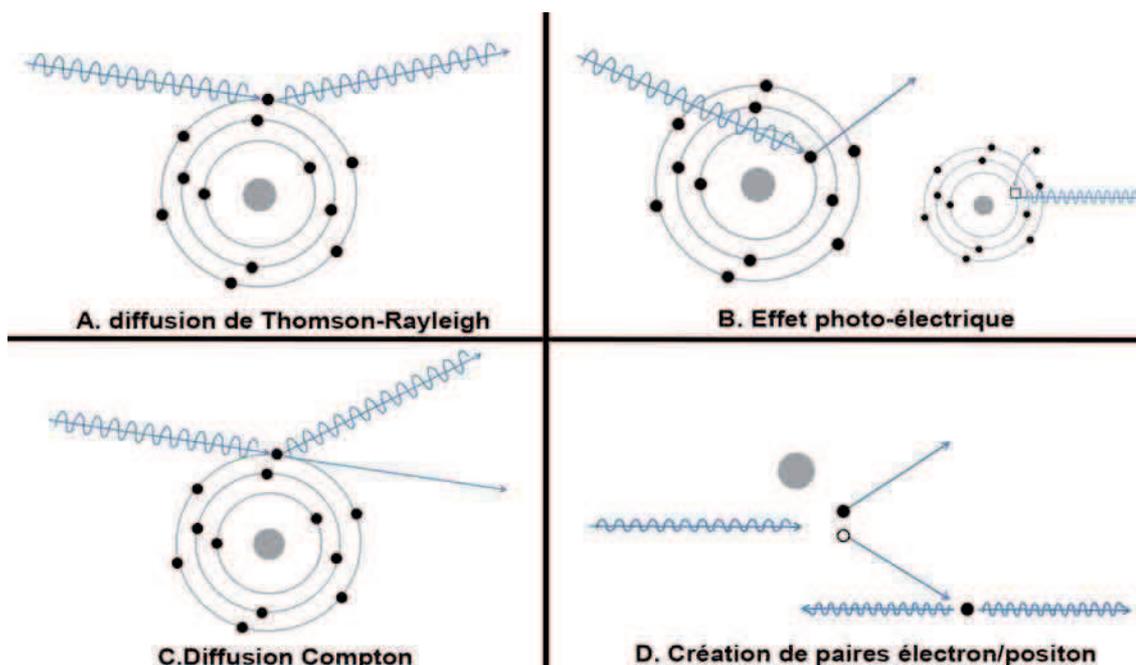


FIGURE 2.15 – Interactions des photons avec la matière

2.3.3.1 La diffusion de Thomson-Rayleigh

Lors de l'interaction d'un photon incident avec un atome, le photon qui n'a pas suffisamment d'énergie pour arracher un électron, est diffusé avec la même énergie mais dans une direction différente (Figure 2.15 A). Cette interaction a pour incidence de créer un flou dans les images radiologiques. Elle n'est pas ionisante car il n'y a pas d'échange d'énergie entre le photon incident et la matière.

2.3.3.2 L'effet photo-électrique

L'intégralité de l'énergie du photon incident E_i est transférée à un électron, le photoélectron (Figure 2.15 B). Cet électron est alors éjecté de son orbitale avec une énergie cinétique E_c égale à l'énergie du photon incident diminuée de l'énergie de liaison E_l de l'électron dans sa couche.

$$E_c = E_i - E_l \quad (2.2)$$

Le réarrangement électronique pour combler le trou laissé par le photoélectron expulsé peut conduire à l'émission d'un photons X de fluorescence ou d'électrons Auger si les photons incidents ont des très hautes énergies (ce n'est pas le cas en imagerie X). Dans les longueurs d'ondes utilisées couramment en radiologie, l'effet photoélectrique se caractérise par une absorption totale du photon incident. C'est cet effet qui permet d'obtenir une atténuation linéique du faisceau de rayons X.

2.3.3.3 La diffusion Compton

Une partie de l'énergie du photon incident est transmise sous forme d'énergie cinétique à un électron qui est expulsé. Le reste de l'énergie provoque l'émission

d'un nouveau photon dont l'énergie et la direction sont différentes du photon incident (Figure 2.15 C). Cette interaction ionisante participe au flou dans les images radiologiques. Dans les tissus biologiques, l'effet Compton prédomine pour des hautes énergies de photons X (à partir de 50 keV).

2.3.3.4 La création de paires électron/positon

Ce phénomène intervient avec des photons de très haute énergie (à partir de 1.05MeV). Au voisinage d'un noyau, la disparition complète du photon incident matérialise une paire électron/positon. Le positon émis va ensuite s'annihiler avec un électron (Figure 2.15 D). Cette dématérialisation est caractérisée par l'émission de deux photons de 511KeV dans des directions strictement opposées.

2.3.3.5 Prédominance des interactions

En fonction du matériau, en particulier des couches électroniques, et de l'énergie du photon X, on peut définir quelle sera l'interaction prédominante.

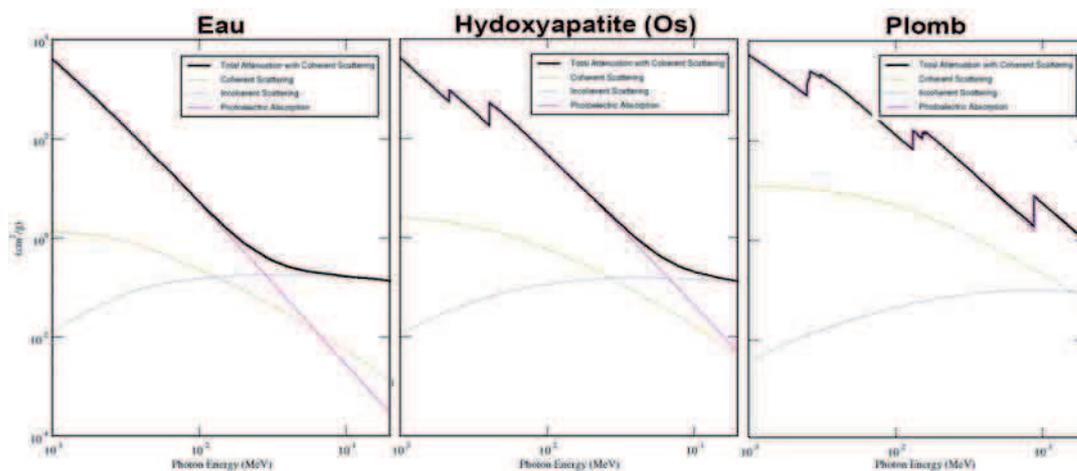


FIGURE 2.16 – Prédominances des effets d'interaction des photons X avec l'eau, l'hydroxyapatite (Os) et le plomb. Tables modifiées à partir des données disponible sur le site "physics.nist.gov/PhysRefData/Xcom/html/xcom1.html"

Les courbes illustrées sur la Figure 2.16 montrent la variation de l'atténuation en fonction de l'énergie des photons. On remarque que l'atténuation globale du Plomb est plus importante de celle de l'eau. Les "hachures" visibles sur l'atténuation globale et l'absorption photoélectrique illustrent pour le Plomb et l'Os les valeurs de K-edge (raies caractéristiques).

2.3.4 Filtrage du faisceau

L'interaction privilégiée pour la création de l'image radiologique est l'effet photoélectrique qui ne change pas la direction des photons du faisceau X. Les conditions

d'acquisition sont choisies dans le but de minimiser les autres interactions qui introduisent un flou par le changement d'orientation des photons et qui provoquent une irradiation inutile.

Le filtrage du faisceau X permet de modifier le spectre d'émission et ainsi de favoriser l'interaction photoélectrique. L'aluminium est un exemple de filtre couramment employé. En plaçant un matériau devant la source, des interactions entre photons et matière vont se produire avec le filtre. Le faisceau transmis par le filtre est alors globalement atténué et les photons de basses énergies vont disparaître lors des interactions (Figure 2.17).

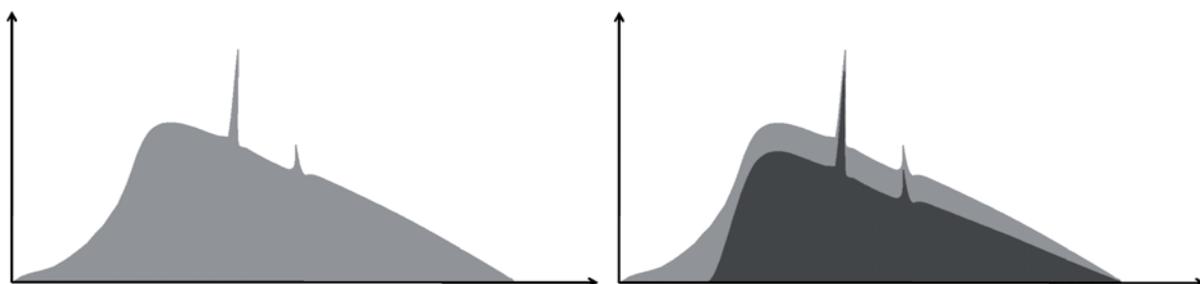


FIGURE 2.17 – Effet du filtrage sur le spectre d'un faisceau polychromatique : spectre avant filtrage à gauche, après filtrage à droite le spectre est globalement atténué et les basses énergies ont été supprimées

2.4 Détection des rayons X et formation de l'image radiologique

2.4.1 Le détecteur

Le détecteur convertit le signal électromagnétique en signal électrique. En imagerie médicale, les détecteurs de rayons X sont constitués d'un capteurs de type CCD ou CMOS et d'un convertisseur de photons X en photons du visible, le scintillateur. Il existe aussi des capteurs qui intègrent directement des photons X, tels les capteurs à base de selenium amorphe.

2.4.2 Atténuation et formation de l'image radiographique

Lors des interactions avec la matière, les particules chargées cèdent leur énergie progressivement. A l'inverse, le rayonnement électromagnétique, comme les rayons X, disparaît brutalement à la suite d'une interaction. Il n'y a donc pas d'atténuation en énergie des photons X. L'atténuation des rayons X dans la matière est une atténuation en nombre. La figure 2.18 illustre l'interaction d'un faisceau de rayons X monochromatique avec un objet dont le coefficient est homogène.

On utilise l'intensité pour décrire le nombre de rayons d'un faisceau. Dans le cas d'un faisceau de rayons X monochromatique et parallèle, le nombre de rayons X

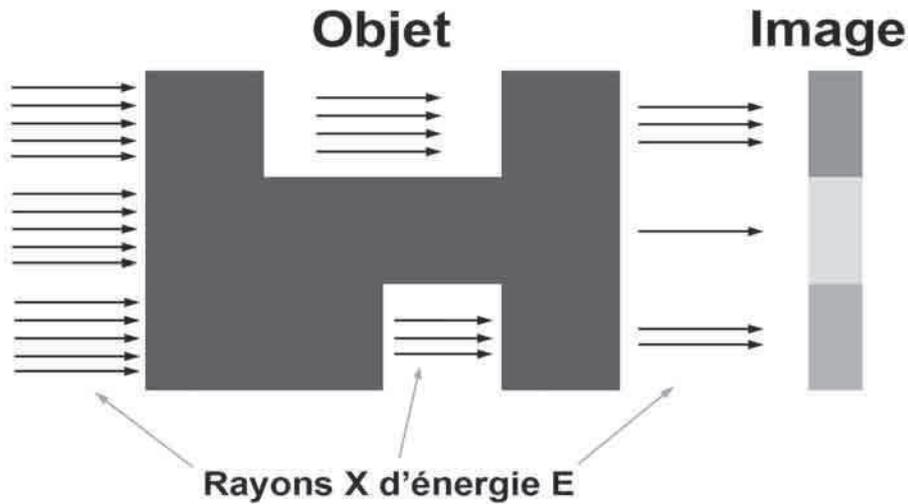


FIGURE 2.18 – Exemple d'atténuation en nombre des rayons X dans un matériau homogène et formation d'une image

n'ayant subi aucune interaction dans un matériau d'épaisseur L est lié au nombre de rayons X incidents par la relation suivante :

$$N = N_0 e^{-\mu_g L} \quad (2.3)$$

En considérant l'intensité du faisceau on obtient l'équation suivante :

$$I = I_0 e^{-\mu_g L} \quad (2.4)$$

Le coefficient d'atténuation linéique global du matériau μ_g dépend de l'énergie des photons incidents et de la nature du matériau. Il représente la somme des atténuations des différentes interactions possibles :

$$\mu_g = \mu_{rayleigh} + \mu_{compton} + \mu_{photoélectrique} + \mu_{créationdepaaires} \quad (2.5)$$

Si l'objet analysé est constitué de plusieurs matériaux, alors l'intensité du faisceau sortant est liée aux différentes atténuations des milieux rencontrés le long du trajet X . L'intensité du faisceau X est alors donnée par la loi de Beer-Lambert (Equation 2.6).

$$I = I_0 e^{-\int_X \mu_x dx} \quad (2.6)$$

Les sources conventionnelles utilisées en imagerie médicale produisent un faisceau X polychromatique. Le coefficient d'atténuation est alors dépendant de l'énergie des photons, l'équation 2.6 devient :

$$I = \int_E I_0 e^{-\int_X \mu_x dx} dE \quad (2.7)$$

2.5 Reconstruction tomographique

La méthode de reconstruction tomographique la plus utilisée est basée sur la rétroprojection filtrée. La méthode FDK [Feldkamp et al., 1984] en est la généralisation en 3D pour un faisceau conique. C'est une méthode de reconstruction

analytique par opposition aux méthodes algébriques et statistiques qui sont résolues itérativement.

2.5.1 Modélisation du problème de reconstruction tomographique

La transformée de Radon est à la base des méthodes de reconstruction tomographique 2D. C'est un opérateur mathématique de projection proposé en 1917 par John Radon [Radon, 1917], dont l'expression pour une fonction à deux variables (assimilable à une image 2D) est donnée par la double intégrale de l'équation 2.8 suivante (voir Figure 2.19 pour l'illustration géométrique) :

$$p_f(\theta, t) = \int \int f(x, y) \delta(x \cos(\theta) + y \sin(\theta) - t) dx dy \quad (2.8)$$

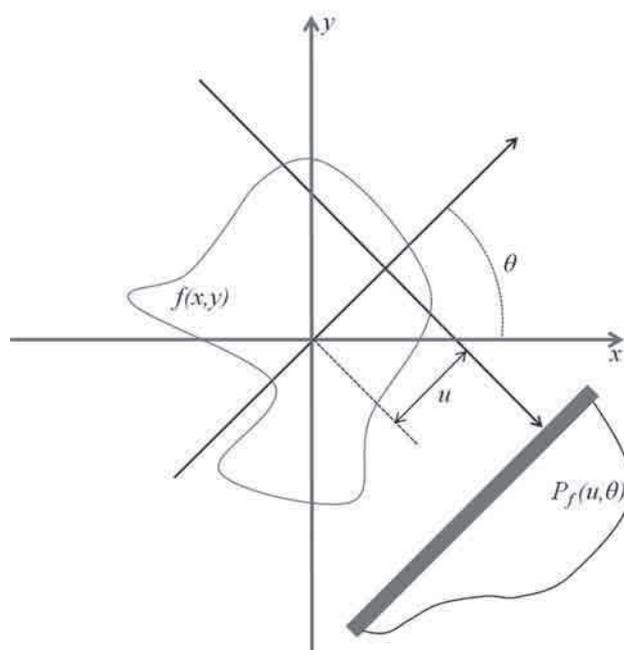


FIGURE 2.19 – Illustration de la projection de Radon dans le cas 2D

D'après le théorème coupe-projection (Fourier Slice Theorem), la transformée de Fourier 1D TF_{p_f} de la transformée de Radon d'une fonction f dans la direction θ est égale à la transformée de Fourier 2D TF_f de la fonction f le long de l'axe des fréquences ν_t perpendiculaire à la direction de la raie de projection définie par θ 2.9.

$$TF_{p_f}(\theta, \nu_t) = TF_f(\nu_t \cos \theta, \nu_t \sin \theta) \quad (2.9)$$

Ce théorème appliqué au cas d'une géométrie 2D avec un faisceau parallèle est illustré sur la Figure 2.20. La reconstruction de la fonction f est possible en utilisant une inversion de la transformée de Fourier mais elle nécessite une interpolation des données qui produit de nombreux artefacts [Natterer, 1985] [Magnusson et al., 1992]. Ce théorème n'est donc pas utilisé directement pour la reconstruction mais est à la base des méthodes de rétroprojection filtrée.

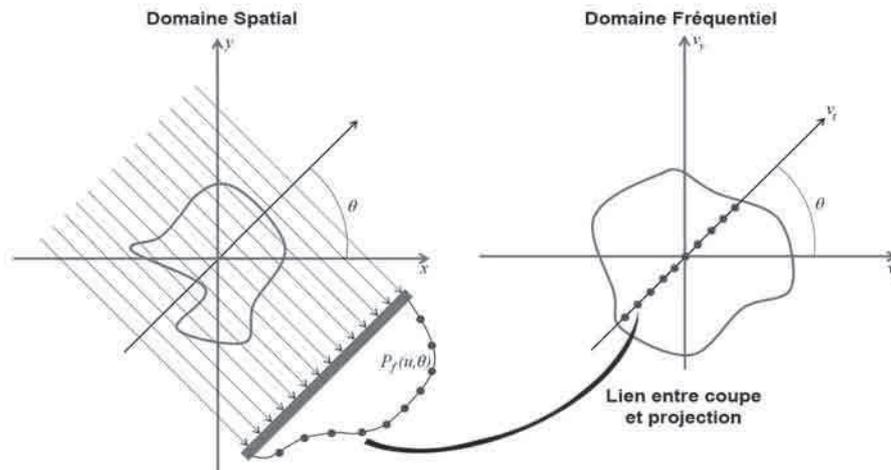


FIGURE 2.20 – Illustration du théorème coupe-projection suivant une incidence θ : la transformée de Fourier de la transformée de Radon de la fonction f dans la direction θ (à gauche) est égale à la coupe 1D dans la direction θ de la transformée de Fourier 2D de la fonction f (à droite)

2.5.2 Méthodes de reconstruction analytique

Dans le cas 2D avec une géométrie parallèle, en appliquant le théorème coupe-projection et en utilisant une transformée de Fourier inverse avec un changement de variable permettant de passer de coordonnées polaires en cartésiennes, on obtient la formule de la rétroprojection filtrée (Filtered Back Projection : FBP) décrite dans [Kak and SLANEY, 1987] :

$$f(x, y) = \frac{1}{2} \int_0^{2\pi} \int_{-u_{max}}^{+u_{max}} P(\theta, t) h(t' - t) dt d\theta \quad (2.10)$$

Avec $t' = -x\cos(\theta) - y\sin(\theta)$ et $h(t)$ le filtre rampe obtenue par la transformée de Fourier inverse d'une rampe donnée (2.11) :

$$h(t) = \int_{-\infty}^{\infty} |\nu_t| \exp 2i\pi t \nu_t d\nu_t \quad (2.11)$$

La majorité des systèmes de tomographie utilisent des sources de rayons X dont le faisceau est divergent. La géométrie avec un faisceau parallèle est très rare, elle est possible en synchrotron mais nécessite que la distance entre la source et l'objet soit considérée comme infinie. La méthode de reconstruction doit être adaptée. Dans le cas d'une géométrie avec un faisceau divergent ("Fan Beam") et d'un détecteur plan, la formule de rétroprojection est modifiée par l'introduction de facteurs correctifs pour la prise en compte de la divergence du faisceau X. Cette formule est exprimée par l'équation 2.12 (voir Figure 2.21 pour illustration géométrique). Une démonstration de ce résultat est donnée dans la thèse de Solène Valton [Valton, 2007].

$$f(x, y) = \frac{1}{2} \int_0^{2\pi} \frac{1}{U^2} \int_{-u_{max}}^{+u_{max}} P(\theta, u) h(u' - u) \frac{R_s}{\sqrt{R_s^2 + u^2}} du d\theta \quad (2.12)$$

Dans cette équation $P(\theta, u)$ est une projection divergente, $u' = \frac{tR_s}{R_s - s}$ donne la coordonnée du rayon passant par le point de coordonnées (x, y) , R_s est la distance entre

la source et l'origine O , U représente le rapport entre la distance source-projection orthogonale du point (x, y) sur le rayon central OS et la distance R_s .

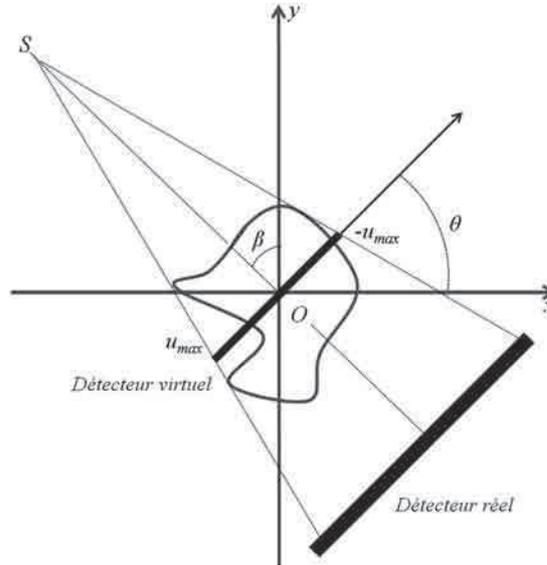


FIGURE 2.21 – Géométrie divergente

Cette méthode permet de reconstruire les données dont la projection est 1D. Si la projection est 2D, la reconstruction est également possible mais implique de considérer la projection comme une pile de projection 1D. Dans le cas le plus courant en tomographie X, cette méthode n'est pas utilisée car l'acquisition des données 3D met en oeuvre des projections coniques. La méthode de Feldkamp, David et Kress (FDK) [Feldkamp et al., 1984] permet la reconstruction tomographique 3D à partir des projections coniques sur un détecteur 2D. Cette méthode, qui est une extension de la formule de rétroprojection filtrée, est la plus utilisée en géométrie d'acquisition circulaire. La formule FDK utilisée pour la reconstruction de la fonction f 3D est la suivante :

$$f(x, y, z) \cong \frac{1}{2} \int_0^{2\pi} \frac{1}{U''^2} \int_{-u_{max}}^{+u_{max}} P(\theta, u, v) h(u' - u) \frac{R_s}{\sqrt{R_s''^2 + u^2 + v^2}} dud\theta \quad (2.13)$$

Avec $R_s''^2 = R_s^2 + v^2$.

2.5.3 Méthodes de reconstruction itératives

Les méthodes itératives regroupent les méthodes pour lesquelles le problème de reconstruction tomographique est directement exprimé sous une forme discrétisée et consiste alors à la résolution d'un système matriciel de grande taille. Ce sont des méthodes itératives puisque l'inversion du système d'équations s'effectue de manière itérative.

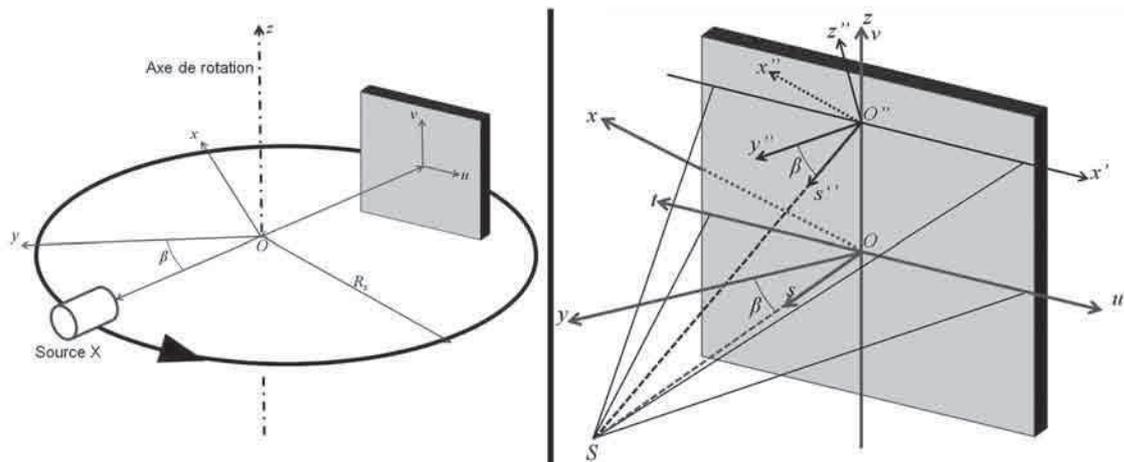


FIGURE 2.22 – Illustration de la géométrie en reconstruction Cone Beam

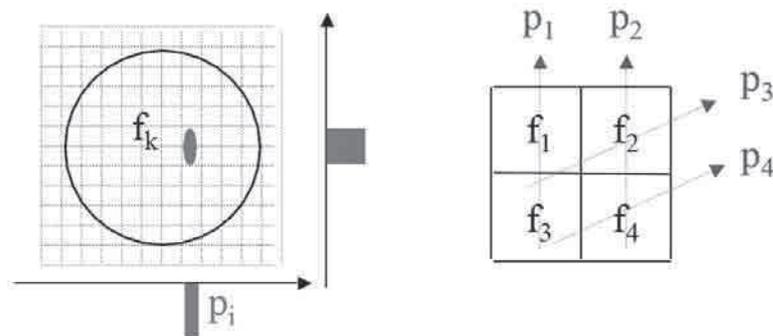


FIGURE 2.23 – Projections P_i de la fonction f dans le cas 2D

Dans le cas 2D illustré sur la Figure 2.23, en considérant la fonction f et ses projections P_i , le système d'équations à inverser est le suivant (Figure 2.24) :

$$\begin{bmatrix} p_1 \\ p_2 \\ p_3 \\ p_4 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} r_{11} & r_{12} & r_{13} & r_{14} \\ r_{21} & r_{22} & r_{23} & r_{24} \\ r_{31} & r_{32} & r_{33} & r_{34} \\ r_{41} & r_{42} & r_{43} & r_{44} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} f_1 \\ f_2 \\ f_3 \\ f_4 \end{bmatrix}$$

$$\begin{aligned} p_1 &= r_{11} f_1 + r_{12} f_2 + r_{13} f_3 + r_{14} f_4 \\ p_2 &= r_{21} f_1 + r_{22} f_2 + r_{23} f_3 + r_{24} f_4 \\ p_3 &= r_{31} f_1 + r_{32} f_2 + r_{33} f_3 + r_{34} f_4 \\ p_4 &= r_{41} f_1 + r_{42} f_2 + r_{43} f_3 + r_{44} f_4 \end{aligned}$$

FIGURE 2.24 – Système d'équations à inverser pour la résolution du problème de reconstruction tomographique

Par exemple, dans le cas d'une acquisition réalisée avec 128 projections sur un détecteur de 128 pixels de large, le système à résoudre pour le calcul d'une seule coupe est composé de $128 \times 128 = 16384$ équations avec autant d'inconnues.

Il existe deux classes de méthode itératives : algébriques et statistiques. Les méthodes algébriques consistent à résoudre itérativement un système d'équations li-

néaires (méthodes ART, SIRT, ILST, gradient conjugué). Les méthodes statistiques prennent en compte un modèle de bruit des données, elles sont résolues en maximisant une fonction de vraisemblance (méthodes MLEM, OSEM, RAMLA, DRAMA).

Ces méthodes présentent l'avantage de pouvoir reconstruire les données avec un nombre de projections plus faible ou avec des données manquantes. Elles sont par contre coûteuses en ressources de calcul. C'est pourquoi ces méthodes n'ont été intégrées que très récemment sur certains appareils commerciaux (notamment grâce à l'utilisation de calcul scientifique sur GPU).

2.6 Caractéristiques des données

2.6.1 Données volumiques

La reconstruction tomographique permet d'obtenir des coupes perpendiculaires à l'axe de rotation. Le volume de données 3D (Figure 2.25 C) représentant l'image de l'objet analysé est formé par l'empilement (Figure 2.25 B) de ces coupes 2d en niveaux de gris (Figure 2.25 A). Chaque coupe a une épaisseur qui correspond à la distance avec la coupe suivante. Les éléments de l'image 2D sont dans ce cas considérés en 3D et sont appelés des voxels.

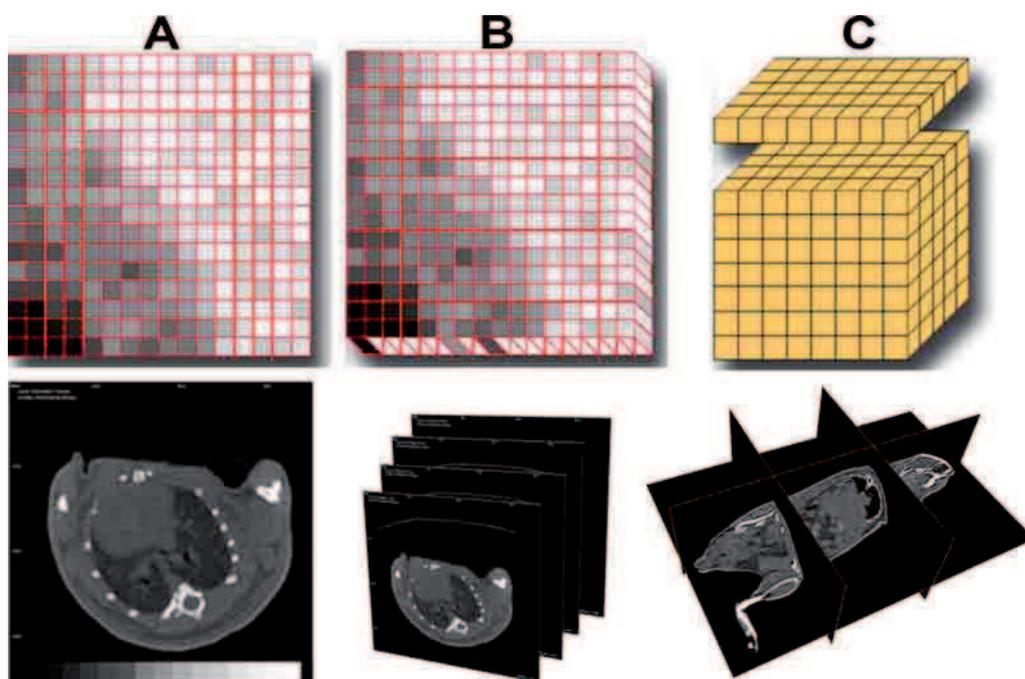


FIGURE 2.25 – Illustration de la structure des données obtenues en tomographie

2.6.2 Unités Hounsfield

L'information reconstruite par tomographie X est le coefficient d'atténuation linéique local qui est une fonction de l'énergie des photons. Un même objet analysé avec des faisceau X dont les spectres en énergie sont différents donnera deux images

avec des distributions d'atténuation différentes. Pour cette raison, la comparaison entre deux analyses tomographiques nécessite une normalisation de ces coefficients d'atténuation.

L'échelle de Hounsfield permet la normalisation des résultats de la reconstruction. Selon cette échelle dont l'unité est notée HU (Hounsfield Unit), l'air, l'eau et les tissus minéralisés ont des valeurs respectives de -1000 HU, 0 HU et 1000 HU. Ces valeurs sont obtenues à partir du coefficient d'atténuation de l'eau μ_{eau} par la relation suivante :

$$HU = \frac{\mu_{local} - \mu_{eau}}{\mu_{eau} - \mu_{air}} \quad (2.14)$$

Le scanner médical (CT) fournit des images exprimées en HU. Les valeurs Hounsfield moyennes pour les différents tissus du corps humains sont illustrées dans la Figure 2.26.

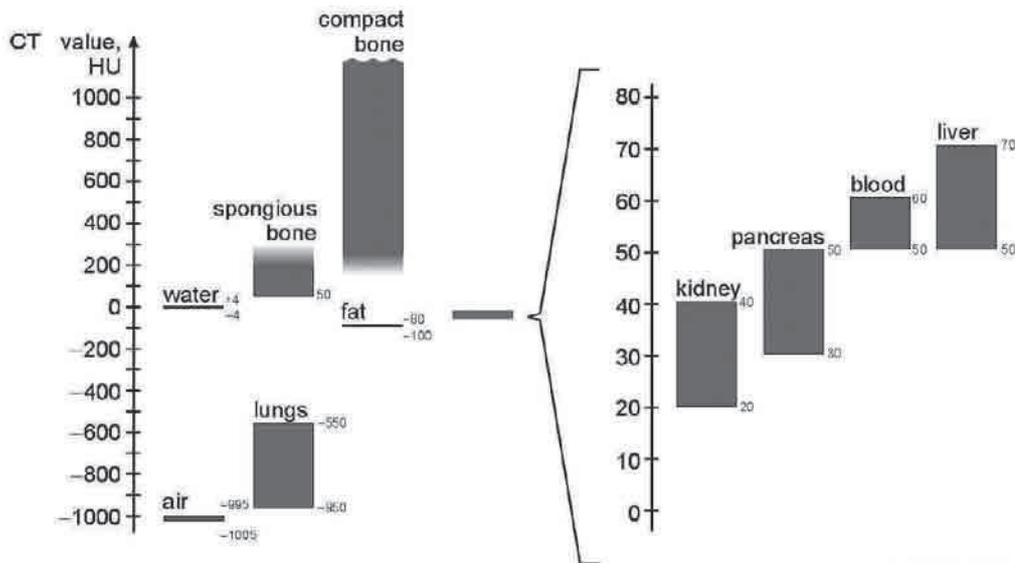


FIGURE 2.26 – Répartition des tissus du corps humains selon l'échelle de Hounsfield [Kalender, 2006]

2.7 Paramètres caractéristiques d'un tomographe

2.7.1 Résolution spatiale

La résolution spatiale décrit la capacité du système d'imagerie à résoudre de fines structures. Elle se distingue de la résolution des images donnée par la taille des pixels (ou voxels). On peut par exemple obtenir des images dont la résolution (taille des voxels) est de $100\mu m$ alors que la résolution spatiale du système est seulement de $300\mu m$.

La résolution spatiale du système dépend du détecteur, de la précision mécanique

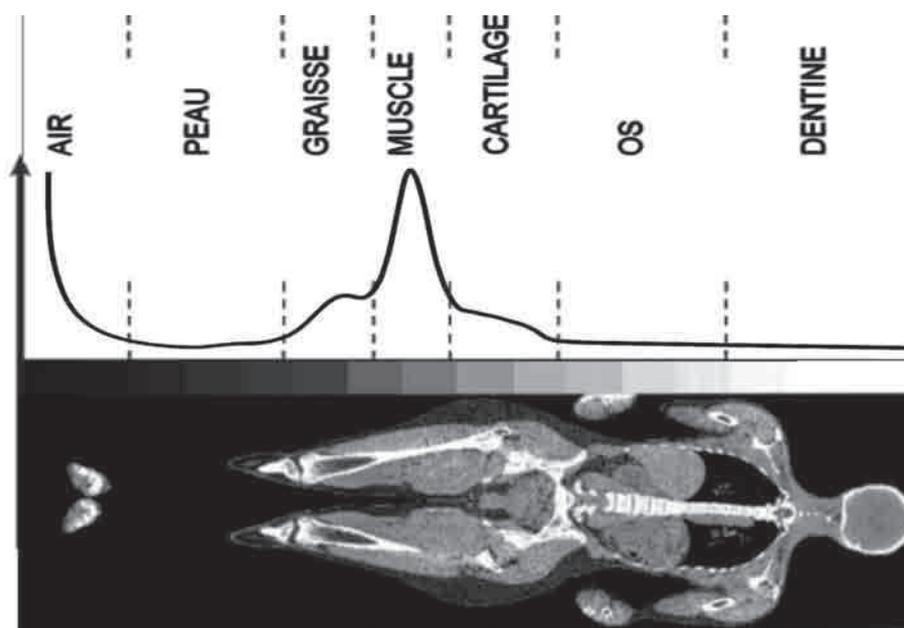


FIGURE 2.27 – Exemple de courbe Housfield "type" d'un humain montrant la répartition des tissus du corps et les valeurs de niveaux de gris correspondantes sur une coupe tomographique

des actionneurs et de la source X. Par exemple, la taille du point focal est un facteur limitant pour la résolution. Aucun détail plus petit que ce diamètre ne peut être résolu dans les images [Badea et al., 2008].

Plusieurs méthodes existent pour déterminer la résolution spatiale. La première consiste à étudier l'image d'une mire de test et d'identifier le plus petit détail visible. La seconde méthode est basée sur l'étude de la fonction de transfert de modulation ("Modulation Transfer Function" : MTF). L'analyse de la résolution à partir de la MTF est donnée par la méthode de dispersion ponctuelle (FDP-PSF) [Judy, 1976] ou la méthode de la réponse à un bord ("Edge Spread Function" : ESF) ou à partir de l'image d'une mire [Fujita et al., 1992] [Boone, 2001]. Elle s'exprime en paires de lignes par *mm*.

Une mesure de la résolution spatiale effectuée par le constructeur est indiqué dans les données techniques de chaque scanner. On peut également retrouver cette valeur dans des rapports effectués par des agences de contrôle sur les différents CT (par exemple www.impactscan.org).

2.7.2 Bruit

Dans une coupe tomographique d'un matériau homogène, les valeurs de coefficient d'atténuation calculées varient autour d'une valeur moyenne. La dispersion de ces valeurs dépend de plusieurs phénomènes :

- un bruit statistique directement lié au principe physique d'acquisition : le nombre de photons arrivant sur le détecteur est décrit comme une variable aléatoire suivant une loi de Poisson [Snyder et al., 1987]

- un bruit électronique introduit par les détecteurs
- un bruit mathématique lié au calcul de reconstruction tomographique

L'impact sur une image reconstruite du bruit statistique a été étudié dans différents travaux [Barrett et al., 1976] [Riederer et al., 1978] [Garnero, 1981]. Dans le cas d'un disque homogène de diamètre D et de coefficient d'atténuation μ dont la coupe tomographique est reconstruite par la méthode de la rétroprojection filtrée, le rapport signal sur bruit σ induit par le bruit statistique est donné par la formule 2.15 [Garnero, 1981].

$$\gamma = \mu D \exp(-\mu D/2) \frac{\sqrt{N_0}}{n^{3/4}} \quad (2.15)$$

Avec N_0 le nombre de photons détectés et n le nombre total de pixel dans l'image.

Cette relation permet d'établir que pour une résolution spatiale donnée, la résolution en densité varie comme la racine carrée de l'irradiation, donc lentement. Dans le cas d'un rapport signal sur bruit constant, une augmentation de la résolution spatiale implique que la dose augmente d'un facteur $n^{3/2}$. La dose est donc proportionnelle à l'inverse de la résolution de la résolution spatiale à la puissance 3

Dans les images, le bruit peut être évalué à partir de mesures des valeurs de niveaux de gris dans des zones correspondant à des matériaux homogènes. Avec un fantôme, objet constitué d'un seul matériau homogène, le bruit est évalué selon la formule 2.16 :

$$\sigma = \frac{\sum_i (I_i - \mu)^2}{n - 1} \quad (2.16)$$

Avec μ la moyenne des valeurs sur la zone considérée.

Afin de pouvoir comparer différents appareils, il est nécessaire de normaliser cette mesure. On exprime le bruit normalisée B en utilisant la valeur d'atténuation de l'air comme indiqué par la formule 2.17.

$$B = \frac{\sigma_{fantôme}}{\mu_{fantôme} - \mu_{air}} \times 100 \quad (2.17)$$

2.7.3 Contraste

Le contraste représente la variation des valeurs de coefficient d'atténuation en fonction des matériaux, il permet de décrire la capacité d'un système à différencier les tissus. Afin de comparer plusieurs systèmes d'imagerie dont les valeurs de niveaux de gris ne sont pas sur la même échelle, nous pouvons utiliser une valeur de contraste C normalisée par rapport aux coefficients d'atténuation de l'air et de l'eau. L'équation ?? illustre cette mesure de contraste entre la graisse et l'eau.

$$C_{Graisse/Eau} = \frac{|\mu_{eau} - \mu_{graisse}|}{\mu_{eau} - \mu_{air}} \quad (2.18)$$

Afin de prendre en considérations le bruit dans l'évaluation du contraste, on peut utiliser le paramètre de CNR ("Contrast to Noise Ratio") [Taschereau et al., 2010]

[Cao et al., 2009]. Par exemple, le CNR entre l'eau et la graisse est exprimé selon la formule 2.19.

$$CNR_{eau/graisse} = \frac{\mu_{eau} - \mu_{graisse}}{\sqrt{\sigma_{eau}^2 + \sigma_{graisse}^2}} \quad (2.19)$$

2.7.4 Résolution temporelle

Le terme de résolution temporelle est employé pour définir le temps de l'acquisition des images nécessaires à la reconstruction tomographique d'une coupe. Plus la résolution temporelle est bonne et plus le temps de l'acquisition des images pourra être rapide. Le scanner médical FlashCT2 de Siemens est actuellement le plus rapide du marché, sa résolution temporelle est $75ms$.

2.7.5 Vitesse d'acquisition

La vitesse d'acquisition d'un tomographe est distincte de la résolution temporelle. Elle prend aussi en compte la notion de distance. Dans le cas d'un scanner médical, dont l'acquisition est effectuée avec une trajectoire en spirale, la vitesse d'acquisition dépend de la résolution temporelle, du nombre de barrettes et de paramètres mécaniques telle que la vitesse de déplacement de la table. Le FlashCT2 de Siemens permet l'acquisition d'image à la vitesse de $45.8cm/s$. Une personne de $2m$ peut donc être scannée en moins de $5s$. Dans le cas d'un système "cone beam" et d'une géométrie d'acquisition circulaire, la vitesse d'acquisition est la même que la résolution temporelle.

2.7.6 Stabilité temporelle

Aucun élément de la chaîne d'acquisition ne dispose d'une stabilité temporelle parfaite. Par exemple, le faisceau de rayons X émis par une source conventionnelle peut avoir un spectre légèrement différent à plusieurs moments de la journée, ces variations d'énergie peuvent être la conséquence d'une mauvaise stabilité de la tension produite par le générateur. Un échauffement sur la cible peut également avoir une telle influence. Sur la plupart des systèmes la réponse du capteur présente une dérive dans le temps. On utilise couramment deux images appelées "Flat Fields" pour corriger la réponse du capteur lorsqu'il est soumis au faisceau de rayons X ou lorsqu'il n'est soumis à aucun faisceau.

L'influence de ces variations au cours du temps des éléments du tomographe se caractérise par des variations des coefficients d'atténuation mesurés et donc des niveaux de gris. Pour évaluer la stabilité temporelle il est possible d'effectuer plusieurs acquisitions d'un même objet avec des intervalles de temps et de comparer les valeurs mesurées.

2.7.7 Les artefacts

2.7.7.1 Le durcissement de faisceau ("Beam Hardening")

L'artefact le plus courant en tomographie est le "Beam Hardening". Son effet dans les images CT se manifeste par un réhaussement de l'intensité sur les bords des objets par rapport au centre [Ito, 2005]. Cet artefact est dû à l'augmentation de l'énergie moyenne du faisceau de rayons X, le durcissement, lorsqu'il traverse un objet (Figure 2.28). En effet les photons d'énergies les plus basses vont statistiquement disparaître plus vite que des photons de plus hautes énergies. Cet artefact est donc directement lié à la nature polychromatique du faisceau de rayons X.

Cet artefact nécessite d'être considéré avec prudence lors de l'analyse des images CT

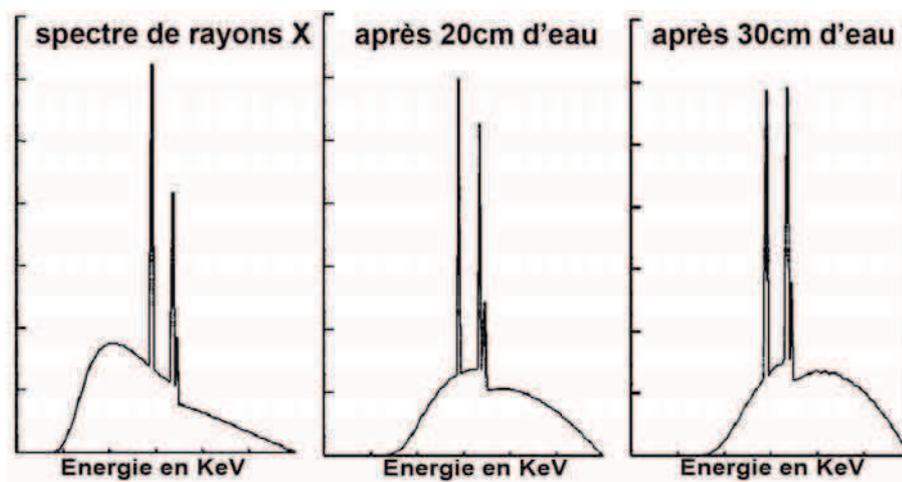


FIGURE 2.28 – Illustration de la modification du spectre du faisceau de rayons X à travers de l'eau. L'énergie moyenne du faisceau diminue avec la profondeur.

puisqu'il modifie les valeurs d'atténuation de l'objet en fonction de sa taille (Figure 2.29). L'utilisation de ces valeurs comme seul indicateur pour la caractérisation et la quantification peut être biaisée.

Dans le cas de sources X polychromatiques, cet artefact peut être limité en filtrant le faisceau. En supprimant les basses énergies par filtration, on rend plus "dure" le faisceau avant qu'il ne traverse l'objet. On utilise pour cela des pièces de métal (en aluminium, cuivre ou tungsten) que l'on place entre le tube et l'objet scanné. Cette filtration supprime les basses énergies et limite le "Beam Hardening" mais limite aussi la quantité de photons pour les autres énergies. La conséquence est une augmentation du bruit global et des temps d'acquisition.

2.7.7.2 Artefacts en anneaux ("Ring Artefact")

Les "ring artefacts" forment dans les images des cercles ou des portions de cercles centrés sur l'axe de rotation. Ils sont causés par des défauts sur le détecteur ou des défauts mécaniques engendrés durant la phase d'acquisition des projections radiographiques. On les retrouve principalement pour des acquisitions de type "cone beam" avec des détecteurs 2D (micro-CT ou synchrotron). Par exemple, un pixel

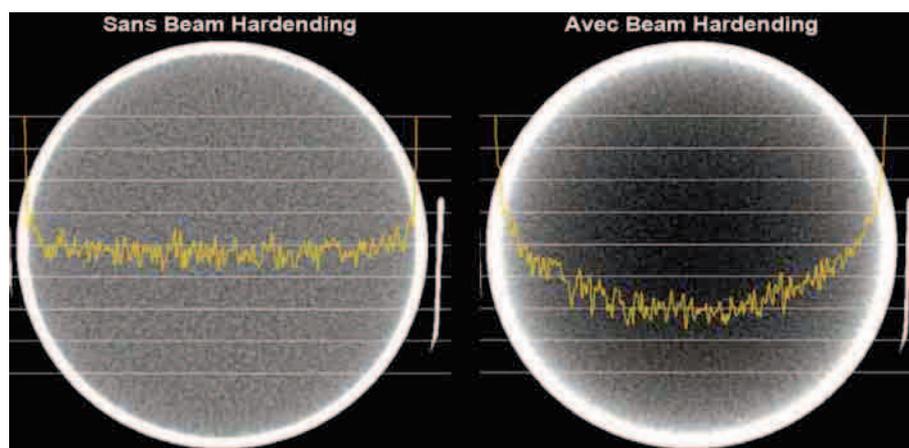


FIGURE 2.29 – Effet de l'artefact de "Beam Hardening" illustré par des profils de niveau de gris obtenus le long du diamètre d'un fantôme d'eau uniforme (Illustration modifiée à partir de [Barrett and Keat, 2004])

défectueux sur le capteur va enregistrer des valeurs erronées dans toutes les projections, qui vont être cumulées au moment de la reconstruction et ainsi créer des cercles parasites qui pourront compliquer une analyse quantitative.



FIGURE 2.30 – Coupe 2D obtenue en micro-tomographie synchrotron présentant des "ring artefacts"

Etant principalement lié à la phase d'acquisition, il est possible d'éviter ce problème en modifiant le protocole de numérisation. Certains constructeurs de micro-CT proposent un déplacement vertical aléatoire de l'échantillon durant le scan (par exemple Skyscan). Les défauts des pixels défectueux, enregistrés à des positions différentes pour chaque projections, seront statistiquement supprimés.

Il est également possible de corriger cet artefact par des méthodes de traitement d'images sur données reconstruites. Une série de pixels avec des valeurs erronées va

apparaître sur le sinogramme comme une ligne verticale, ce qui rend possible sa détection et sa correction au moment de la reconstruction tomographique [?, Boin2006]

En tomographie synchrotron, un monochromateur polycristallin (multicouche de silicium) est utilisé pour extraire un faisceau avec une seule énergie de photons. Le faisceau, complètement homogène avant cette multicouche, est alors imprégné des défauts de celle-ci (Figure 2.31), avec pour conséquence des "ring artefacts".

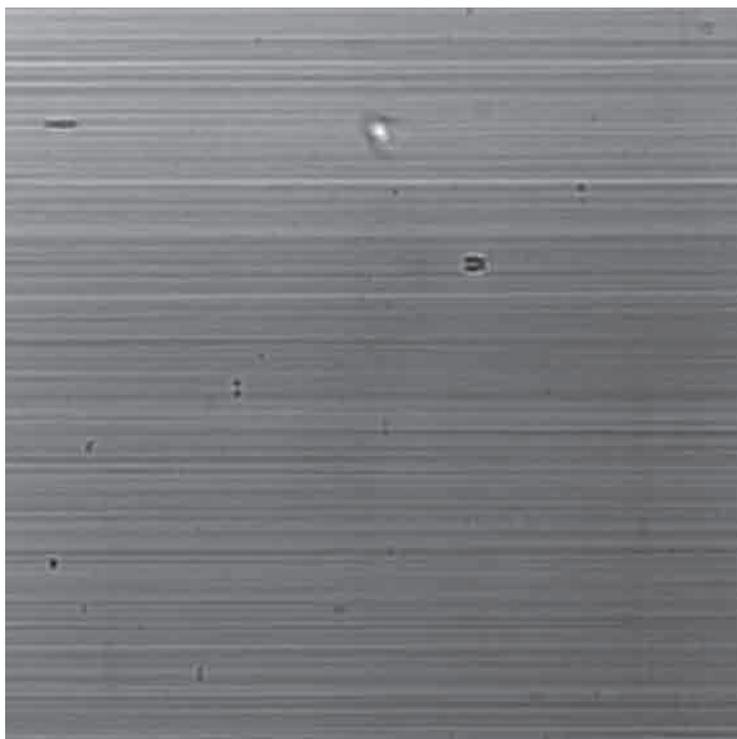


FIGURE 2.31 – Image du faisceau obtenu après le monochromateur sur la ligne de micro tomographie ID19 de l'ESRF. Les lignes horizontales sont dues à la structure multicouche du monochromateur et les taches noires sont dues à ses défauts

2.7.7.3 Artefacts métalliques

La présence de métal dans le champ de vue pendant l'acquisition peut créer des stries dans l'image reconstruite. Cet d'artefact apparaît lorsque la densité d'un objet est au dessus de la gamme de densités que le système est capable d'intégrer. En routine clinique, cet artefact est du aux objets métalliques tels que les plombages des dents (Figure 2.32 à gauche) ou les prothèses. Dans d'autres cas, si un faisceau de rayons X n'est pas suffisamment énergétique, les tissus minéralisés tel que les os (Figure 2.32 à droite) ou l'émail peuvent conduire à ces artefacts en stries.

2.7.7.4 Artefacts de mouvement

Le déplacement de l'objet pendant la séquence d'acquisition introduit des artefacts de mouvement qui se caractérisent pas des ombres dans les images reconstruites

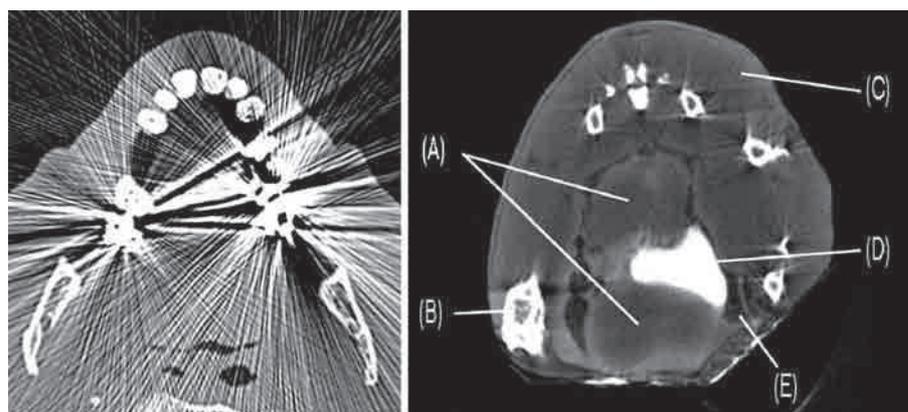


FIGURE 2.32 – Artefacts en stries dus à des éléments métalliques dans les dents d’un patient [De Man et al., 2000] (à gauche). Artefacts en stries visibles autour des os d’une souris avec une acquisition en micro-CT [Paulus et al., 2000] (à droite)

par tomographie. Dans le cas d’un examen *in-vivo*, la respiration ou les battements du coeur du patient ou de l’animal (Figure 2.33) doivent être contrôlés afin de synchroniser l’acquisition des images avec les cycles de déplacements des organes. Dans le cas d’échantillons *ex-vivo*, les tissus mous sont une source d’artefacts. En effet, à cause de la durée de l’acquisition et de l’échauffement du au rayonnement, les tissus s’assèchent et se rétractent, provoquant un mouvement apparent et une modification de la forme de l’échantillon.

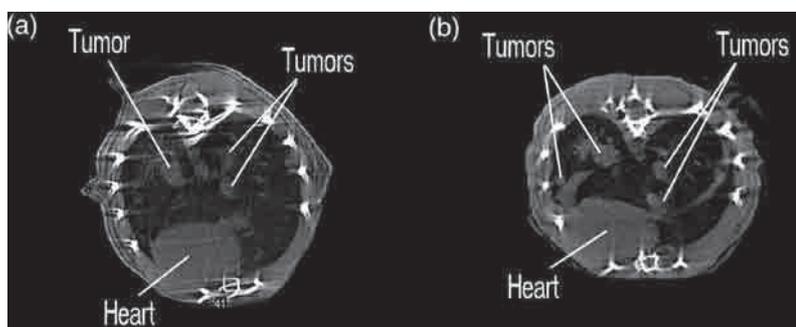


FIGURE 2.33 – Artefacts dus aux mouvements de l’animal lors de sa respiration [Paulus et al., 2000]

2.7.7.5 L’effet de volume partiel

L’effet de volume partiel apparait lorsque la résolution ne permet pas de résoudre les différents éléments compris dans une région (voxel). Si un voxel est composé de plusieurs tissus ou matériaux de densités différentes, la valeur de gris apparente est donnée par l’atténuation moyenne pondérée des différents éléments (Figure 2.34). Cet artefact diminue quand la résolution augmente.

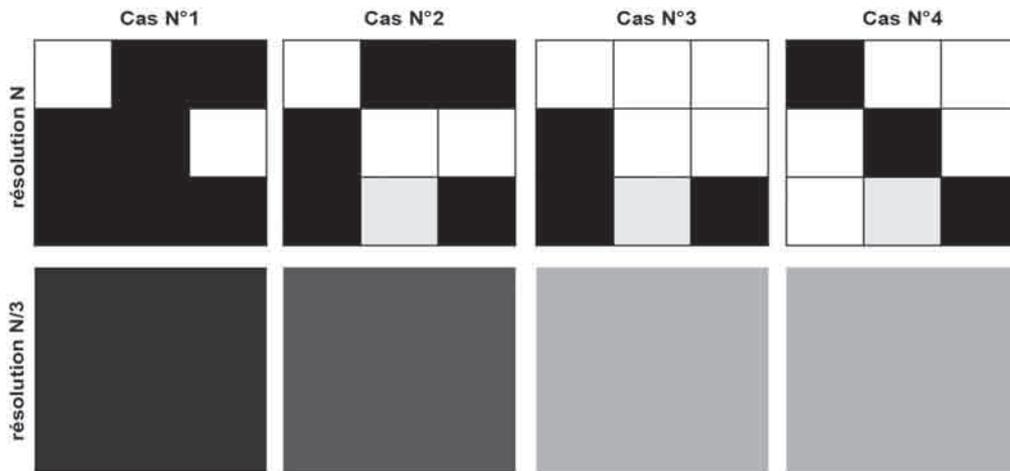


FIGURE 2.34 – Illustration de l'effet de volume partiel avec une région imagée avec deux résolutions. Pour la ligne du haut, la résolution permet de résoudre les différents éléments mais pour la ligne inférieure, la région, imagée par un seul voxel, est représentée par une valeur de niveau de gris apparente

Cet effet a pour conséquence de rendre plus floues les frontières et les interfaces des objets. Bien que cela puisse rendre plus difficile une analyse basée sur les valeur de gris, cet effet présente l'opportunité d'extraire de l'information sur un structure plus fine que la résolution. En effet, l'étude de la modification d'atténuation provoquée par la présence d'un élément supplémentaire permet de connaître la quantité de cet élément en supplément. Par exemple dans le domaine médical, la valeur Hounsfield moyenne du foie étant connue, si un patient présente une valeur Hounsfield plus basse, cela peut signifier la présence de graisse. Dans un autre domaine, l'effet de volume partiel a déjà été utilisé pour mesurer la taille de fissures dans des roches cristallines [Johns et al., 1993] et la porosité de prélèvements dans des sols [Peyton et al., 1992].

2.7.7.6 Artefacts "Cone Beam"

La reconstruction obtenue par la formule FDK n'est pas exacte en 3D, excepté dans le plan médian où elle correspond au cas 2D divergent. Dans le reste de la zone de reconstruction, l'approximation perd en qualité à mesure que l'on s'éloigne du plan médian. L'effet sur les images est une variation basse fréquence des niveaux de gris et une déformation géométrique. Ces "cone beam artefacts" ont été étudiés par Boyd et al. [Boyd et al., 2006] dans le cas d'une acquisition en micro-CT afin d'évaluer la déformation de sphères placées à différents endroits de la zone d'acquisition (Figure 2.35).

Cet artefact n'est pas uniquement présent dans les acquisitions de micro-CT dont la géométrie est conique. La multiplication des détecteurs dans les scanners médicaux engendre également une géométrie conique pour le faisceau. Par exemple le scanner Toshiba Aquilon One équipé de 320 barrettes est accompagné d'une méthode de reconstruction avec un algorithme de correction de cet artefact.

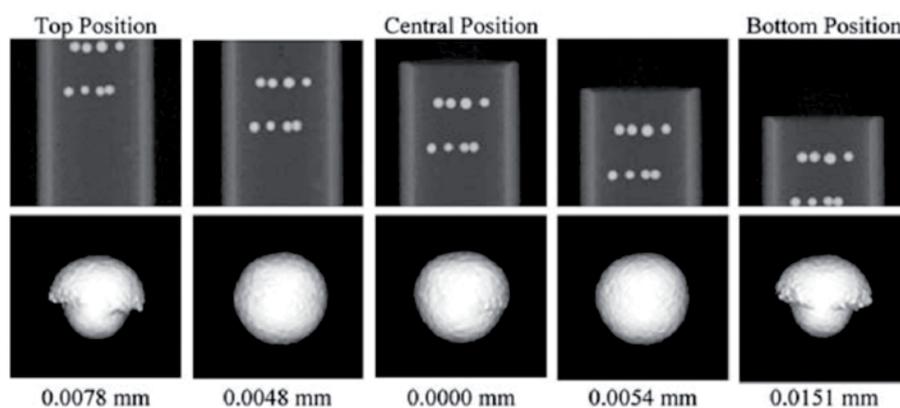


FIGURE 2.35 – Illustration des distortions causées par l'artefact "cone beam". On constate que la même sphère est déformée si elle est placée pendant l'acquisition dans des zones éloignées du plan médian. La ligne supérieure montre des projections et la ligne inférieure la reconstruction 3D de la sphère de test (Illustration modifiée à partir de [Boyd et al., 2006])

Certains constructeurs de tomographe ont choisi de limiter cet artefact à l'acquisition par collimation du faisceau (par exemple le constructeur Scanco, Suisse).

2.8 Conclusion, quels tissus cibles de l'analyse

La tomographie est principalement divisée selon deux types de technologie : le scanner médical (CT) et le micro-CT. Pour l'imagerie du petit animal, c'est le micro-CT qui est dédié à l'animal. Il permet l'imagerie *in vivo* et *ex vivo* avec une large plage de résolution. L'imagerie CT n'est jamais employée pour la souris, mais les avancées technologiques récentes de cette modalité qui n'est pas dédiée au petit animal permettent de l'envisager pour un certains nombre d'applications. Par exemple, sa résolution temporelle et sa rapidité d'acquisition permettent de l'envisager comme outil de "screening" à haut débit. Dans cette optique le développement de méthodes d'analyses les plus automatisées possible est nécessaire et ce pour chaque types de tissu étudié.

La tomographie X est déjà reconnue pour l'analyse morphologique des tissus minéralisés à l'échelle microscopique. Son intérêt pour l'analyse des tissus adipeux a été identifié chez l'humain mais très peu de travaux la mette en oeuvre pour la souris. Nous avons choisi d'étudier les tissus minéralisés et adipeux avec ces deux types de technologies (CT et micro-CT), en les comparant et en développant des outils d'analyses spécifiques.

Présentation des matériels d'imagerie utilisés

Sommaire

3.1	Introduction	53
3.2	Présentation des matériels d'imagerie utilisés	54
3.2.1	CT Toshiba Aquilon 64	54
3.2.2	CT Siemens Somatom Flash 2	54
3.2.3	Skyscan 1178	56
3.2.4	Viscom 8060 NDT	56
3.2.5	Skyscan 1172	57
3.2.6	Synchrotron ESRF	58

3.1 Introduction

Pour chacune des études réalisées au cours de ce travail de thèse, l'imagerie par tomographie à rayons X a été utilisée pour acquérir des données sur des échantillons variés issus de sites anatomiques de la souris. En fonction de chaque problématique et du type d'échantillon à analyser nous avons utilisé des scanners médicaux (CT) dédiés à l'humain, des micro-CT dédiés à l'imagerie ex vivo, un autre à l'imagerie in vivo et nous avons effectué quelques acquisitions en synchrotron.



FIGURE 3.1 – Scanner médical Toshiba Aquilon disposant de 64 détecteurs

3.2 Présentation des matériels d'imagerie utilisés

3.2.1 CT Toshiba Aquilon 64

Le scanner multidétecteurs (ou multi-barrettes) associée à la trajectoire hélicoïdale, plusieurs capteurs 1D (2 barrettes en 1993 et 320 en 2007) permettant une acquisition volumique en une seule rotation.

Le Toshiba Aquilon 64 (Figure 3.1) est un scanner médical dédié à l'humain disposant de 64 barrettes 16 bits de 0.5 mm permettant de couvrir 32 mm en une rotation. Le générateur de rayons X, d'une puissance de 60 kW (de 80 à 135 kV et de 10 à 500 mA), est animée d'une vitesse de rotation de 350 ms pour effectuer un tour. D'après les données du constructeur, la reconstruction peut être effectuée exactement avec une résolution isotrope de $350\text{ }\mu\text{m}$, au delà de cette résolution les images sont interpolées.

Nous avons utilisé ce scanner pour l'imagerie corps entier de la souris.

3.2.2 CT Siemens Somatom Flash 2

Le Flash CT 2 est le plus récent de la gamme de scanners médicaux proposée par Siemens, c'est un scanner double tube (Figure 3.2).

Il dispose de deux sources de rayons disposées à 90° l'une de l'autre (Figure 3.3). Cette configuration lui permet deux modes de fonctionnement : mode simple énergie et mode double énergie (Dual-CT).

L'avantage en mode simple énergie de disposer de deux sources à 90° est de réduire les temps d'acquisitions, en diminuant l'angle à couvrir pour acquérir les données d'une coupe et en jouant sur le "pitch" (Figure 3.4).

Les deux générateurs permettent une tension entre 80 et 140 kV et un courant entre 20 et 666 mA . En mode "Flash" la rotation est effectuée en 0.28 s et la vitesse d'acquisition atteint 45.8 cm/s . D'après les données du constructeur, la résolution



FIGURE 3.2 – Scanner médical double tube Siemens Flash CT 2 équipé de 256 détecteurs

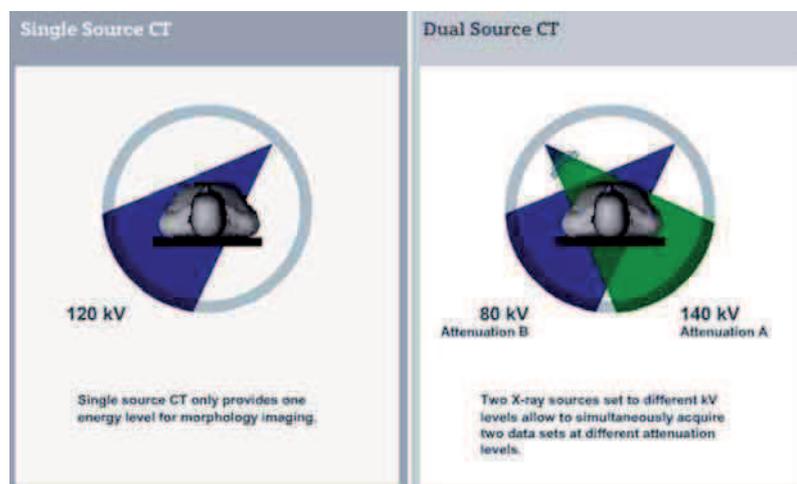


FIGURE 3.3 – Schéma du scanner double tube Siemens Flach CT 2

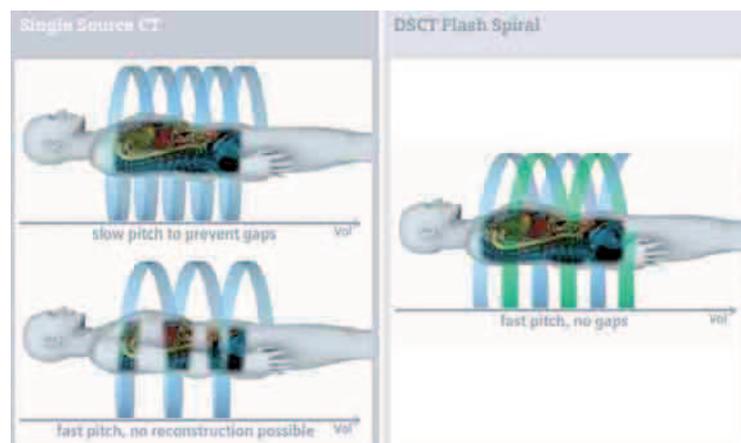


FIGURE 3.4 – Illustration de la différence entre l'acquisition à deux sources et à une seule source

temporelle est 75 ms pour les applications cardiaques avec synchronisation sur les données physiologiques.

Nous avons utilisé ce scanner pour l'imagerie corps entier de la souris en mode

simple énergie avec une acquisition rapide et en mode double énergie pour effectuer quelques tests.

3.2.3 Skyscan 1178

Le micro-CT Skyscan 1178 est dédié à l'imagerie *in vivo*. Il a été conçu comme un scanner rapide pour l'acquisition de données anatomiques de moyenne résolution pour le recalage avec une autre modalité comme le PET, le SPECT ou la bioluminescence. L'acquisition peut être réalisée en 1 *min* dans le cas le plus rapide mais avec une qualité d'image assez grossière. Les fonctions vitales de l'animal telles que la respiration et les battements du coeur sont contrôlés et utilisés pour la synchronisation avec l'acquisition des images. Cet appareil est équipé d'un capteur 12 bits avec une matrice de 1280x1024 pixels. La résolution des images est soit de 80 μm soit de 160 μm (obtenu par un "binning" de 2).



FIGURE 3.5 – Micro-CT Skyscan 1178 dédié à l'imagerie *in vivo*

Nous avons utilisé cet appareil dans le cadre d'une collaboration avec Yves Frapart au laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques (UMR CNRS 8601) de l'université Paris Descartes. Au sein de la plateforme d'imagerie RPE, nous avons analysé sur le micro-CT Skyscan 1178 des corps entiers de souris congelées.

3.2.4 Viscom 8060 NDT

Le micro-CT VISCOM 8060 NDT est initialement dédié aux applications industrielles pour l'imagerie X. La grande mobilité des actionneurs mécaniques dont la plage de mouvement se décompose selon 8 axes est avantageuse pour l'inspection des pièces mais est liée au fort encombrement de cet appareil (3x3x2m). Ce tomographe dispose d'un détecteur Perkin Elmer couplé à une source X Viscom dont la tension et le courant maximum sont de 225kV et 3000 μA . Cette source permet d'obtenir un faisceau d'X suffisamment énergétique pour l'étude d'échantillons denses comme des pièces industrielles contenant du métal. L'utilisation de la source est possible pour une gamme de puissance entre 0w et 100w. Il n'est donc pas possible d'utiliser la

source avec 200kV et 2000 μ A. Il est important de noter que le point d'émission des rayons X a un diamètre de 8 μ m à 8w et que ce diamètre augmente de 1 μ m tous les 1w supplémentaires. Le détecteur dispose d'une matrice de 1024x1024 pixels et permet une intégration des photons sur une plage de niveaux de gris de 16 bits. La taille du capteur de 20 cm (pixels de 200 μ m) autorise l'imagerie de pièces assez volumineuses (dont le plus petit diamètre externe est de 18cm).



FIGURE 3.6 – Micro-CT industriel Viscom 8060 NDT

Nous avons utilisé ce micro-CT pour l'imagerie des mandibules, des molaires, du corps entier de la souris.

3.2.5 Skyscan 1172

Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire B2OA (Laboratoire de Bioingénierie et Biomécanique Ostéo-articulaires, Faculté de Médecine Paris 7-Denis Diderot), nous avons utilisé le micro-CT Skyscan 1172 (Figure 3.7).



FIGURE 3.7 – Micro-CT Skyscan 1172 dédié à l'imagerie *ex vivo*

Cet appareil est dédié à l'imagerie *ex vivo*. Il dispose d'une source de rayons X d'une puissance de 8w avec une tension maximale de 80kV et un courant maximal

de $100\mu A$. Le détecteur est composé d'une caméra haute résolution disposant d'une matrice de $10.3 MPixels$ (image de 4000×2400).

La géométrie d'acquisition de cet appareil est variable. En plus de la magnification classique (position de l'objet par rapport à la source), le détecteur se déplace automatiquement en fonction des paramètres d'acquisition suivant trois positions prédéfinies. La diminution de la distance entre la source et le détecteur permet d'optimiser l'utilisation du flux de photons X et ainsi réduire le temps d'acquisition. La caméra dispose de deux modes de "binning" (par deux ou par quatre avec des résolutions de 2000×1200 ou 1000×600 pixels). Outre le fait de limiter la résolution et la quantité de données, l'intérêt du "binning" est de réduire les temps d'acquisition en offrant des surfaces d'intégration pour les photons plus importantes sur le détecteur. Grâce à la géométrie variable et au "binning", cet appareil peut réaliser des acquisitions très rapides compte tenu de la résolution.

Si l'échantillon est plus large que le champ de vue, une option permet de déplacer horizontalement l'objet à chaque projection. Ainsi la largeur du champ de vue est doublé et la projection atteint une taille maximale de 8000 pixels en largeur. Les données générées dans ce cas sont très volumineuses et donc difficiles à traiter.

Dans le cadre de la collaboration avec Christophe Nich (voir Chapitre 7), nous avons utilisé ce micro-CT pour l'acquisition de données 3D haute résolution sur des échantillons de calvaria (structure supérieure du crâne) et de tibia de souris.

3.2.6 Synchrotron ESRF

Le terme synchrotron désigne un grand instrument destiné à l'accélération à haute énergie de particules élémentaires. Les synchrotrons à électrons permettent d'obtenir un flux d'électrons très intense et de très haute énergie. Le flux d'électrons mis en mouvement circulaire dans un anneau de stockage va émettre un rayonnement électromagnétique à chaque changement de trajectoire conformément aux équations de Maxwell. Le rayonnement émis est appelé rayonnement synchrotron et couvre une très large partie du spectre électromagnétique : de l'infrarouge aux rayons X durs. Le synchrotron est donc une source de rayons X avec des caractéristiques différentes d'une source conventionnelle. Par exemple, il y a un facteur 10^{19} entre la quantité de photons X d'une source X utilisée en imagerie médicale et le synchrotron.

L'European Synchrotron Radiation Facility de Grenoble (ESRF) est l'un des trois plus importants synchrotrons actuellement en fonctionnement dans le monde avec l'APS à Argonne aux États-Unis et Spring-8 au Japon. Il est composé d'un accélérateur de particules d'environ 320 m de diamètre, où des électrons sont entraînés à très haute vitesse dans un anneau pour produire le rayonnement synchrotron.

L'ESRF est reconnu mondialement comme imagerie tomographique de référence. Outre la tomographie classique (tomographie en absorption), l'ESRF dispose d'une expertise unique pour l'imagerie à contraste de phase, et pour l'Holotomographie. Sur la ligne ID19, unité spécialisée sur la micro-tomographie, l'énergie des photons couramment utilisée varie entre 10 et 35 keV (valeurs maximales entre 6 et 100 keV) et la résolution varie entre 300 nm et 30 μm . Le point d'émission

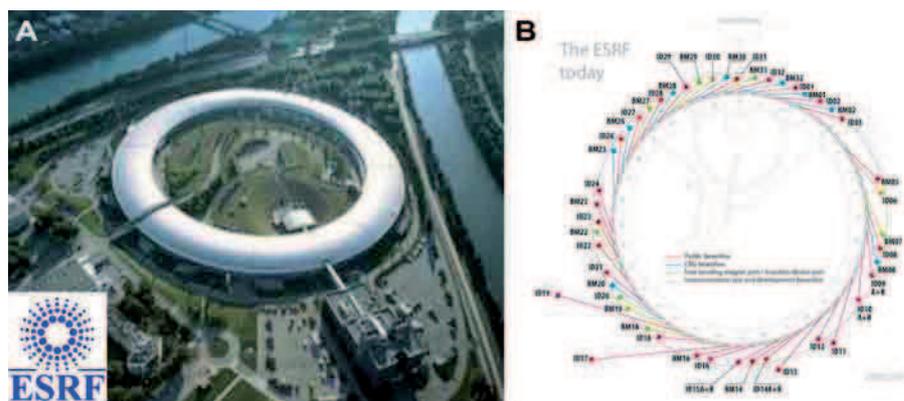


FIGURE 3.8 – Site du synchrotron de Grenoble (A) et schéma des "Beam Lines"

du rayonnement électromagnétique est situé à 145 *m* de la chambre d'analyse. Sur cette distance, les caractéristiques du faisceau sont contrôlées par des onduleurs, des wigglers et un monochromateur. Les caractéristiques avantageuses de faisceau X sont couplés à deux dispositifs mécaniques de précision pour le déplacement de l'échantillon (Figure 3.9).

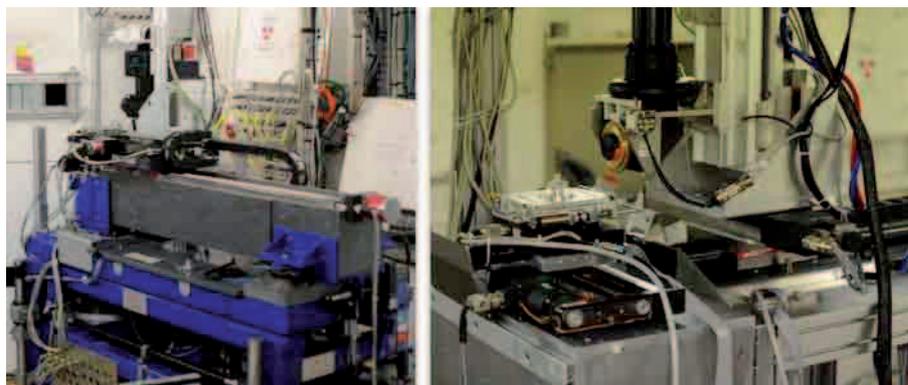


FIGURE 3.9 – Photographies des deux bancs de déplacement mécanique de l'objet (photos réalisées lors de nos expérimentations). Banc utilisé pour les acquisitions inférieures au μm (à gauche) et pour les résolutions supérieures (à droite)

Nous avons effectué quelques acquisitions sur la ligne ID19 en utilisant la tomographie classique (en absorption) et à contraste de phase avec un faisceau de type "Pink Beam" (non monochromatique mais avec une bande d'énergie étroite). Les échantillons analysés sont des mandibules de souris et ces données constituent une référence pour la comparaison avec nos données obtenues en micro-CT conventionnel.

Chapitre IV

Etude des tissus minéralisés de la sphère cranio-faciale : imagerie et développement d'outils d'analyse

Collaborations :

- Catherine Vidal, Institut Pasteur et INSERM U 747, Paris
- Sylvain Ordureau, UsefulProgress, Paris
- Roger Lédée, Laboratoire PRISME, Orléans
- Christophe Léger, Laboratoire PRISME, Orléans
- Marian Young, NIDCR, NIH Bethesda, MD USA
- Michel Goldberg, INSERM U747, Paris

Sommaire

4.1	Introduction	62
4.2	Protocole expérimental et acquisition des données	62
4.3	Vérification et calibration des niveaux de gris	63
4.3.1	Rappel : Relation entre niveau de gris et degré de minéralisation des tissus	63
4.3.2	Artefacts de "beam hardening"	64
4.3.3	Méthode de correction des niveaux de gris	64
4.4	Analyse qualitative de la mandibule	65
4.4.1	Visualisation de données volumiques	65
4.4.2	Définitions des fonctions de transferts spécifiques à la mandibule de souris	72
4.4.3	Coupes virtuelles à travers la mandibule	72
4.5	Analyse quantitative de la structure des dents	74
4.5.1	Article : "3D visualization and quantification of bone and teeth mineralization for the study of osteo/dentinogenesis in mice models"	77
4.6	Conclusion	84

4.1 Introduction

Parmi les différents tissus minéralisés, la mandibule constitue un site privilégié pour l'étude de modèle murins de pathologies osseuses et dentaires. La mandibule est une région anatomique constituée de l'os de la mandibule et des dents, à savoir une incisive et trois molaires chez la souris (Figure 4.1).

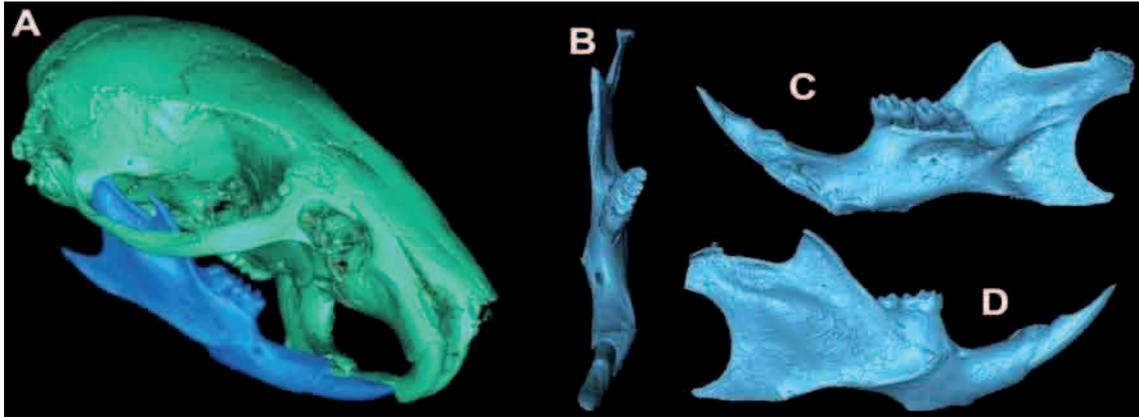


FIGURE 4.1 – Représentation de la mandibule au sein de la sphère cranio-faciale de la souris

L'os de la mandibule est un os hétérogène issu de deux processus d'ossification au cours du développement : d'une part une ossification endomembraneuse (os du crâne et du maxillaire) et de l'autre d'une ossification endochondrale (os longs, vertèbres, pelvis). Ainsi la mandibule dans son ensemble constitue un modèle de choix pour l'étude des tissus minéralisés.

Notre objectif a été de développer une méthodologie d'analyse à la fois qualitative et quantitative pour l'imagerie 3D de la mandibule (os et dents).

4.2 Protocole expérimental et acquisition des données

Nous avons développés des outils en lien direct avec les problématiques biomédicales correspondant à nos modèles animaux : des souris génétiquement modifiées ("Knock-Out" : KO) et des souris contrôles dites sauvages ("Wild-Type" : WT).

Le schéma de la Figure 4.2 illustre notre protocole expérimental.

Les mandibules de souris ont été numérisées en 3D à l'aide du micro-CT industriel Viscom 8060. Les images, d'une résolution isotrope de $15\mu m$, ont été réalisées avec une tension de 60kV et un courant de $200\mu A$. Les projections (360) ont été obtenues avec une exposition de $2000ms$. Les acquisitions étaient d'une durée d'environ 30 minutes.

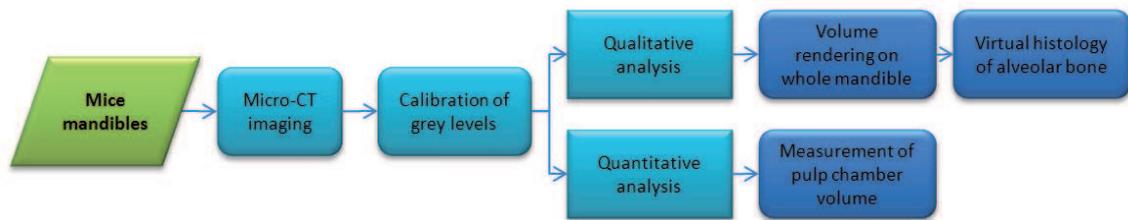


FIGURE 4.2 – Schéma du protocole d'analyse des tissus minéralisés de la mandibule de souris

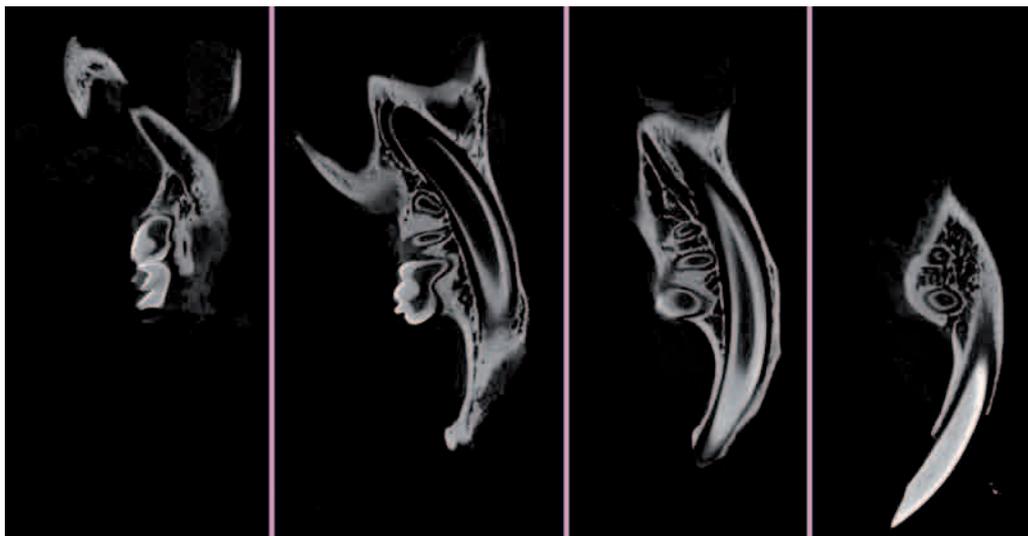


FIGURE 4.3 – Exemple de coupes extraites d'un volume 3D de mandibule de souris réalisé avec le micro-CT Viscom 8060

Quelques coupes 2D réalisées lors d'une acquisition sont illustrées sur la figure 4.3. Ce type d'image contient deux types d'information, l'une morphologique et l'autre sur la distribution des densités des tissus. Classiquement les études associant imagerie micro-CT et tissu osseux s'intéressent exclusivement à l'information morphologique. Notre démarche a été de compléter l'approche anatomique par une analyse de la répartition des densités des tissus à partir des niveaux de gris.

4.3 Vérification et calibration des niveaux de gris

4.3.1 Rappel : Relation entre niveau de gris et degré de minéralisation des tissus

La densité minérale osseuse (Bone Mineral Density : BMD) est un paramètre important dans l'évaluation des propriétés des tissus minéralisés. Chez l'humain comme pour les études pré-cliniques, la BMD est mesurée avec des modalités d'imagerie basées sur l'utilisation des rayons X comme la DXA ("Double X-Rays Absorptiometry") et la tomographie X.

Les données obtenues par tomographie X présentent l'avantage de permettre

une analyse de la morphologie et des densités. Cependant l'analyse de la BMD et plus généralement des densités des tissus à partir de ce type de données doit être considérée avec précaution.

Le contraste dans les images de tomographie X est formé par les différentes atténuations des rayons X à travers la matière. En théorie, une relation linéaire entre le niveau de gris dans l'image et la densité n'est possible qu'avec un faisceau de rayons X monochromatique. Ce type de faisceau ne peut être obtenu qu'avec un synchrotron. Avec les sources conventionnelles, comme celles utilisées en imagerie médicale, biomédicale ou industrielle, le faisceau de rayons X est polychromatique. Il n'y a donc pas de relation simple entre le niveau de gris et la densité des tissus. Ce type de faisceau implique de surcroît des artefacts pouvant induire des variations de niveaux de gris, ce qui peut compliquer encore plus la relation entre niveau de gris et densité.

4.3.2 Artefacts de "beam hardening"

Le principal artefact dû à la polychromaticité est le durcissement de faisceau ("Beam Hardening"). Il est bien connu pour ses "effets de cuvettes" impliquant des modifications des niveaux de gris sur les bords de l'objet et ce en fonction de sa taille [Ito, 2005].

Dans le but d'utiliser les niveaux de gris pour l'étude des densités, il est utile d'essayer de corriger cet artefact ou alors de le modéliser dans l'analyse. Différentes méthodes de corrections ont été proposées dans la littérature [Hammersberg and Mangard, 1998] [Bock et al., 2007] [Stenner et al., 2010] [Kyriakou et al., 2010].

D'après Meganck [Meganck et al., 2009], la relation entre niveau de gris et densité peut être calibrée par une loi linéaire. Dans ce cas, la transformation appliquée sur les valeurs de gris pour exprimer des densités est une opération de type "shift/scale".

4.3.3 Méthode de correction des niveaux de gris

Dans notre étude, l'objectif est de comparer des échantillons de tissus minéralisés entre deux types de souris, KO et WT. Dans ce contexte l'analyse des niveaux de gris pour avoir une valeur absolue des densités n'est pas nécessaire. Nous avons en conséquence suivi une démarche identique à celle de Meganck [Meganck et al., 2009] mais sans fantôme de calibration. Les valeurs de référence nécessaires à la définition de l'opération de "shift/scale" des histogrammes ont été obtenues directement à partir des images 3D. Nous avons choisi comme première valeur, le niveau de gris moyen dans des régions contenant uniquement de l'air. Pour la seconde référence, nous avons choisi la région de l'émail à la pointe de l'incisive qui est celle qui présente un niveau de densité maximal stable.

La valeur de référence pour l'air a été définie comme la moyenne des valeurs mesurées dans 4 zones différentes autour de la mandibule. Pour l'émail, la mesure a

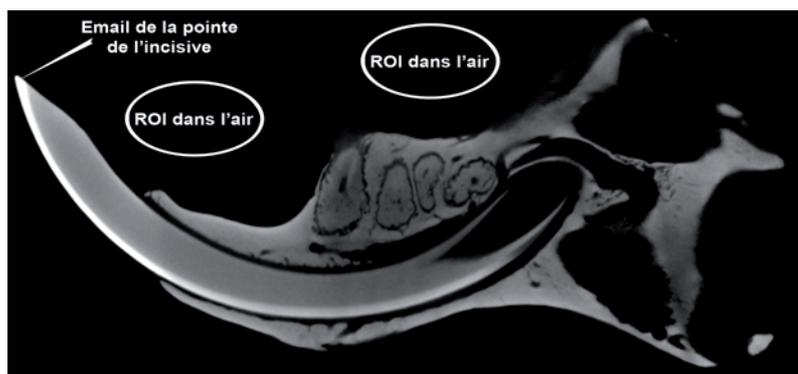


FIGURE 4.4 – Illustration des régions utilisées pour la mesure de valeurs de référence

été effectuée sur 5 coupes contiguës.

Afin de prendre en compte les artefacts dus au "Beam Hardening", une méthode logicielle de correction (inclus dans la suite logicielle de reconstruction tomographique du constructeur) a été utilisée au moment de la reconstruction tomographique. Ce type d'artefact peut biaiser la mesure de densités dans le cadre de mesures absolues. Pour notre étude, les échantillons comparés, provenant de souris de même souche, de même sexe et de même âge, présentent des tailles très similaires. Le "Beam Hardening" étant dépendant de la taille de l'échantillon, nous avons fait l'hypothèse que la variation d'intensité induite par cet artefact serait la même sur tous les échantillons comparés. Cette hypothèse et la méthode de correction logicielle sont suffisants pour permettre l'analyse relative entre échantillons.

4.4 Analyse qualitative de la mandibule

4.4.1 Visualisation de données volumiques

Des données volumiques peuvent être visualisées soit en 2D en calculant des coupes ou soit en 3D. Il existe deux types de visualisation de données 3D : le rendu surfacique ("Surface Rendering") et le rendu volumique ("Volume Rendering").

4.4.1.1 Visualisation en 2D et visualisation surfacique

L'extraction de coupes 2D à partir du volume de données est la méthode la plus simple, surtout quand les coupes sont perpendiculaires aux axes de repère du volume (Figure 4.5 A, B et D). Dans le cas contraire, les coupes obliques (Figure 4.5 C) (intersection d'un plan avec le volume de données), nécessitent une interpolation.

Il est également possible d'extraire des coupes curvilignes qui sont la projection sur un plan de l'intersection du volume avec une surface 3D. Ce type de visualisation présente certains avantages, notamment en coût de calcul pour l'affichage. Le principal défaut reste de ne pas permettre d'apprécier l'objet analysé réellement en

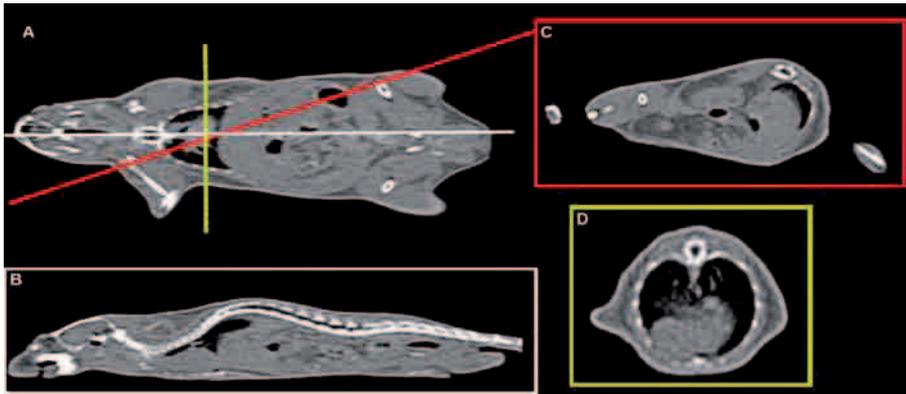


FIGURE 4.5 – Visualisation 2D suivant plusieurs orientations

3D, par exemple pour voir à l'intérieur.

Pour le rendu surfacique, des primitives sont calculées pour l'affichage. Ces primitives peuvent être des points, des lignes, des triangles, des polygones ou des splines. Cette méthode de visualisation est la plus couramment utilisée pour la représentation de scènes 3D, notamment pour l'affichage dans les jeux vidéos où les scènes 3D peuvent être constituées de triangles avec un placage de texture.

L'affichage de données volumiques en rendu surfacique nécessite de calculer des primitives. Une des méthodes les plus connues pour le calcul d'une surface à partir de données volumiques est la méthode du "Marching Cube" [Lorensen and Cline, 1987] comme l'illustre la Figure 4.6.

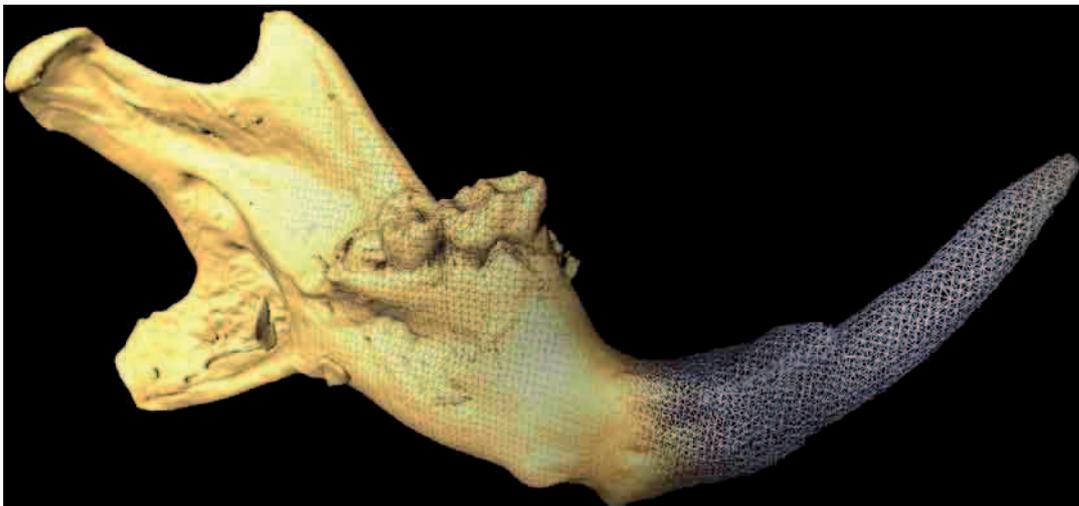


FIGURE 4.6 – Exemple de visualisation surfacique des données 3D de mandibule de souris. On distingue sur la partie droite les primitives (triangles) calculées à l'interface de l'os avec l'air nécessaires à la représentation surfacique.

La représentation surfacique permet un affichage en 3D mais présente un certain nombre de limitations. Ce type de visualisation ne permet pas d'exploiter la totalité de l'information contenue dans des données volumiques.

4.4.1.2 Le "Volume Rendering"

Afin de proposer des méthodes plus adaptées que la visualisation surfacique pour représenter des données 3D, des travaux initiés dans les années 80 et 90 ont permis le développement de nouvelles techniques appelées aujourd'hui "volume rendering". Avec comme critère la qualité de l'image, la méthode du "ray casting", proposée par Blinn [Blinn, 1982] et décrite en détails par Levoy [Levoy, 1988], s'est imposée comme la méthode de référence. Elle présente l'avantage de permettre la création de l'image sans calcul de géométries ou primitives intermédiaires. Ce type de visualisation permet donc de générer directement des images qui représentent la globalité de l'objet 3D dans une image 2D. Elle est ainsi quelques fois appelée "Direct Volume Rendering" [Van Gelder and Kim, 1996] [Kindlmann and Durkin, 1998] [Caban and Rheingans, 2008]. Parmi les autres méthodes de "volume de rendering" on peut citer le "splatting" [Westover, 1990] ou le "shear warp" [Lacroute and Levoy, 1994].

Ces techniques ont récemment fait l'objet de nouveaux travaux avec l'arrivée des processeurs graphiques programmables (GPU) des carte graphiques des ordinateurs. Le "ray casting" est une méthode très couteuse en ressources de calcul et ne permet pas de calculer les images en temps réel. L'utilisation de la grande puissance de calcul scientifique disponible dans les GPU a permis son implémentation en offrant des taux de rafraichissement très élevés [Engel and Ertl, 2002] [Kniss et al., 2003] [Roettger et al., 2003].

Les méthodes de "volume rendering" ont en commun deux étapes dans la création de l'image finale : la classification (attribution des propriétés optiques aux voxels du volume) et le calcul du rendu 3D. La classification est une des étapes critiques du "volume rendering". Elle consiste à la définition de fonctions de transfert qui permettent d'affecter à chaque voxel une couleur et une opacité. Dans le cas de fonctions de transfert 1D (FT1D), les valeurs de couleur et d'opacité sont basées uniquement sur l'intensité du volume. Une FT1D est définie dans le même espace que l'histogramme du volume de données. Les espaces de couleur et d'opacité les plus couramment utilisés sont RGBA (Red, Green, Blue, Alpha : opacité) ou HSVA (Hue : couleur, Saturation, Value : intensité, Alpha : opacité). Il est nécessaire de définir les fonctions de transfert pour chaque valeur de la composante (exemple : Hue, Saturation, Value et Alpha). Une fonction de transfert 1D peut être une simple rampe, une fonction linéaire par morceau ou bien être "dessinée" arbitrairement par l'utilisateur (Figure 4.7).

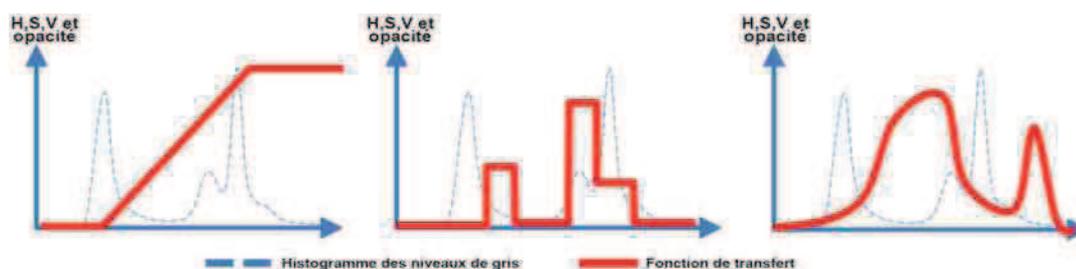


FIGURE 4.7 – Exemples de fonctions de transfert 1D

Les fonctions de transfert 1D sont les plus utilisées mais l'unique prise en compte de l'intensité des niveaux de gris peut être considérée comme une limitation. Une classification plus avancée des voxels est possible avec des fonctions de transfert multidimensionnelles [Kniss et al., 2002]. Certains auteurs ont présenté des méthodes avec prise en compte du gradient 3D (Figure 4.8) pour une meilleure identification de structures locales telles que les frontières entre des objets [Sato et al., 2000] [Sereda et al., 2006] [Zou et al., 2010]. Une autre méthode proposée par Kindlmann [Kindlmann et al., 2003] utilise la courbure locale comme dimension supplémentaire dans la définition des fonctions de transfert.

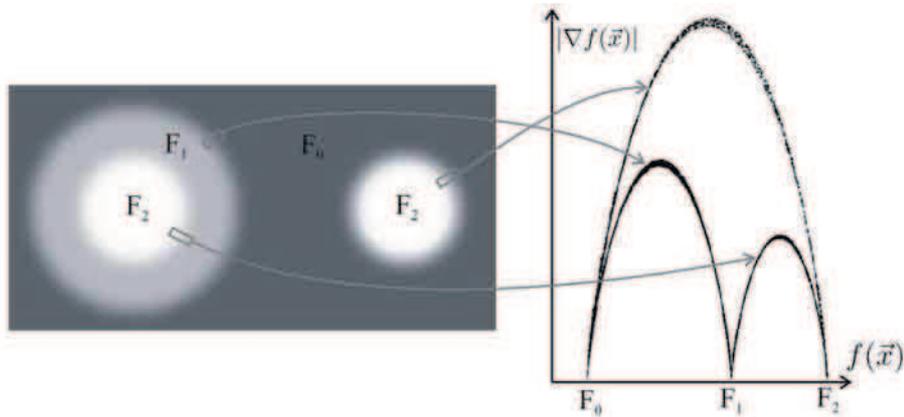


FIGURE 4.8 – Principe des fonctions de transfert 2D avec prise en compte du gradient

Certains auteurs ont proposés des outils graphiques de type "widget" pour aider à la définition de ces fonctions de transfert multi-dimensionnelles (Figure 4.9). Leur complexité d'appréhension pour l'utilisateur est un frein à leur développement. Ces méthodes sont en conséquence peu utilisées.

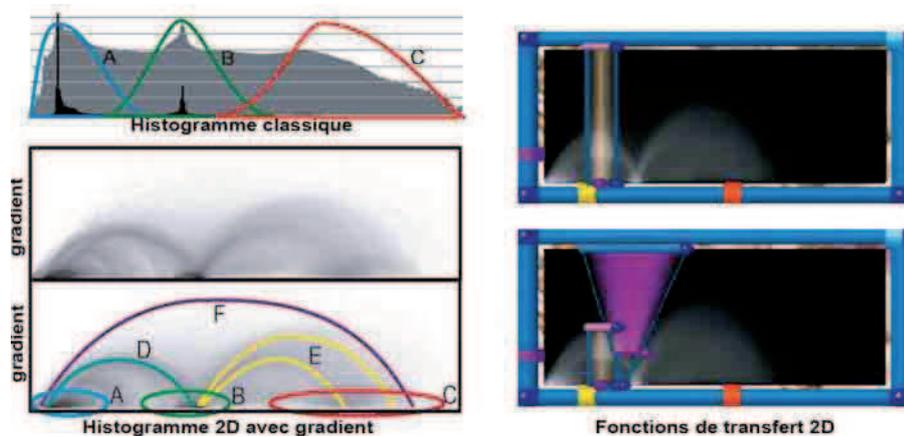


FIGURE 4.9 – Histogramme 2D avec gradient de l'image (à gauche) et exemple de définition de fonctions de transfert 2D à l'aide de "widgets" (à droite) (Illustration modifiée à partir de [Kniss et al., 2002])

Que ce soit pour des fonctions de transfert 1D ou multi-dimensionnelles, il n'existe encore aujourd'hui aucune solution complètement automatique pour la création des fonctions de transfert. Quelques travaux proposent des méthodes semi-automatisées qui sont spécifiques à une application précise [Levoy, 1988] [Levoy, 1990] [He et al., 1996] [Kindlmann and Durkin, 1998].

4.4.1.3 Principe du "ray casting"

Le principe de base du "ray casting" est de déterminer la valeur de chaque pixel de l'image finale en lançant un rayon à travers tous les voxels du volume qui tient compte de tous les paramètres de la scène 3D.

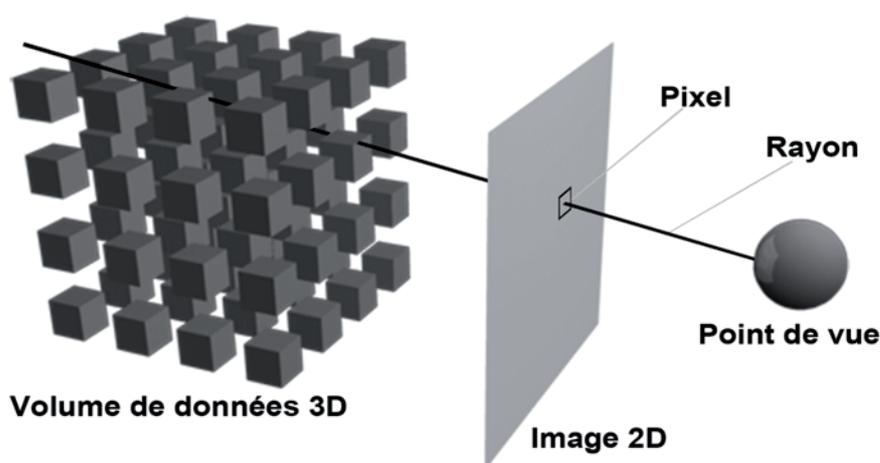


FIGURE 4.10 – Illustration du "ray casting" à travers le volume de données pour le calcul d'un pixel de l'image finale en tenant compte des paramètres de la scène 3D

Les valeurs rencontrées par le rayon lors de son parcours du volume de données sont évaluées à partir des valeurs des voxels et des fonctions de transfert associées. La création de l'image finale est obtenue par le calcul pour tous les rayons correspondant à tous les pixels. Cette méthode très coûteuse en ressources et donc relativement lente si aucune optimisation n'est réalisée.

Le "ray casting" se divise en quatre étapes (illustrées en 2D sur la figure 4.11) :

1. Le rayon correspondant à un pixel est "lancé" au sein de la scène 3D et à travers le volume de données
2. Les données 3D sont ré-échantillonnées le long du rayon
3. Les valeurs le long du rayon sont calculées en utilisant les fonctions de transfert définies préalablement. Cette étape nécessite une interpolation qui est le plus couramment tri-linéaire
4. La valeur finale correspondant au pixel est calculée par "accumulation". Cette étape tient compte de toutes les propriétés optiques de la scène (exemple : l'éclairage)

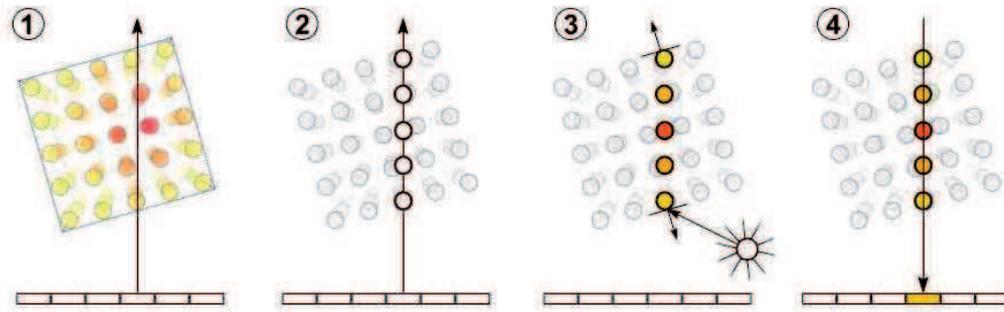


FIGURE 4.11 – Les différentes étapes du "ray casting"

Il existe plusieurs méthodes d'accumulation : la valeur moyenne, le "Maximum Intensity projection" (MIP), la distance à une valeur, le "Compositing". La Figure 4.12 illustre ces méthodes d'accumulation.

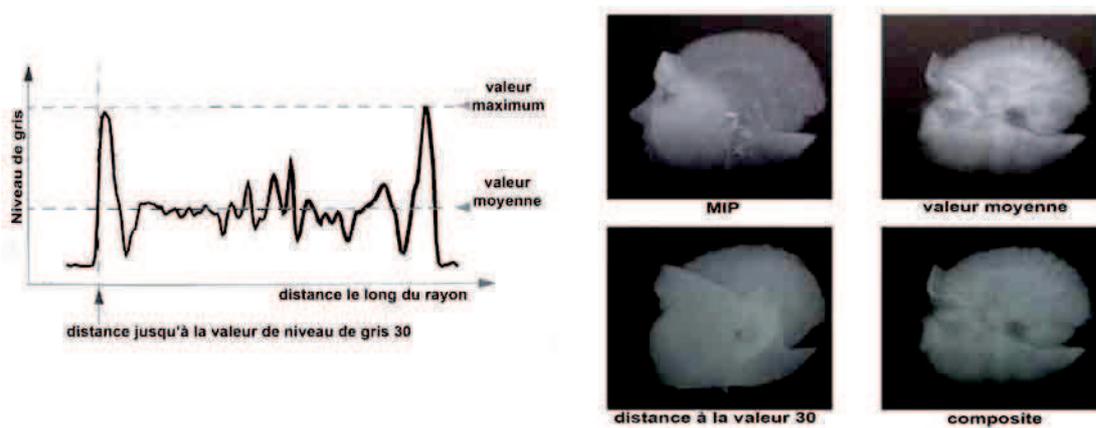


FIGURE 4.12 – Profil en valeurs de niveaux de gris d'un rayon lancé dans un volume de données (à gauche) et illustration de rendus obtenus avec quatre types d'accumulation classiques (à droite)

Le rendu obtenu avec la fonction de rayon définie par le calcul de la moyenne des valeurs le long du rayon s'apparente au rendu des radiographies. La visualisation en MIP est la plus simple et la plus rapide à calculer car elle consiste à conserver le long du rayon uniquement la valeur rencontrée la plus élevée. Ce type de rendu est très utilisé sur les consoles d'imagerie médicale en clinique humaine. Il s'apparente à un rendu de type radiographie pour lequel les contrastes entre les zones denses et les zones moins denses (telles que les cavités) ont été accentués.

L'accumulation réalisée pour le rendu avec "compositing" ne peut pas être représentée simplement sur le profil de rayon comme pour les trois méthodes précédentes. Elle est par une intégrale sur les propriétés de couleur et de transparences le long du trajet du rayon (équations 4.1 et 4.2) :

$$C = \int_0^{\infty} C_i T_i ds \quad (4.1)$$

$$T = 1 - A \quad (4.2)$$

avec C la couleur finale, C_i la couleur à l'indice i le long du trajet du rayon ds , T la transmission et A pour l'opacité (Alpha).

Dans le cas de données discrètes telles que les données CT, la loi d'accumulation se traduit par les équations 4.3 et 4.4 :

$$C = \sum_{i=1}^n C_i T_i \quad (4.3)$$

$$A = 1 - \prod_{j=1}^n 1 - A_j \quad (4.4)$$

Dans ces équations la couleur et la transparence sont associées à un modèle optique nécessaire pour la gestion de l'illumination de la scène 3D. Le modèle utilisé classiquement en "volume rendering" a été proposé par Phong [Phong, 1975]. Ce modèle permet de calculer les propriétés de lumière pour chaque voxel I_{phong} selon 3 composantes de lumière : ambiante, diffuse et spéculaire (Equation 4.5).

$$I_{phong} = I_{ambiant} + I_{diffus} + I_{spéculaire} \quad (4.5)$$

4.4.1.4 Exemples de rendus 3D

Le "volume rendering" permet une infinité de rendus 3D à partir d'un même jeu de données. Les composantes HSV (ou RGB), l'opacité, ou encore les propriétés géométriques et d'éclairage de la scène 3D sont autant de paramètres intervenant dans le rendu final.

Ces possibilités de visualisation sont intéressantes pour mettre en évidence différents tissus ou organes dans des images de tomographie. La Figure 4.13 illustre les applications du "volume rendering" à l'imagerie du corps entier de souris en CT.

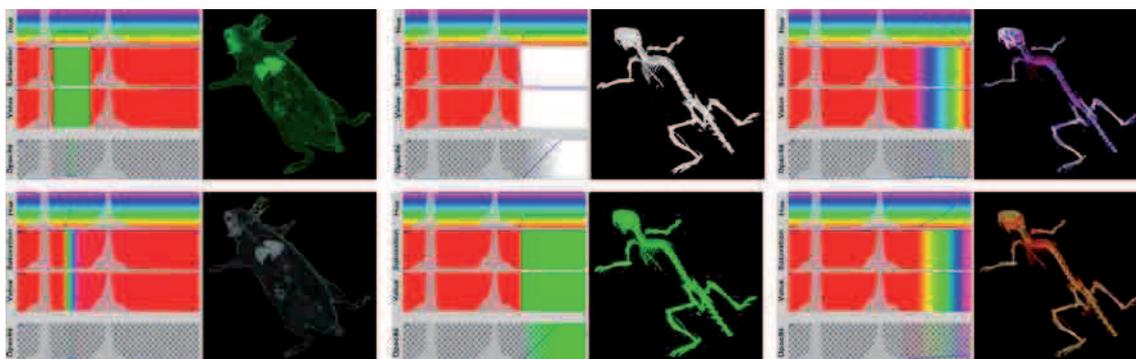


FIGURE 4.13 – Exemple de fonction de transfert pour les composantes HSVA (du haut vers le bas) et le rendu correspondant à partir des données 3D d'une souris

En jouant sur les paramètres, il est possible de masquer ou de rendre transparent le squelette de l'animal scanné. On peut remarquer sur la Figure 4.13 que des légères modifications d'un seul de ces paramètres peut générer un rendu très

différent. Il faut donc être prudent dans la définition des fonctions de transfert et dans l'interprétation des rendus 3D.

La Figure 4.14 illustre les applications du "volume rendering" à l'imagerie de la mandibule de souris en micro-CT. On peut noter les variations de rendus 3D engendrées par les modifications de fonctions de transfert.

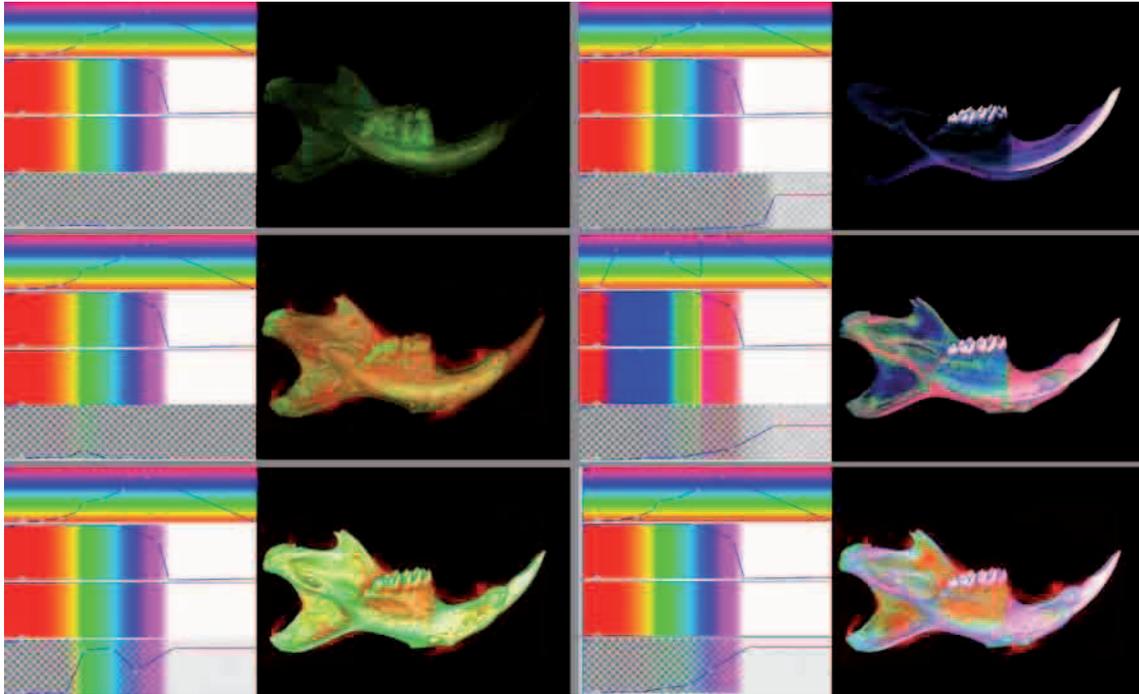


FIGURE 4.14 – Différents rendus 3D obtenus à partir d'une même mandibule avec plusieurs fonctions de transfert. Pour chaque rendu, les composantes des fonctions de transfert sont données verticalement de haut en bas en HSVA

4.4.2 Définitions des fonctions de transferts spécifiques à la mandibule de souris

L'analyse des histogrammes réalisée précédemment a permis d'identifier des plages de valeurs de gris différentes entre les souris KO et les souris WT (Figure 4.15). Ces différences de niveaux de gris correspondent indirectement à des différences de densité des tissus minéralisés. Les fonctions de transfert ont été établies en se focalisant sur ces plages de densités. Les tissus faiblement denses ont été rendus plus rouges et plus transparents et l'émail opaque et blanc (Figure 4.16). Les fonctions de transferts ainsi définies ont été appliquées à tous les échantillons de données.

4.4.3 Coupes virtuelles à travers la mandibule

Nous avons réalisé des coupes virtuelles de la mandibule entre les deux premières molaires (Figure 4.17).

Les coupes virtuelles associées au "volume rendering" montrent l'hétérogénéité de la répartition des densités du tissu minéralisés (Figure 4.18)

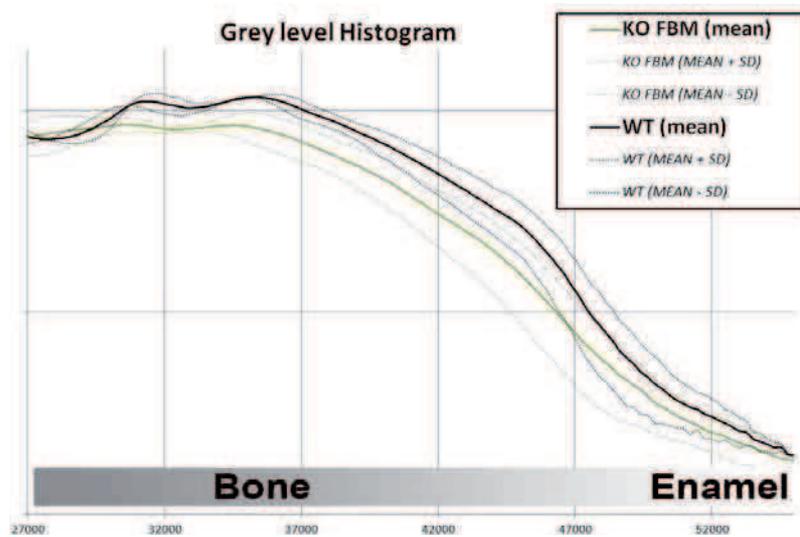


FIGURE 4.15 – Zoom sur une partie des histogrammes moyens de souris KO et WT

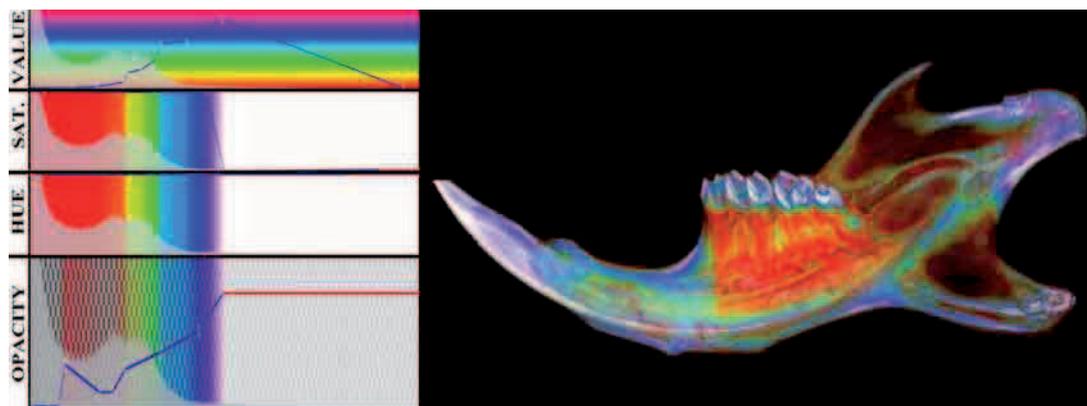


FIGURE 4.16 – Fonctions de transfert mises en évidence pour l'analyse de la mandibule (à gauche) et rendu 3D correspondant (à droite)

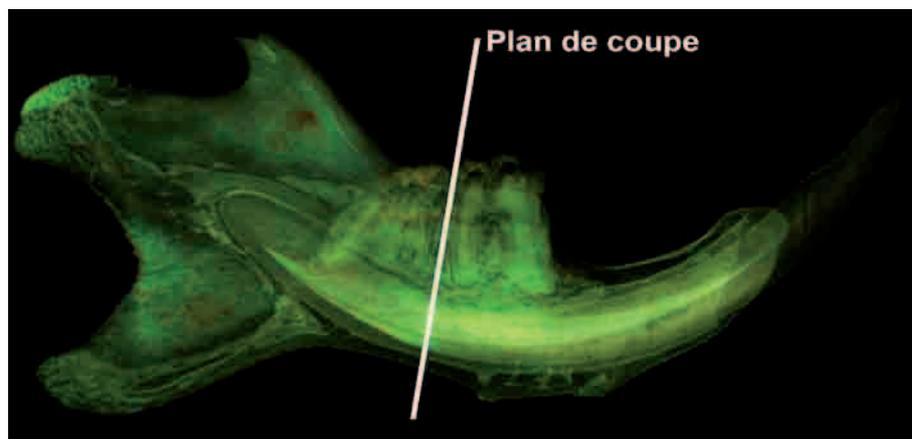


FIGURE 4.17 – Plan de la coupe virtuelle entre les deux premières molaires

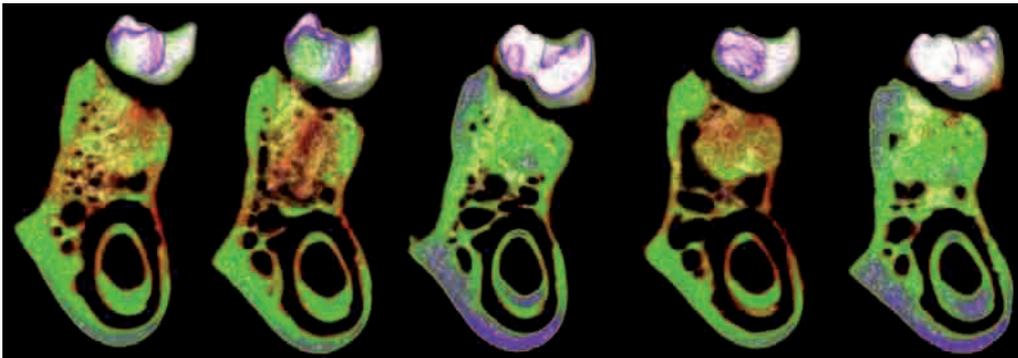


FIGURE 4.18 – Exemples de coupes virtuelles obtenues entre les deux premières molaires de la mandibule

4.5 Analyse quantitative de la structure des dents

Notre objectif a été de développer un outils d'imagerie qui permettent d'extraire le volume de la chambre pulpaire des molaires de souris (Figure 4.19). Cette mesure permet d'apporter des informations sur la formation de la dentine (dentino-génèse).

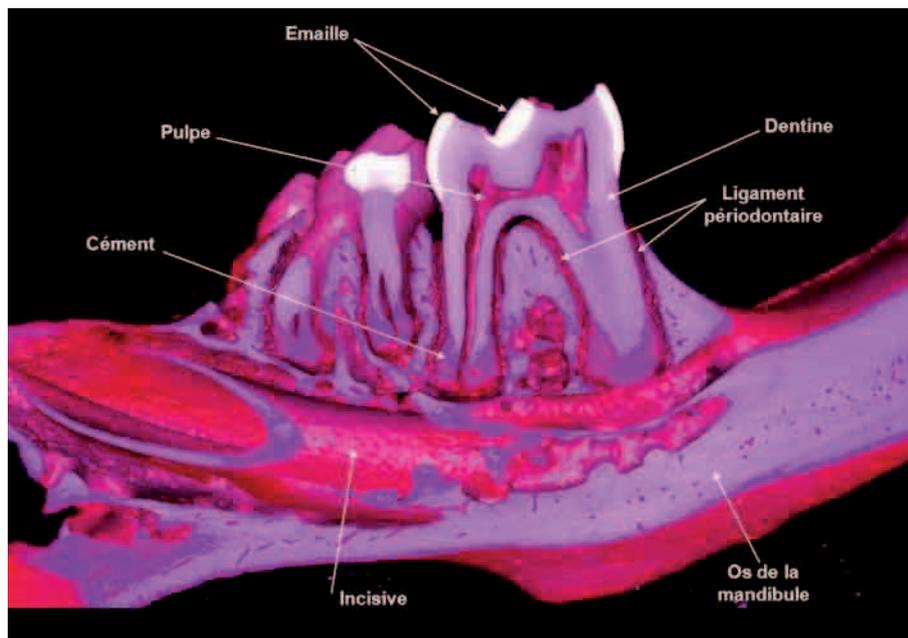


FIGURE 4.19 – Coupe virtuelle de la mandibule au niveau des molaires et à travers l'incisive (illustration obtenue à partir de tomographie synchrotron distinctes des données micro-CT discutées dans ce chapitre)

Une région d'intérêt ("Region Of Interest" : ROI) est un sous volume de l'ensemble de données 3D. La définition d'une ROI par dessin manuel des contours dans les images 2D est une méthode simple et couramment utilisée. L'utilisateur doit définir des contours dans toutes les coupes décrivant le volume, opération longue et peu reproductible. C'est pourquoi des méthodes d'interpolation ont été développées

afin de minimiser le nombre de contours à dessiner (Figure 4.20).



FIGURE 4.20 – Principe de l'interpolation des ROI entre deux contours initiaux. Sur les deux exemples, les deux contours extérieurs représentent les contours définis par l'utilisateur et les deux contours intérieurs correspondent aux contours interpolés automatiquement sur des coupes intermédiaires

La Figure 4.21 illustre cette méthode appliquée à la définition du volume pulpaire dans des coupes 2D issues de l'imagerie micro-CT de la mandibule. Vu la complexité 3D de la forme des molaires, un grand nombre de contours est nécessaire, ce qui limite l'intérêt de cet approche.



FIGURE 4.21 – Exemple de définition de ROI pour l'extraction du volume pulpaire (en haut) et zone pulpaire mise en évidence en blanc après binarisation (en bas)

Afin d'augmenter la rapidité et la précision de la mesure 3D du volume pulpaire, nous avons développé une méthode de segmentation automatisée.

La zone pulpaire est bien appropriée pour l'utilisation de méthode de type "region growing". En effet, la région à extraire est une zone (quasi) fermée pour laquelle les gradients de densité et donc de niveaux de gris sont importants à l'interface entre pulpe et dentine. Le principe de la méthode de type "region growing" est d'initialiser la segmentation à partir d'un "germe" ("seed") à l'intérieur de l'objet à segmenter. Typiquement, le "germe" est une région composée de un ou plusieurs voxels. L'étape suivante consiste à évaluer si les voxels voisins du "germe" doivent être considérés ou

non à l'intérieur de la région. Ce processus est répété tant que des nouveaux voxels peuvent être ajoutés à la région ou qu'un critère d'arrêt défini. Un exemple de segmentation de ce type basé sur l'utilisation de seuils fixes ("connected threshold") est illustré sur la Figure 4.22.

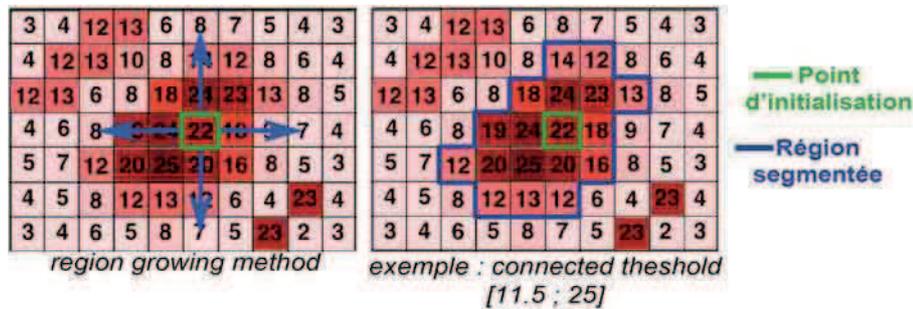


FIGURE 4.22 – Principe des méthodes de segmentation par croissance de région ("region growing"). Illustration de la méthode "connected threshold" basée sur des seuils fixes

Les principales différences entre les méthodes de "region growing" résident dans le choix du critère utilisé pour décider de l'appartenance du voxel à l'objet, et du type de connectivité choisi pour la modélisation du voisinage. La méthode "confidence connected" utilise des seuils dynamiques qui sont ajustés à chaque itération en fonction de la valeur moyenne (μ) et de l'écart type (σ) d'une zone centrée sur la région segmentée à l'étape précédente. Un voxel doit appartenir à l'intervalle $[\mu - \lambda\sigma; \mu + \lambda\sigma]$ (avec λ une constante). Cette méthode illustrée sur la Figure 4.23 présente l'avantage de ne pas demander de paramètres à l'utilisateur.

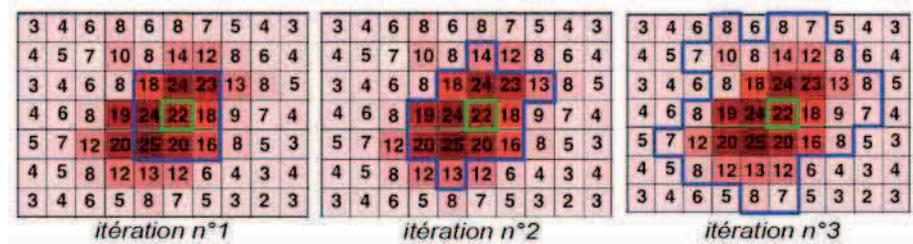


FIGURE 4.23 – Illustration de la méthode "confidence connected"

Nous avons utilisé ce type de segmentation en développant un outil nécessitant une initialisation manuelle des germes. Une interface permettant la navigation dans le volume 3D à partir d'une visualisation de type "Multi Planar Representation" (MPR) a été développée à partir de la librairie VTK [Schroeder and Lorensen, 1996]. L'utilisateur doit sélectionner au sein du volume un point d'initialisation dans le volume pulpaire. La méthode de "region growing" implémentée à partir de la librairie ITK [Ibanez et al., 2005] permet ensuite d'isoler le volume pulpaire.

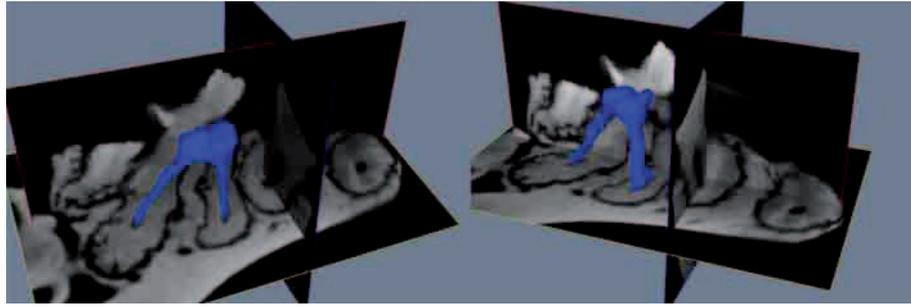


FIGURE 4.24 – Illustration de l'extraction du volume pulpaire (en bleu) de la deuxième molaire par la méthode de "region growing"

On remarquera sur la Figure ?? que les niveaux de gris ne présentent pas une très bonne dynamique. La partie externe de la couronne de la molaire qui est principalement constituée d'émail (très dense) devrait apparaître plus blanche. Ce résultat dans nos images est du à la fois aux paramètres d'acquisition de la source et de la résolution choisie. Nous avons en effet adapté la résolution de l'imagerie à la mandibule entière. Avec cette définition, les images de la zone de l'émail illustrent clairement l'effet de volume partiel. Les niveaux de gris de l'émail sont moyennés avec ceux de la dentine. On distingue bien un gradient de niveaux de gris mais pas la rupture franche comme sur l'image obtenue en synchrotron de la Figure 4.19. C'est en partie pour cette raison que nous n'avons pas mesuré le volume de la dentine qui aurait été biaisée par cet effet.

4.5.1 Article : "3D visualization and quantification of bone and teeth mineralization for the study of osteo/dentinogenesis in mice models"

Dans cet article, présenté oralement à la conférence SPIE Medical Imaging, Orlando 2011, nous montrons que :

- l'imagerie micro-CT couplée à la visualisation 3D en "volume rendering" est un outil de choix pour l'analyse des tissus minéralisés de la mandibule de souris
- la précision des images 3D rivalise avec celle des images d'histologie en apportant une dimension supplémentaire
- les méthodes automatisées de segmentation permettent une analyse quantitative de la chambre pulpaire des molaires pour mesurer la dentinogénèse

3D visualization and quantification of bone and teeth mineralization for the study of osteo/dentinogenesis in mice models

A. Marchadier^a, C. Vidal^b, S. Ordureau^c, R. Lédée^a, C. Léger^a, M. Young^d, M. Goldberg^b

^a Institut PRISME, UPRES EA n°4229, 12 rue de Blois, 45067 Orléans, France

^b Institut Pasteur and INSERM U747, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris

^c UsefulProgress, 23 rue d'Anjou, 75008 Paris, France

^d NIDCR, NIH Bethesda, MD USA

ABSTRACT

Research on bone and teeth mineralization in animal models is critical for understanding human pathologies. Genetically modified mice represent highly valuable models for the study of osteo/dentinogenesis defects and osteoporosis. Current investigations on mice dental and skeletal phenotype use destructive and time consuming methods such as histology and scanning microscopy. Micro-CT imaging is quicker and provides high resolution qualitative phenotypic description. However reliable quantification of mineralization processes in mouse bone and teeth are still lacking. We have established novel CT imaging-based software for accurate qualitative and quantitative analysis of mouse mandibular bone and molars.

Data were obtained from mandibles of mice lacking the Fibromodulin gene which is involved in mineralization processes. Mandibles were imaged with a micro-CT originally devoted to industrial applications (Viscom, X8060 NDT). 3D advanced visualization was performed using the VoxBox software (UsefulProgress) with ray casting algorithms. Comparison between control and defective mice mandibles was made by applying the same transfer function for each 3D data, thus allowing to detect shape, colour and density discrepancies. The 2D images of transverse slices of mandible and teeth were similar and even more accurate than those obtained with scanning electron microscopy. Image processing of the molars allowed the 3D reconstruction of the pulp chamber, providing a unique tool for the quantitative evaluation of dentinogenesis.

This new method is highly powerful for the study of oro-facial mineralizations defects in mice models, complementary and even competitive to current histological and scanning microscopy approaches.

Keywords: micro-CT, volume rendering, region-growing segmentation, mouse mandible, bone mineralization.

1. INTRODUCTION

Research on bone and teeth mineralization in animal models is critical for understanding human pathologies. Genetically modified mice are highly valuable models for research on bone and tooth mineralization, and for better understanding of human bone and teeth pathologies [1]. Current investigations on mice dental and skeletal phenotype use destructive and time consuming methods such as histology and scanning microscopy. Micro-CT imaging is quicker and provides high resolution qualitative phenotypic description.

However reliable quantification of mineralization processes in mouse bone and teeth are still lacking. We have established novel CT imaging-based software for (i) accurate qualitative and quantitative analysis of mouse mandibular bone, (ii) 3D reconstruction of molar pulp chamber, providing a unique tool for the quantitative evaluation of dentinogenesis.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Method overview

A micro-CT, originally devoted to industrial applications, was used to obtain high resolution 3D images of mouse mandibles. Before data analysis, grey level calibration was achieved. Qualitative and quantitative analysis were computed allowing complex visualization and 3D measurements (Figure 1).

Medical Imaging 2011: Biomedical Applications in Molecular, Structural, and Functional Imaging,
edited by John B. Weaver, Robert C. Molthen, Proc. of SPIE Vol. 7965, 79650J · ©
2011 SPIE · CCC code: 0277-786X/11/\$18 · doi: 10.1117/12.878251

Proc. of SPIE Vol. 7965 79650J-1



Figure 1: Method overview for qualitative and quantitative analysis of mandibles

2.2 Mandible samples

Data were obtained from mandibles of mice lacking the Fibromodulin gene (KOFM mice 10 weeks old), which is known to be involved in mineralization processes [2], and compared to wild type mice (16 mice/group).

2.3 Micro-CT imaging

For high-resolution 3D imaging of mandibles, we used a micro-CT originally devoted to industrial applications (Viscom, X8060 NDT). The X-Ray source, designed with a molybdenum target, was set up with a voltage of 60kV and a current of 200 μ A. The exposure time was 1sec per frame. Mandible 3D images had an isotropic resolution of 13 μ m and a dynamic range of 16 bits.

2.4 Calibration of grey levels

Contrasts in grey levels of CT images rely on differential attenuations of X-Rays through the material. Theoretically, only monochromatic X-Ray beam, as in synchrotron, can lead to a direct linear relation between grey level and density [3]. The micro-CT X-Ray beam is polychromatic and may give rise to artifactual variations of the grey scale. The principal artifact, beam hardening effect, leads to variations of grey level with the size of sample [3]. Different methods are available for beam hardening correction [4,5,6,7]. After correction, the relation between grey level and densities could be calibrated by a linear approximation [8,9].

For the tomographic reconstruction process, we used an option of the dedicated software (Viscom software) that allowed beam hardening correction. In order to obtain an accurate comparison between the mandibles of the two groups of mice, we performed a systematic calibration of the CT images. Two references were used (i) the enamel at the tip of the incisor, the density of which is constant in all mice, (ii) the background grey level. Histograms of 3D images were then corrected according to the defined references. This correction protocol consisted on a shift/scale operation (Figure 2).

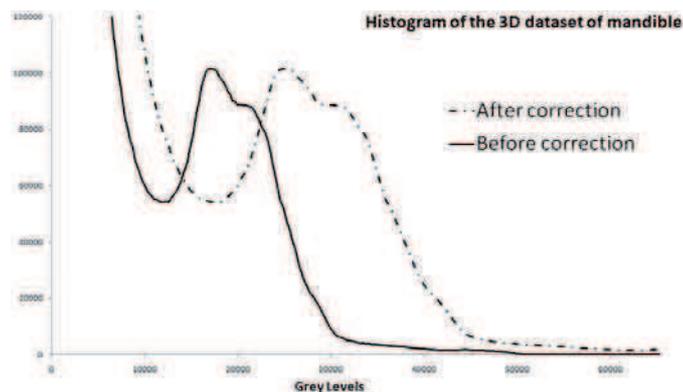


Figure 2 : Histograms of the whole mandible dataset before and after correction

2.5 Visualization with volume rendering

Volume rendering is a well known technique used to visualize 3D discretely sampled datasets [10]. This technique is particularly suitable to render images acquired by a CT, MRI, or MicroCT. In contrast to surface rendering, that need first primitive extraction (as for example an isosurface), volume rendering allows direct voxels visualization with opacity and color.

Implementation of volume rendering with a ray casting method, available in the VoxBox software (UsefulProgress), was used for advanced visualization of mandibles. Comparison between control and defective mouse mandibles was made by applying the same transfer function for each 3D data, thus allowing to detect shape, colour and density discrepancies.

We defined four transfer functions : one for opacity and three for color in a HSV space as illustrated in Figure 3 :

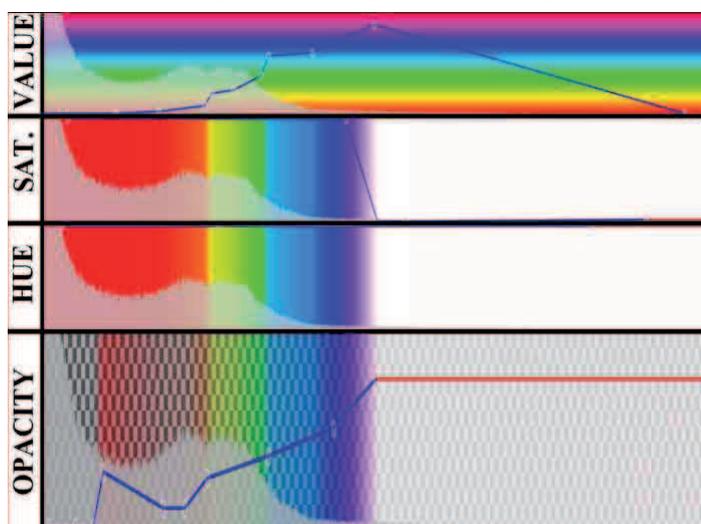


Figure 3 : Transfer functions for opacity and HSV used for volume rendering

Two different views were computed : a sagittal orientation of the whole mandible and a thick region of interest in a frontal orientation located between the first molar and the second molar (Figure 4).

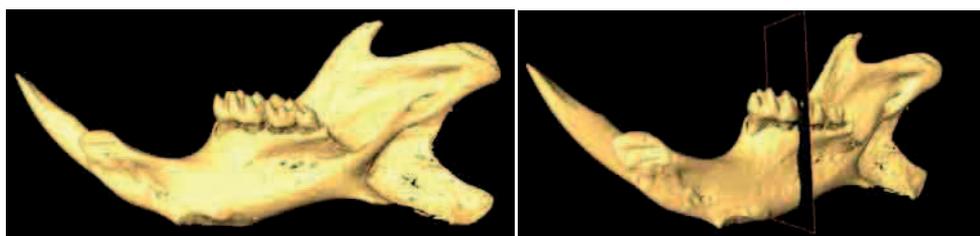


Figure 4 : Sagittal view of a mandible (left) and junction between the first and the second molar (right)

2.6 Pulp chamber volume

The pulp chamber of the molar refers to the inner most portion of the tooth that contains the pulp. It constitutes a 3D closed region suitable for region growing method segmentation. We used the connected threshold image filter available in the Insight Toolkit [11] to extract the pulp chamber volume.

Three parameters were set as input: two thresholds of grey level and a 3D seed point.

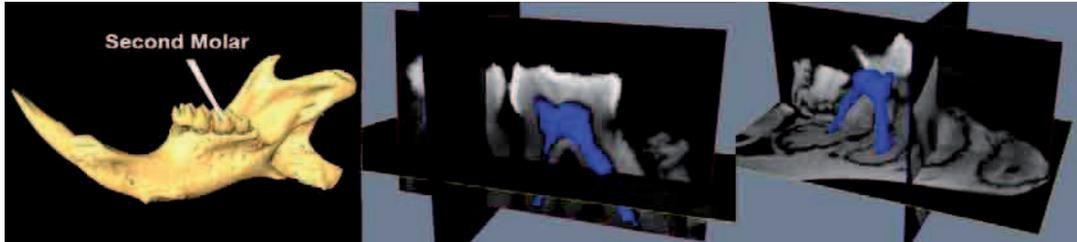


Fig 5: Region growing segmentation of the pulp chamber of the second molar

3. RESULTS

3.1 Qualitative results

Volume rendering visualization allowed to identify three distinct parts forming the mandible as shown in Figure 6. The distal part is the most mineralized module. The central part is subdivided into an upper zone containing the three molars implanted in an alveolar bone, whereas in the lower part the basal bone encircled the incisor. The proximal part includes endochondral-derived domains: the angular, condylar and coronoid processes. The dark brown color indicates that this area is thinner and consequently less mineralized than the rest of the mandible.

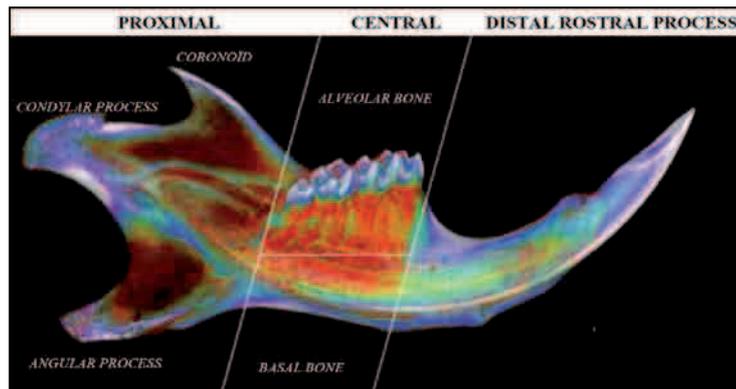


Figure 6 : Volume rendering visualization showing the different regions of a mandible

The qualitative analysis of the mineralization distribution revealed a severe hypomineralization KOFM mice as shown in Figure 7 :

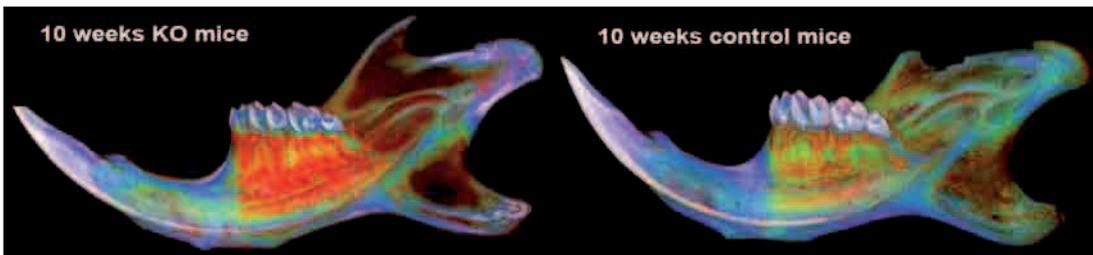


Fig 7: Volume rendering visualization of the mandibles of a KOFM (left) and a control mouse (right). The KOFM mandible showed reduced mineralization in the condylar (posterior) part of the mandible, alveolar bone area (around the roots of the molars) and in the basal bone around the incisor

The proximal part of the mandible is less mineralized in KOFM than in WT mice. Hypomineralization is also observed in the alveolar bone (upper middle) but became undetectable in the basal and rostral parts of the mandible.

Transverse virtual slices across the mandible allow to analyze the inner structure of the alveolar bone surrounding the molar roots. The virtual slices, at the junction of the first and second molars, are similar and even more accurate than those obtained with scanning electron microscopy, e.g. revealing the detailed range of mineralization defects of the alveolar bone (Figure 8).

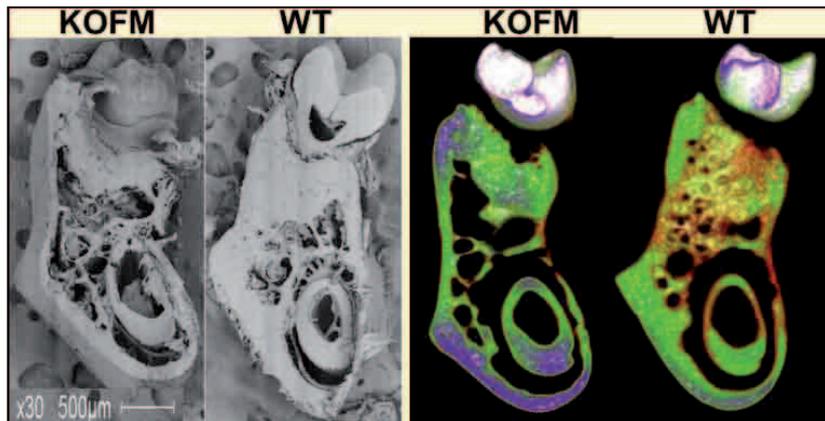


Fig 8: Comparison of 2D slices across the mandible using scanning microscopy (left) and micro-CT (right). Micro-CT images allowed precise visualization of hypomineralized areas in KOFM slices, rivalizing with scanning microscopy

The marrow spaces of the medulla (trabecular zone) are larger in the KOFM mice compared with the WT. No difference is noted for the cortices.

3.2 Quantitative results on molars

The segmentation method allowed the 3D reconstruction and quantification of the entire pulp chamber volume of molars. As described in Figure 9, KOFM mice showed a statistically significant larger volume in as compared to control mice thus revealing for the first time a defect in dentinogenesis. Morphological changes, in the length of the roots, were also observed (Figure 9 on right).

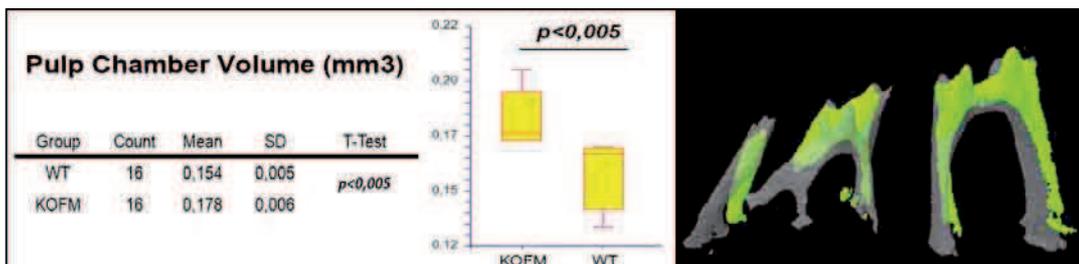


Fig 9: Statistical results of pulp chamber volumes comparison (left) and 3D reconstruction (right) of pulp chamber volumes of KOFM (grey) and control mice (yellow)

4. CONCLUSIONS

The present imaging analysis is highly powerful for the study of oro-facial mineralization defects in mice models, complementary and even competitive to current histological and scanning microscopy approaches.

This methodology constitutes a new tool for the study of mineralization defects, providing rapid and high resolution imaging and quantitative correlates of phenotypic alterations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the IRP Program of the NIDCR/NIH and by the Fondation de l'Avenir, Etude N° ETO-576.

REFERENCES

- [1] L. Ameye, M.F. Young, "Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases", *Glycobiology* 12, 107–116 (2002)
- [2] M. Goldberg, D. Septier, A. Oldberg, M.F. Young, L.G. Ameye, "Fibromodulin-deficient mice display impaired collagen fibrillogenesis in predentin as well as altered dentin mineralization and enamel formation", *Journal of Histochem Cytochem* 54, 525-537, (2006)
- [3] M. Ito, "Assessment of bone quality using micro-computed tomography (micro-CT) and synchrotron micro-CT", *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 23, 115-121 (2005)
- [4] R. Bock, S. Hoppe, H. Scherl, J. Hornegger, "Beam Hardening Correction with an Iterative Scheme Using an Exact Backward Projector and a Polychromatic Forward Projector", *Informatik aktuell*, 3, 46-50 (2007)
- [5] P. Stenner, B. Schmidt, T. Allmendinger, T. Flohr, M. Kachelriebe, "Dynamic Iterative Beam Hardening Correction (DIBHC) in Myocardial Perfusion Imaging Using Contrast-Enhanced Computed Tomography", *Investigative Radiology* Vol. 45 - Issue 6, 314-323 (2010)
- [6] Y. Kyriakou, E. Meyer, D. Prell, M. Kachelriebe, "Empirical beam hardening correction (EBHC) for CT", *Medical physics* 37 (2010)
- [7] P. Hammersberg, M. Mångård, "Correction for beam hardening artefacts in computerised tomography", *Journal of X-Ray Science and Technology* 8, 75-93 (1998)
- [8] B. Koller, A. Laib, "Calibration of micro-CT data for quantifying bone mineral and biomaterial density and microarchitecture", *Advanced Bioimaging Technologies in Assessment of the Quality of Bone and Scaffold Materials, Part I, I-1*, 79-84 (2007)
- [9] J. A. Meganck, K. M. Kozloff, M. M. Thornton, S. M. Broski, S. A. Goldstein, "Beam Hardening Artifacts in Micro-Computed Tomography Scanning can be Reduced by X-ray Beam Filtration and the Resulting Images can be used to Accurately Measure BMD", *Bone* 45(6), 1104–1116 (2009)
- [10] R. A. Drebin, L. Carpenter, P. Hanrahan, "Volume rendering", *SIGGRAPH Comput. Graph.* 22, 4 (June 1988)
- [11] ITK, Insight Toolkit, www.itk.org

4.6 Conclusion

"Volume rendering" sur la mandibule de souris L'imagerie micro-CT couplée aux outils que nous avons développés a permis de montrer pour la première fois la répartition différentielle de la minéralisation de la mandibule en 3 secteurs distincts (Figure 4.25) :

- une partie proximale relativement peu minéralisée dérivée de l'ossification endochondrale
- une partie centrale comprenant dans la zone supérieure l'os alvéolaire où sont implantées les trois molaires, la partie inférieure étant occupée principalement par l'incisive en croissance au sein de l'os basal
- la partie distale constituée principalement de l'incisive en fin de processus de minéralisation avec constitution de l'émail

La mise en évidence de cette répartition apporte un éclairage nouveau sur les processus d'ostéogenèse différenciés de la mandibule. De plus la dentinogenèse de l'incisive, dont la croissance est continue, est clairement démontrée.

Histologie virtuelle Classiquement, l'analyse histologique du tissu minéralisé fait appel à des méthodes invasives pour obtenir des coupes des échantillons. La microscopie à balayage impose de réaliser des coupes de l'échantillon brut avec un microtome dont l'orientation n'est pas parfaitement contrôlée et donc peu reproductible.

L'imagerie par micro-CT permet de lever cette contrainte et de définir très précisément des plans de coupes virtuels et reproductibles. De plus la résolution des images en micro-CT est comparable à celle de la microscopie électronique (Figure 4.26).

Un autre avantage de cette démarche est d'apporter des informations sur les différences relatives de minéralisation au sein de l'os de la mandibule. Grâce aux codes couleur, sont mise en évidence des zones distinctes de minéralisation que ni la microscopie électronique ni l'histologie classique ne peuvent révéler.

Quantification du volume pulpaire pour l'étude de la dentinogenèse de la molaire de souris L'outil original que nous avons développé pour la segmentation de la chambre pulpaire présente l'intérêt d'obtenir une information quantitative sur le processus de fabrication de la dentine. Ce résultat est particulièrement utile pour l'analyse des modèles murins de pathologies de la dentinogenèse.

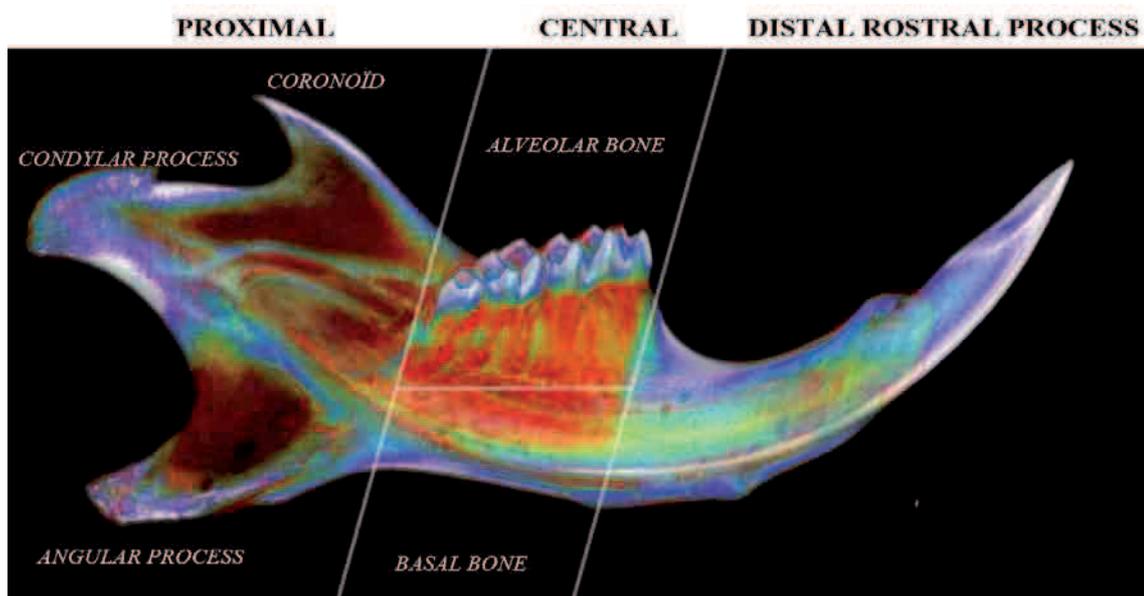


FIGURE 4.25 – Visualisation en "volume rendering" montrant différentes régions au sein de la mandibule

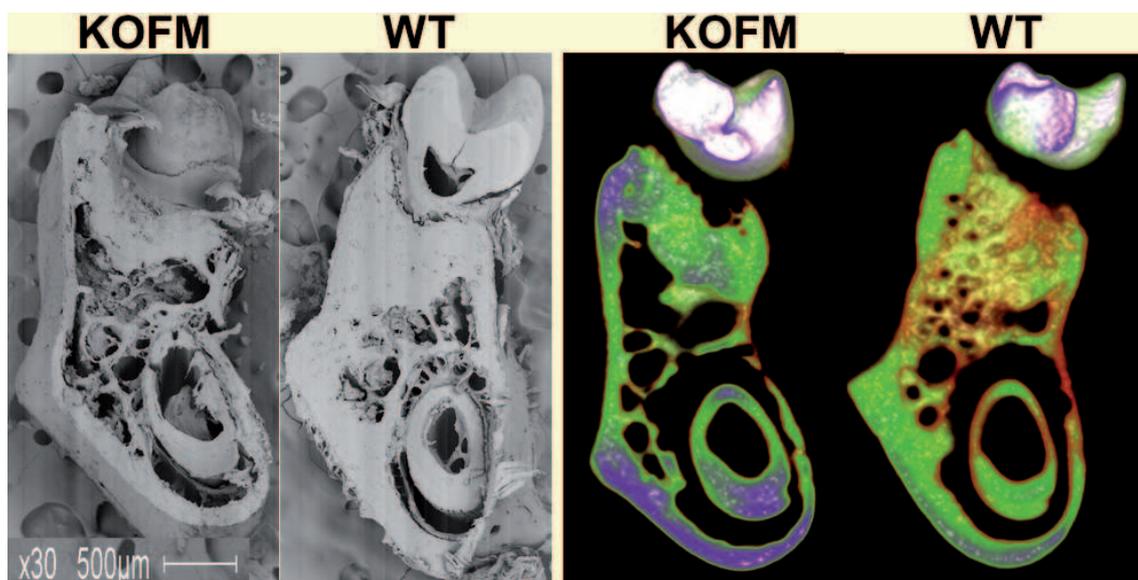


FIGURE 4.26 – Comparaison entre les images de coupes de mandibules obtenues en microscopie électronique à balayage et en micro-CT

Etude phénotypique de mandibules de souris invalidées pour le gène de la fibromoduline (Fmod-KO)

Collaborations :

- Michel Goldberg, INSERM U747, Paris
- Catherine Vidal, Institut Pasteur et INSERM U 747, Paris
- Yassine Harrichane, INSERM U747, Paris
- Agnès Kamoun-Goldrat, INSERM U747, Paris
- Odile Kellermann, INSERM U747, Paris
- Tina Kilts, NIDCR, NIH Bethesda, MD USA
- Marian Young, NIDCR, NIH Bethesda, MD USA

Sommaire

5.1	Introduction	88
5.2	Article : "Differential Effects of Fibromodulin Deficiency on Mouse Mandibular Bones and Teeth : A Micro-CT Time Course Study"	88
5.3	Discussion	96
5.4	Conclusion	98

5.1 Introduction

La fibromoduline est une protéine identifiée dans le cartilage, le tendon, la peau, la sclérotique de l'oeil et la cornée. Plusieurs études suggèrent que la fibromoduline joue un rôle dans la minéralisation osseuse et dentinaire en contrôlant la fibrillogénèse du collagène [Milan et al., 2005] [Font et al., 1998] [Matheson et al., 2005].

Chez les souris invalidées pour le gène de la fibromoduline (Fmod-KO), des pathologies de type ostéoporose ont été identifiées [Ameye and Young, 2002]. Une analyse des tissus dentaires par les techniques classiques de microscopie à balayage avait permis de montrer des anomalies de l'amélogénèse, de la dentinogenèse et de la formation de l'os alvéolaire chez les souris Fmod-KO nouveaux-nées et de 7 jours [Goldberg et al., 2006]. Les altérations phénotypiques apparaissaient moins nettes chez les souris Fmod-KO à 21 jours. Ces résultats pouvaient être dûs soit à des mécanismes de compensation du déficit en fibromoduline, soit à des limitations des techniques d'investigations utilisées [Goldberg et al., 2008].

Ces premières données nous ont incité à exploiter l'imagerie 3D par micro-CT pour poursuivre l'investigation du phénotype des souris Fmod-KO. Nous avons comparé le phénotype osseux et dentaire des mandibules de souris Fmod-KO de 3 et 10 semaines. L'imagerie 3D a conforté les observations histologiques de l'os alvéolaire et révélé de nouvelles altérations phénotypiques de la chambre pulpaire des molaires.

5.2 Article : *"Differential Effects of Fibromodulin Deficiency on Mouse Mandibular Bones and Teeth : A Micro-CT Time Course Study"*

Dans cet article nous montrons que :

- les coupes virtuelles par micro-CT dans l'os alvéolaire de la molaire de souris Fmod-KO révèlent des défauts de minéralisation en tout point comparables aux images de microscopie à balayage
- la mesure du volume de la chambre pulpaire révèle un défaut de dentinogenèse chez les souris fmo-KO
- l'imagerie 3D micro-CT est un outil de choix complémentaire des approches de microscopie classique pour la caractérisation phénotypique des souris Fmod-KO

Cells Tissues Organs
194(2-4) 85-348 (2011)

194 | 2-4 | 11

print
ISSN 1422-6405
ISBN 978-3-8055-9841-5

online
e-ISSN 1422-6421

www.karger.com/cto

Cells Tissues Organs

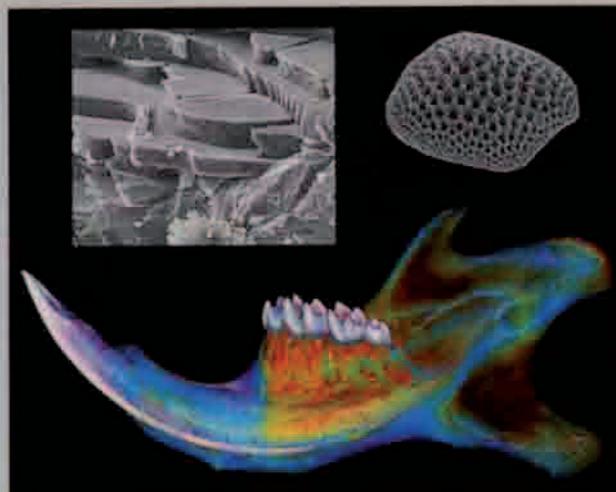
Advances in the Chemistry and Biology of Mineralized Tissues

Guest Editors

Harvey A. Goldberg
(London, Ont.)

Mary MacDougall
(Birmingham, Ala.)

Janet Moradian-Oldak
(Los Angeles, Calif.)



KARGER

S. Karger
Medical and Scientific Publishers
Basel - Freiburg - Paris
London - New York
New Delhi - Bangkok - Beijing
Tokyo - Kuala Lumpur
Singapore - Sydney

Differential Effects of Fibromodulin Deficiency on Mouse Mandibular Bones and Teeth: A Micro-CT Time Course Study

Michel Goldberg^a Arnaud Marchadier^a Catherine Vidal^{a,b} Yassine Harrichane^a
Agnès Kamoun-Goldrat^a Odile Kellermann^a Tina Kilts^c Marian Young^c

^aUMR-S U 747 INSERM, Université Paris-Descartes, Biomédicale des Saints-Pères, and ^bPasteur Institute, Paris, France;
^cNIH/NIDCR, Bethesda, Md., USA

© S. Karger AG, Basel
**PROOF Copy
for personal
use only**
ANY DISTRIBUTION OF THIS
ARTICLE WITHOUT WRITTEN
CONSENT FROM S. KARGER
AG, BASEL IS A VIOLATION
OF THE COPYRIGHT.

Key Words

Fibromodulin · Mandible · Molar · Micro-CT · Mineralization

Abstract

Fibromodulin (Fmod) is a keratan sulfate small leucine-rich proteoglycan which is enriched in bones and teeth. In order to determine its functions on bone and tooth mineralization we characterized the phenotype of Fmod-deficient (Fmod-KO) mice using a new-generation microfocus computerized tomography system (micro-CT) and software allowing advanced visualization of 3-D data. Three-week-old and 10-week-old Fmod-KO mandibles and teeth were compared with those of age-matched wild-type (WT) mice. In both young and mature mice the Fmod-KO mandibles were hypomineralized, especially the posterior (proximal) part of the mandible as it appeared to be the main target of the molecule deficiency whereas less extensive alterations were found in the alveolar bone. In transverse sections, larger marrow spaces were observed in the Fmod-KO mice compared with age-matched young or mature WT mice. Quantitative evaluation of the pulp volume of the first molar and 3-D reconstructions suggested that dentinogenesis was diminished in 3-week-old Fmod-KO teeth. In contrast, increased dentin formation was found in 10-week-old Fmod-

KO mice and it was accompanied by a reduced pulp volume. Thus, the differential effects of Fmod deficiency on bones and teeth appear to diverge in adult mice. This may result from the previously reported differences in the molecular weight of Fmod in the 2 tissues or from compensatory mechanisms due to the overexpression of DSP and DMP-1 in the dental pulp of Fmod-KO. It is also possible that a single molecule plays diverging roles in a tissue-specific or region-specific manner.

Copyright © 2011 S. Karger AG, Basel

Abbreviations used in this paper

Bgn	Biglycan
BSP	Bone sialoprotein
CS/DS	Chondroitin sulfate/dermatan sulfate
Dcn	Decorin
DMP1	Dentin matrix protein-1
DSP	Dentin sialoprotein
Fmod	Fibromodulin
KS	Keratan sulphate
micro-CT	Microfocus computed tomography system
PGs	Proteoglycans
SIBLINGs	Small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins
SLRPs	Small leucine-rich proteoglycans
WT	Wild type

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2011 S. Karger AG, Basel

Accessible online at:
www.karger.com/cto

Dr. Michel Goldberg
UMR-S U747 INSERM, Université Paris Descartes
Biomédicale des Saints Pères
45, rue des Saints-Pères, FR-75006 Paris (France)
Tel. +33 6 62 67 67 09, E-Mail michel.goldberg@parisdescartes.fr

Introduction

Small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) are structural proteins of the extracellular matrix, present in mineralized tissues, also involved in intracellular signal regulation. Five distinct families of SLRPs have been identified to date [Schaefer and Iozzo, 2008]. Class I includes decorin (Dcn) and biglycan (Bgn), 2 chondroitin sulfate/dermatan sulfate (CS/DS) proteoglycans (PGs) implicated in bone and dentin mineralization. Class II members contain primarily keratan sulfate (KS) and an undersulfated form of KS. Lumican, fibromodulin (Fmod), and osteoadherin are members of class II KS PGs. These 3 molecules have been identified in mineralized tissues [Embery et al., 2001]. In contrast, SLRPs that are members of class III to class V have not yet been detected in mineralized tissues and therefore are not considered here.

Gene-targeting studies on Dcn-, Bgn-, and Fmod-KO mice have established a link with dental and bone abnormalities and support the concept that these molecules play roles in the mineralization processes [Ameye and Young, 2002; Goldberg et al. 2005]. The roles of Fmod still need to be further deciphered. Our first approach was to map KS in dental tissues, and immunolocalization studies revealed a non-uniform distribution in predentin with a gradient, suggesting a potential role in dentin mineralization [Embery et al., 2001]. Using both light and electron immunohistochemistry on 1-day-old wild-type (WT) and Fmod-KO mice, we uncovered a potential role of this molecule in collagen fibrillogenesis [Goldberg et al., 2006]. Specifically, these studies showed that the diameter of collagen fibrils is larger in the predentin of Fmod-KO mice compared with WT mice. Additionally, these studies showed that dentin is hypomineralized and that there are structural defects in the forming dentin and enamel [Goldberg et al. 2006]. Further, enhanced immunolabeling was detected for 3 small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins (SIBLINGs) [Fisher and Fedarko, 2003], dentin sialoprotein (DSP), dentin matrix protein-1 (DMP1), and bone sialoprotein (BSP), suggesting the occurrence of compensatory mechanisms in dental tissues; this finding was confirmed by Western blotting [Goldberg et al., 2009].

Genetically modified mice are highly valuable models for research on bone and tooth mineralization and for a better understanding of human bone and tooth pathologies [Ameye and Young, 2002]. Normally, experimentation to evaluate dental and skeletal phenotypes involves destructive and time-consuming procedures. To improve

this process and, at the same time, reliably quantitate the mineralization process, we used a new-generation micro-focus computed tomography system (micro-CT) (Viscom, X8060 NDT). The Viscom system provides an optimal compromise between spatial resolution, acquisition time, and high-quality imaging. The dedicated software (VoxBox; UsefulProgress) allows advanced visualization of 3-D data with ray-casting algorithms. Micro-CT imaging is quicker and provides high-resolution qualitative and phenotypic analysis. Consequently, we investigated the effects of Fmod deficiency on mouse mandibles and obtained: (i) an accurate qualitative and quantitative analysis of the mandibular bone, (ii) a 3-D reconstruction of the pulp of the molar (a new approach for the quantitative evaluation of dentinogenesis), and (iii) a time-course study which was carried out in order to determine whether the effects of the gene targeting are permanent or, rather, transient. Therefore, teeth and mandibles from 3- and 10-week-old Fmod-KO mice were compared with age-matched WT mice.

Materials and Methods

All experiments were performed under an institutionally approved protocol for the use of animals in research (No. NIDCR-IRP-09-536). Fmod-KO mice were generated by gene targeting in embryonic stem cells. All mice were genotyped by PCR analysis using DNA isolated from a small tail biopsy as previously described. Data obtained from mandibles of 3- and 10-week-old Fmod-KO mice were compared with age-matched WT mice (16 mice/group).

Micro-CT Imaging

To improve this process and at the same time reliably quantitate the mineralization process, for high-resolution 3-D imaging of mandibles we used a new-generation micro-CT originally devoted to industrial applications (Viscom, X8060 NDT). The Viscom system provides an optimal compromise between spatial resolution, acquisition time, and high-quality imaging. The dedicated software (VoxBox; UsefulProgress) allows advanced visualization of 3-D data with ray-casting algorithms. X-ray source parameters were: 60 kV, 200 μ A, and an exposure time of 1 s for each frame. Mandible 3-D images had an isotropic resolution of 13 μ m and a dynamic range of 16 bits.

Calibration of Grey Levels

Contrasts in grey levels of CT images relied on differential attenuations of X-rays through the material. Theoretically, a monochromatic X-ray beam will give a direct relation between grey level and density. Because the micro-CT X-ray source is polychromatic, it could give rise to artifactual variations of the grey scale. Therefore, in order to obtain an accurate comparison between the mandibles of the 2 groups of mice, we performed a systematic calibration of the CT images. Two references were used: (i) the

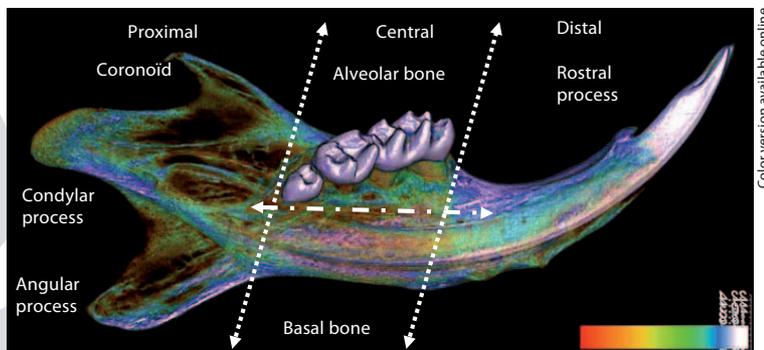


Fig. 1. Micro-CT imaging of the mandible clearly shows the 3 different domains with an unequally distributed pattern of thickness and mineralization.

enamel at the tip of the incisor, the density of which is constant in all mice, and (ii) the background grey level. Each mandible histogram was checked for its grey scale level and shifted if necessary according to the defined references before proceeding to the 3-D reconstruction.

Visualization with Volume Rendering

We used VoxBox software (UsefulProgress) for the advanced visualization of 3-D datasets with ray-casting algorithms. Comparison between control and mutant mouse mandibles was made by applying the same transfer function for each 3-D data set, thus allowing the detection of shape, color, and density discrepancies. The same protocol was used to visualize 2-D virtual slices across the mandible.

Dental Pulp Volume and 3-D Reconstruction

The dental pulp of the molar refers to the inner most portion of the tooth that contains the crown and root pulp (also including in the calculation a very thin predentin layer). It constitutes a 3-D closed region and we used the connected threshold image filter available in the Insight Toolkit to extract the 'pulp' volume.

Results

Different Domains of the Mandible and Identification of the Target of Fmod Deficiency

The mouse mandible has long served as a model system for complex morphological structures. According to Klingenberg et al. [2004], the mandible consists of 2 main modules, i.e. the alveolar region and the ascending ramus. This appears to be an oversimplification, and the images of the mouse mandible obtained by micro-CT followed by 3-D advanced visualization using VoxBox software showed a more complex organization. Three distinct parts formed the mandible. The distal or rostral (anterior) part differed from the central part and represents the most mineralized module. The central part was sub-

divided into an upper zone containing the 3 molars implanted in an alveolar bone, whereas in the lower part the basal bone encircled the incisor. The posterior (proximal) part included endochondral-derived domains: the angular, condylar, and coronoid processes. The dark brown color indicates that this area is thinner and consequently reflects less mineralization than the rest of the mandible (fig. 1).

The main target of Fmod deficiency was the posterior (proximal) part of the mandible, including condylar, coronoid, and angular processes, which was less dense in 3-week-old Fmod-KO mice compared with the WT. This was also detectable in the alveolar bone (upper middle) but became undetectable in the basal and rostral parts of the mandible (fig. 2a, b). The difference between Fmod-KO and the WT was reduced but still detected in the 10-week-old mice (fig. 2c, d).

Altogether, these findings indicate that (i) the mandible is a mosaic formed by different domains with an unequally distributed thickness and mineralization pattern and (ii) the proximal and alveolar parts of the mandible constitute the specific targets of Fmod deficiency.

Effects of Fmod Deficiency on the Medulla

In transverse sections of the mouse mandible virtually sliced exactly between the 1st and 2nd mandibular molars, the marrow spaces of the medulla (trabecular zone) were larger in the Fmod-KO mice compared with the WT. This broadening was observed both in the young (3-week-old) (fig. 3a, b) and in the mature (10-week-old) mice (fig. 3c, d). No difference was noted for the cortices. Therefore, bone hypomineralization was associated with the enlargement of endosteous spaces. There was no spontaneous repair or rescue of this phenotype during the aging process, at least for the period of time studied.

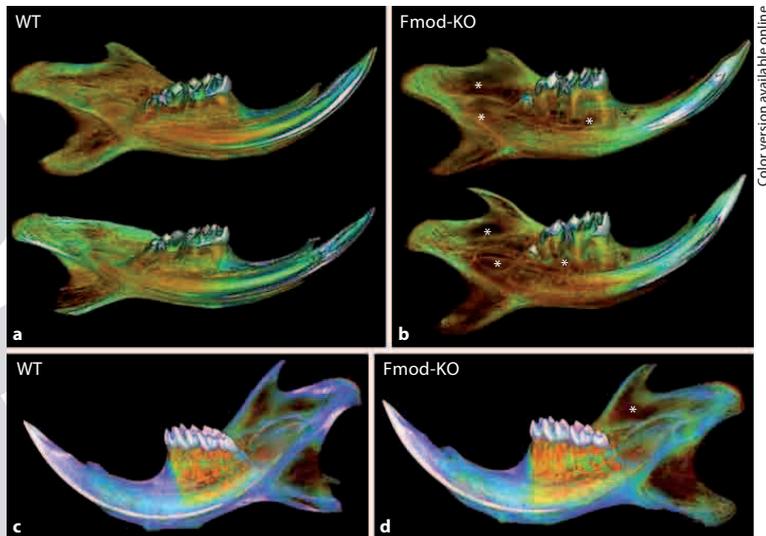


Fig. 2. **a** Three-week-old WT mice mandibles. **b** Three-week-old Fmod-KO mice mandibles. The target of the deficiency is clearly identified in the proximal and central alveolar bone (white asterisks), whereas the mandible is less affected by the deficiency in 10-week-old WT (**c**) and Fmod-KO (**d**) mice.

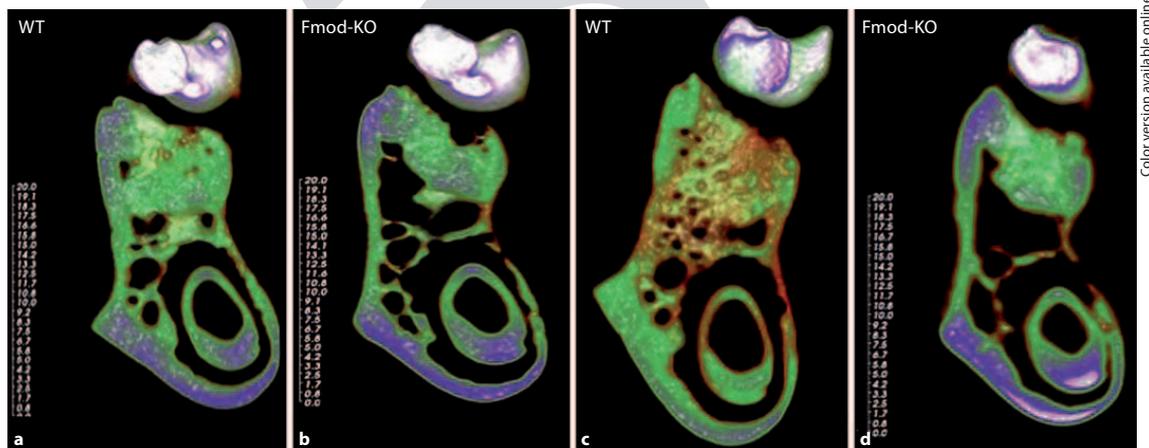


Fig. 3. Compared with 3-week-old mice WT mice (**a**) and 10-week-old WT mice (**c**), bone marrow spaces (in black) are larger in the medulla of 3-week-old (**b**) and 10-week-old Fmod-KO (**d**) mice.

3-D Reconstruction of the Pulp of the First Mandibular Molar

In 3-week-old Fmod-KO mice, 3-D reconstructions of the pulp showed there was reduced dentinogenesis because the volume of the pulp was larger, i.e. in the lower part of the root pulp (apical part). The length of

the roots was nearly identical in the Fmod KO and WT mice (fig. 4a, b, d). In contrast, in the 10-week-old mice, the length of the roots was shorter in the Fmod-KO group and the pulp volume was restricted, suggesting a reactivation of dentinogenesis at that time (fig. 4c).

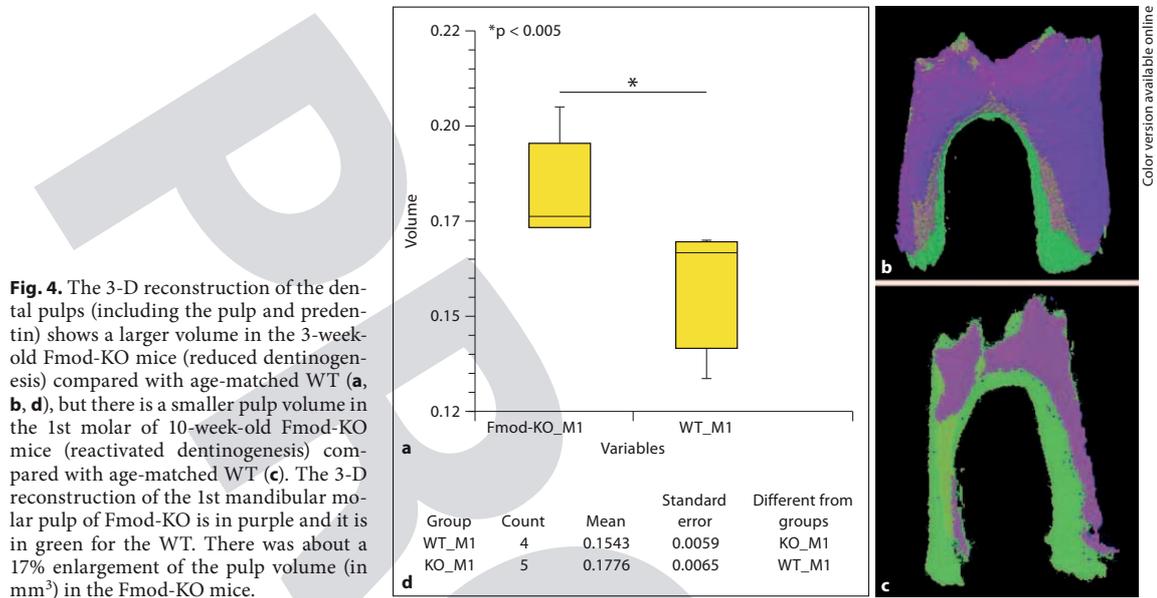


Fig. 4. The 3-D reconstruction of the dental pulps (including the pulp and predentin) shows a larger volume in the 3-week-old Fmod-KO mice (reduced dentinogenesis) compared with age-matched WT (a, b, d), but there is a smaller pulp volume in the 1st molar of 10-week-old Fmod-KO mice (reactivated dentinogenesis) compared with age-matched WT (c). The 3-D reconstruction of the 1st mandibular molar pulp of Fmod-KO is in purple and it is in green for the WT. There was about a 17% enlargement of the pulp volume (in mm³) in the Fmod-KO mice.

Discussion

For years there has been a debate about the functions of GAGs or PGs with regard to whether they are mineralization inhibitors or promoters; because GAGs are more abundant in osteoid and predentin, but are decreased in bone or in dentin, PGs were considered to be inhibitors that had to be enzymatically degraded before the onset of mineralization [Baylink et al., 1972; Hall et al., 1999; Embery et al. 2001]. Other reports established that CS/DS and KS PGs are present in mineralized tissues [Embery et al., 2001]. Radioautographic investigation first showed the occurrence of a dual incorporation of labeled PG precursors in dental tissues [Lormée et al., 1996]. One group of PGs is first secreted in the predentin and contributes to collagen fibrillogenesis. They are subsequently removed after enzymatic degradation. A second group of SLRPs secreted near the predentin-dentin junction is implicated in the mineralization processes and is further incorporated in the dentin as stable matrix components in the mineralized dentin. Previous studies on Bgn-, Dcn-, and Fmod-KO mice have implicated all of these molecules in dentin mineralization [Goldberg et al., 2005, 2006, 2009]. The present study confirms that Fmod influences the mineralization of bone and dental tissue.

This regulation may be due to the effect of SLRPs on collagen fibrillogenesis evidenced by the observation that larger diameters of collagen fibrils were present in the predentin of Bgn-KO and Fmod-KO teeth [Goldberg et al., 2005, 2006]. Despite some discrepancies in different reports related to the occurrence of thinner or larger diameters, depending on the site and organ studied, the influence of SLRPs on collagen cross-linking patterns during fibril growth is now well recognized [Kalamajski and Oldberg, 2010].

In this context, it is worth noting that Fmod-deficiency influences bone mineralization in both young and mature mice, whereas such effects become undetectable in dental tissues of 10-week-old Fmod-KO mice. This phenotypic change and diverging effect(s) of Fmod may be due to differences in the molecular weight of Fmod between the 2 tissues (in bone there is a single band at 52 kDa, whereas in teeth 2 bands are detected, i.e. one at 52 kDa and another at 40 kDa), related or not to the phosphorylation or glycosylation of the molecule, and/or to compensatory mechanisms that interfere with the mineralization process [Goldberg et al., 2009].

The micro-CT method used here allows, for the first time, mapping of the different domains of the mouse mandible. In this regard, it is important to note that the

rostral and basal parts of the mandible result from membranous ossification whereas the posterior part and alveolar bone derive from endochondral ossification. The parallel cross talk between the different domains, their level of mineralization, and the recognition of the territory influenced by Fmod imply that the loss of this PG can affect the chronologic activation of a series of specific genes, growth factors, and transcription factors which then regulate the formation of the mouse mandible.

It is now recognized that Fmod is critical in organizing niches of stem/progenitor cells [Bi et al., 2007]. In this context, the large marrow spaces seen in the medulla of the Fmod-KO mice may have a consequence in a reduc-

tion of the number of bone trabecula and consequently of endosteal progenitors. This may contribute to reducing the conversion of proosteoblastic cells into osteoblastic cells and finally to a reduction of new bone formation leading to the osteoporosis induced by Fmod deficiency [Ameye and Young, 2002].

Acknowledgements

This research was supported by the IRP Program of the NIDCR/NIH and by the Fondation de l'Avenir, Etude No. ETO-576.

References

- Ameye, L., M.F. Young (2002) Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology* 12: 107R-116R.
- Baylink, D., J. Wergedal, E. Thompson (1972) Loss of protein-polysaccharides at sites where bone mineralization is initiated. *J Histochem Cytochem* 20: 279-292.
- Bi, Y., D. Ehrirchiou, T.M. Kilts, C.A. Inkson, M.C. Embree, W. Sonoyama, L. Li, A.I. Leet, B.-M. Seo, L. Zhang, S. Shi, M.F. Young (2007) Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med* 13: 1219-1227.
- Embery, G., R. Hall, R. Waddington, D. Septier, M. Goldberg (2001) Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 12: 331-349.
- Fisher, L.W., N.S. Fedarko (2003) Six genes expressed in bone and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res* 44(suppl 1): 33-40.
- Goldberg, M., M. Ono, D. Septier, M. Bonnefoix, T.M. Kilts, Y. Bi, M. Embree, L. Ameye, M.F. Young (2009) Fibromodulin-deficient mice reveal dual functions for fibromodulin in regulating dental tissue and alveolar bone formation. *Cells Tissues Organs* 189: 198-202.
- Goldberg, M., D. Septier, A. Oldberg, M.F. Young, L.G. Ameye (2006) Fibromodulin-deficient mice display impaired collagen fibrillogenesis in predentin as well as altered dentin mineralization and enamel formation. *J Histochem Cytochem* 54: 525-537.
- Goldberg, M., D. Septier, O. Rapoport, R.V. Iozzo, M.F. Young, L.G. Ameye (2005) Targeted disruption of two small leucine-rich proteoglycans, biglycan and decorin, exerts divergent effects on enamel and dentin formation. *Calcif Tissue Int* 77: 297-310.
- Hall, R., D. Septier, G. Embery, M. Goldberg (1999) Stromelysin-1 (MMP-3) in forming enamel and predentine in rat incisor - coordinated distribution with proteoglycans suggests a functional role. *Histochem J* 31: 761-770.
- Kalamajski, S., A. Oldberg (2010) The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol* 29: 248-53.
- Klingenberg, C.P., L.J. Leamy, J.M. Cheverud (2004) Integration and modularity of quantitative trait locus effects on geometric shape in the mouse mandible. *Genetics* 166: 1909-1921.
- Lormée, P., S. Lécolle, C. Beaudin, D. Septier, M. Goldberg (1996) Dual incorporation of (35S) sulfate into dentin proteoglycans acting as mineralization promoters in rat molars, and predentin proteoglycans. *Calcif Tissue Int* 58: 368-375.
- Schaefer, L., R.V. Iozzo (2008) Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem* 283: 21305-21309.

5.3 Discussion

Hypominéralisation des mandibules des souris Fmod-KO On distingue clairement chez la souris Fmod-KO à 3 semaines des zones hypominéralisées (marquées par des astérisques sur la Figure 5.1 b et d) au niveau de l'os alvéolaire de la zone médiane et de la portion postérieure de la mandibule. À 10 semaines, les différences s'estompent sauf au niveau de la portion postérieure de la mandibule où elles restent bien marquées. De plus, l'os alvéolaire est en quantité moins importante ce qui a pour conséquence une altération de l'environnement radriculaire des molaires.

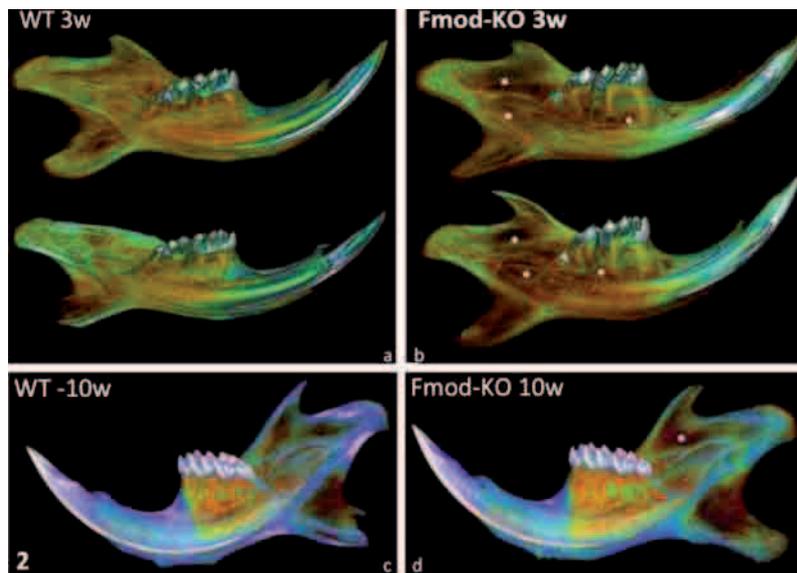


FIGURE 5.1 – Appréciation qualitative en "volume rendering" de la répartition de la minéralisation sur des mandibules de souris sauvages (a et c) et KO pour la fibromoduline (b et d) âgées de 3 (a et b) et 10 semaines (c et d)

Analyse de la zone médullaire sur les coupes virtuelles de la mandibule chez les WT et KO Des coupes virtuelles réalisées entre les deux premières molaires permettent de distinguer l'os cortical de l'os spongieux et des différences relatives de la répartition des densités entre les souris Fmod-KO et WT (Figure 5.2).

Chez les souris Fmod-KO, de 3 et 10 semaines, les lacunes osseuses occupent une surface plus importante que chez les souris WT à tel point que la table osseuse jugale apparaît très fine, et que certaines trabécules semblent en continuité avec l'espace ligamentaire de l'incisive. La comparaison avec la microscopie à balayage (ions rétrodiffusés) confirme la déminéralisation de l'os alvéolaire où s'insèrent les molaires chez les souris Fmod-KO. La résolution de l'imagerie par micro-CT permet une évaluation anatomique comparable à la microscopie. De plus elle présente l'avantage d'examiner des coupes définies précisément contrairement aux coupes utilisées en microscopie.

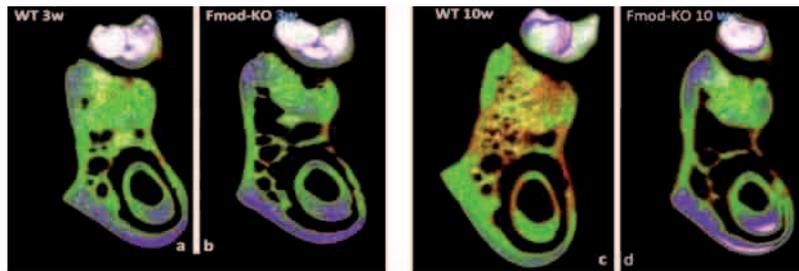


FIGURE 5.2 – Coupe virtuelles associées au "volume rendering" entre les deux premières molaires de la mandibule de souris WT (a et c) et KO (b et d) âgées de 3 (a et b) et 10 semaines (c et d)

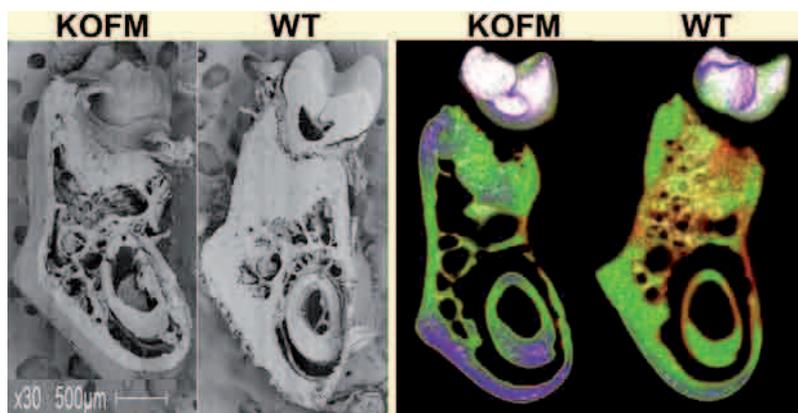


FIGURE 5.3 – Comparaison entre des images obtenues après section transversale de la mandibule de souris Fmod-KO (KOFM) et de souris sauvage (WT) par au microscope électronique à balayage (à gauche) et d'images non destructives obtenues par micro-CT (à droite)

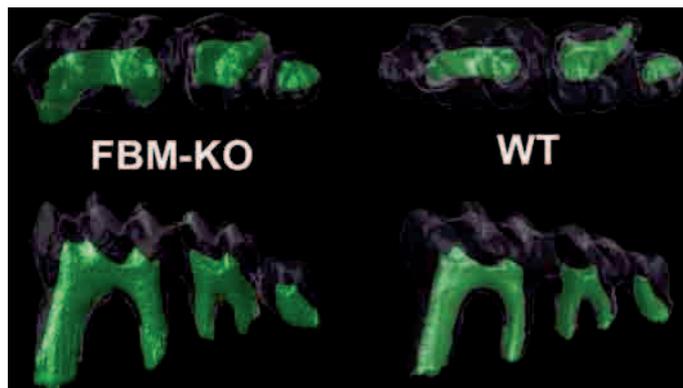


FIGURE 5.4 – Reconstruction 3D des molaires (en transparence) et de la pulpe des molaires

Augmentation du volume pulpaire des molaires des souris Fmod-KO âgées de 3 semaines Les outils d'imagerie par micro-CT ont permis pour la première fois d'obtenir une représentation 3D de la pulpe des molaires mandibulaires de souris Fmod-KO (Figure 5.4) et de quantifier le volume de la chambre pulpaire (Figure 5.5

à gauche).

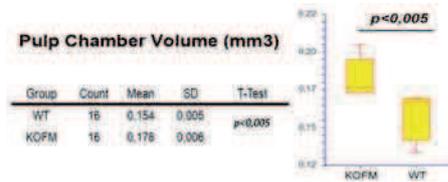


FIGURE 5.5 – Résultats des mesures de volumes pulpaire de la première molaire montrant une différence significative entre WT et KO

À 3 semaines, le volume pulpaire de la première molaire du groupe Fmod-KO est significativement plus important que celui du groupe contrôle (Figure 5.5). Le résultat suggère que l'absence de fibromoduline est associée à une diminution ou un ralentissement de la dentinogenèse. Ces résultats s'accordent avec les données obtenus par les techniques classiques de microscopie à balayage qui avait permis de détecter des anomalies de l'amélogenèse et de la dentinogenèse, chez les souris Fmod-KO nouveaux-nés et de 7 jours [Goldberg et al., 2006].



FIGURE 5.6 – Superposition des volumes pulpaire des souris WT et KO de 10 semaines

A 10 semaines, on ne trouve plus de différence significative de volume pulpaire entre les souris Fmod-KO et les WT. Ce résultat suggère qu'il existe chez les souris Fmod-KO des mécanismes de compensation de la dentinogenèse.

5.4 Conclusion

Notre étude réalisée à partir de données obtenues par micro-CT sur les souris Fmod-KO et WT a permis de valider les outils d'analyses qualitatives et quantitatives des tissus osseux et dentaires chez la souris. La possibilité d'évaluer les défauts de dentinogenèse via la reconstruction 3D et de mesurer le volume de la chambre pulpaire des molaires de souris apporte de nouvelles perspectives pour le suivi longitudinal des souris génétiquement modifiées, entre la formation initiale post-éruptive de la dent (3 semaines) et le stade adulte (10 semaines). On peut aussi envisager le recours à cette méthode pour l'évaluation des thérapies régénératives de la sphère oro-faciale [Lacerda-Pinheiro et al., 2008].

Chapitre **VI**

Etude de l'ostéolyse induite par des particules de polyéthylène

Collaborations :

- *Christophe Nich, B2OA, Faculté de Médecine Paris 7*
- *Catherine Vidal, Institut Pasteur et INSERM U 747, Paris*
- *Jean Langlois, B2OA, Faculté de Médecine Paris 7*
- *Morad Bensidhoum, B2OA, Faculté de Médecine Paris 7*
- *Hervé Petite, B2OA, Faculté de Médecine Paris 7*
- *Martine Cohen-Solal, INSERM U606, Paris*
- *Moussa Hamadouche, B2OA, Faculté de Médecine Paris 7*
- *Laurent Sedel, B2OA, Faculté de Médecine Paris 7*

Sommaire

6.1	Introduction	100
6.2	Etude A : ostéolyse induite par les particules de PE et interaction avec l'ovariectomie	101
6.2.1	Analyse des données 3D de la calvaria	101
6.2.2	Article : " <i>Decrease in Particle-Induced Osteolysis in Ovariectomized Mice</i> "	103
6.2.3	Résultats complémentaires à ceux de l'article	110
6.3	Etude B : effets de la supplémentation en oestrogènes sur l'ostéolyse induite par les particules de PE	112
6.3.1	Article : " <i>Oestrogen deficiency modulates particle-induced osteolysis</i> "	113
6.4	Conclusion	126

6.1 Introduction

La prothèse totale de hanche (Figure 6.1) est une avancée majeure en orthopédie. En France, 120.000 poses de prothèses sont effectuées chaque année. Dans la majeure partie des cas, l'implant est formé d'une partie en polyéthylène (PE) dont l'usure au fil des années constitue le principal risque de complication. On observe en effet, une ostéolyse péri-prothétique (OPP) qui résulte d'un mécanisme initié par la présence de particules de polyéthylène (PE) produites par le frottement de la prothèse articulaire. A terme, l'OPP peut provoquer le descellement des implants.

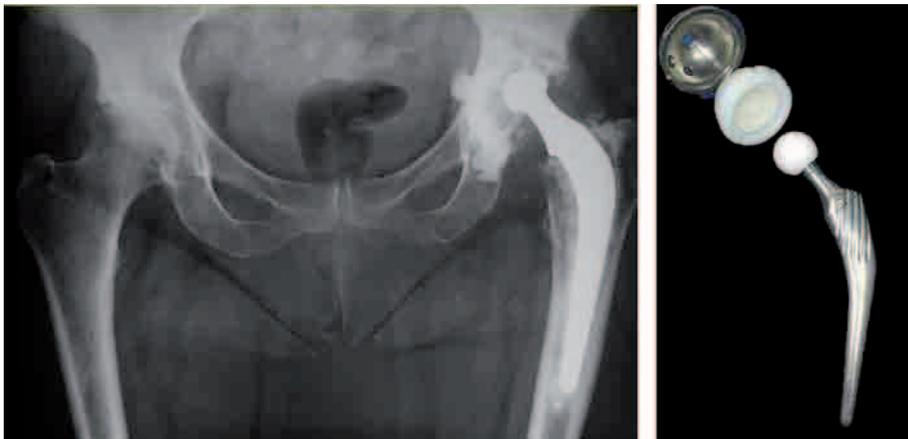


FIGURE 6.1 – Radiographie d'un patient avec une prothèse de hanche et photo d'une prothèse (à droite)

L'ostéoporose post-ménopausique, provoquée par la diminution de la production d'estrogènes, est une situation couramment rencontrée chez les femmes opérées d'une arthroplastie totale de hanche. Elle a en commun avec l'OPP l'accélération du remodelage osseux.

Pour aborder ces question expérimentalement, il existe un modèle murin mis au point par von Knoch [von Knoch et al., 2004]. Chez la souris, l'injection de particules de PE sous la calotte crânienne (calvaria) mime l'ostéolyse induite par les prothèses.

Dans cette étude nous avons utilisé ce modèle de calvaria murin, chez des souris ovariectomisées (OVX) et des souris contrôles (Etude A) et chez des souris ovariectomisées avec ou sans supplémentation en oestradiol (Etude B). Les deux études détaillées dans ce chapitre ont pour objectifs :

- de confirmer la pertinence du modèle murin avec implantation de PE au niveau de la calvaria
- d'étudier les mécanismes d'ostéolyse liés aux particules de PE en relation avec la présence ou l'absence d'oestrogènes
- de caractériser les modifications osseuses d'un os plat engendrées par l'ovariectomie

6.2 Etude A : ostéolyse induite par les particules de PE et interaction avec l'ovariectomie

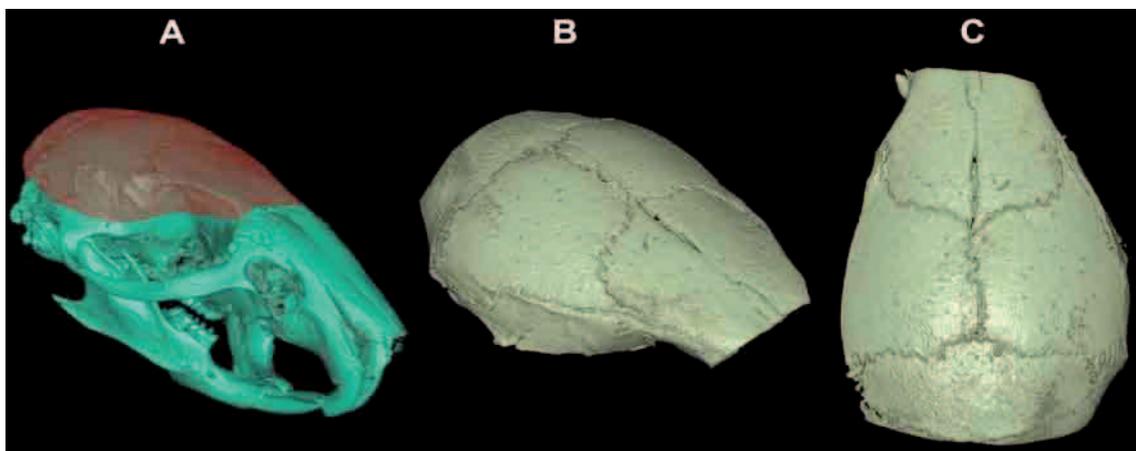


FIGURE 6.2 – Illustration de la région de la calvaria analysée en micro-CT

Nous avons utilisé le micro-CT Skyscan 1178 pour l'analyse *ex vivo* des calvaria disséquées (Figure 6.2). Des images 3D d'une résolution isotrope de $10\ \mu\text{m}$ ont été obtenues avec les paramètres d'acquisition suivants : $80\ \text{kV}$ et $100\ \mu\text{A}$, $100\ \text{ms}$ d'exposition et moyennage de 10 images pour chaque orientation tous les 0.9° .

Après l'imagerie par micro-CT, l'évaluation de l'ostéolyse induite par les particules de PE a été complétée par histologie non décalcifiée avec un microscope (Eclipse TE 2000-U, Nikon) et un logiciel d'analyse (NIS Elements, Nikon) couplé à une caméra couleur haute définition (DXM1200MF, Nikon).

6.2.1 Analyse des données 3D de la calvaria

6.2.1.1 Définition de la région d'intérêt

Nous avons analysé les calvarias par micro-CT dans le but d'obtenir des paramètres quantitatifs d'une perte osseuse au niveau de la zone d'implantation des particules de PE. La première étape a été la définition d'une région d'intérêt ("Region Of Interest" : ROI) sur la zone implantée en particule de PE avec comme caractéristiques la taille, la forme et le positionnement.

Dans étude précédente sur une problématique proche, les auteurs ont défini une ROI de forme rectangulaire, ce qui peut induire un biais dans les mesures 3D [Tsutsumi et al., 2008] si l'échantillon n'est pas orienté correctement pendant l'acquisition au micro-CT. Dans notre étude nous avons choisi une forme sphérique centrée sur un repère anatomique dont l'identification en 3D est simple afin que le calcul des paramètres quantitatifs ne soit pas dépendant de l'orientation.

La taille et la position de la sphère ont été ajustées à partir des rendus 3D montrant les zones d'ostéolyse (Figure 6.3). Nous avons choisi comme ROI une

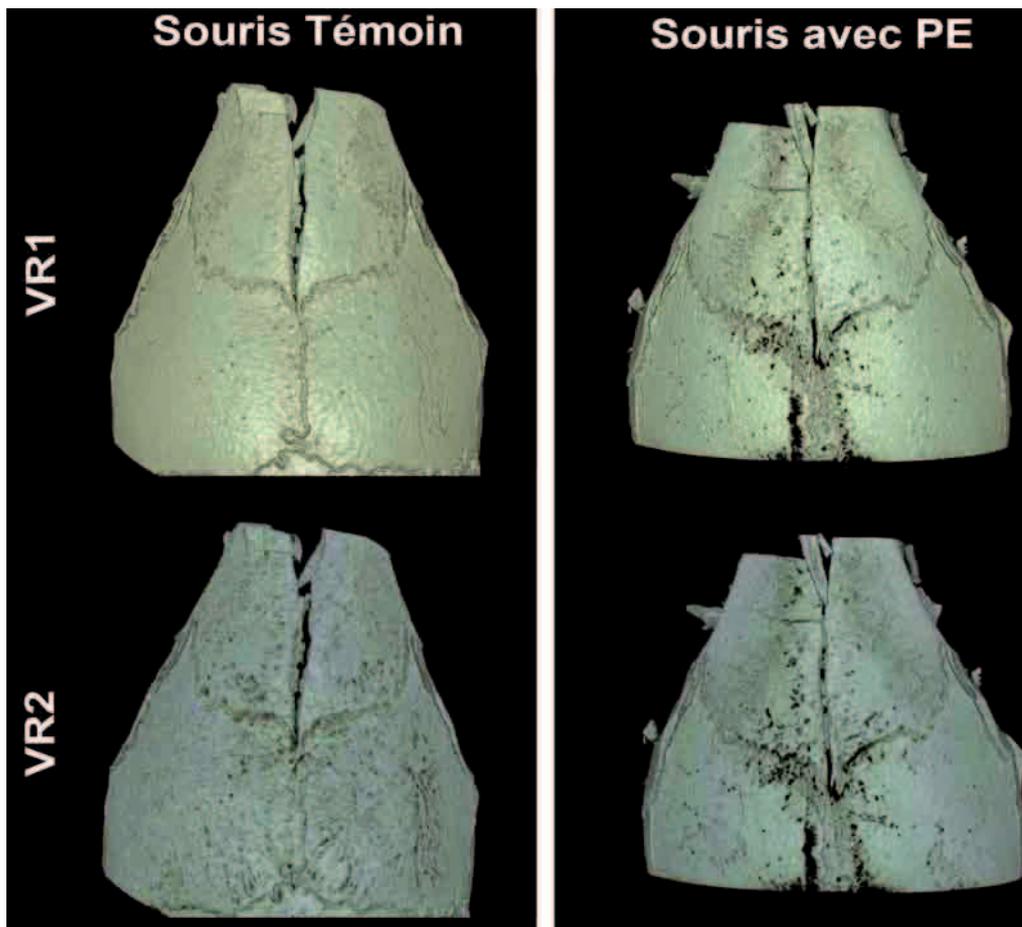


FIGURE 6.3 – Visualisation des calvarias en 3D avec deux rendus différents de "volume rendering" permettant d'apprécier les zones d'ostéolyse

sphère de 2 *mm* de diamètre centrée sur une zone située à une distance de 1 *mm* du croisement des sutures (Figure 6.4).

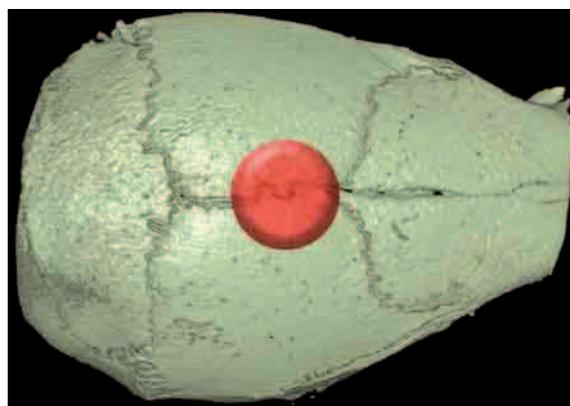


FIGURE 6.4 – Illustration de la ROI sphérique

6.2.1.2 Paramètres quantitatifs de l'ostéolyse

Les caractéristiques morphologiques des os comprennent des régions corticales denses et des régions trabéculaires poreuses. Les os plats comme la calvaria ne répondent pas à cette classification. Classiquement l'analyse par micro-CT de l'architecture osseuse permet de décrire le réseau de travées de l'os trabéculaire et le réseau de pores de l'os cortical avec des paramètres morphologiques, de connexité, de texture ou encore fractals. Pour la calvaria aucune étude n'a jamais défini de paramètres spécifiques. Nous avons choisi d'appliquer à la calvaria, les paramètres morphologiques suivants :

- La proportion de tissu osseux dans une région (Bone volume/Tissue Volume ratio : BV/TV).
- La largeur des travées (Trabecular Thickness : $Tb.Th$) est utilisée pour caractériser l'épaisseur de la plaque osseuse. Ce paramètre est calculé directement en 3D en remplissant virtuellement l'os par des sphères. La valeur moyenne du diamètre de toutes des les sphères donne l'épaisseur du tissu osseux [Hildebrand and Rüegsegger, 1997].
- La surface spécifique (Bone Surface/Bone Volume ratio : BS/BV) renseigne sur l'organisation de la forme 3D. Plus cette valeur est élevée plus la complexité de l'objet est importante (Figure 6.5).

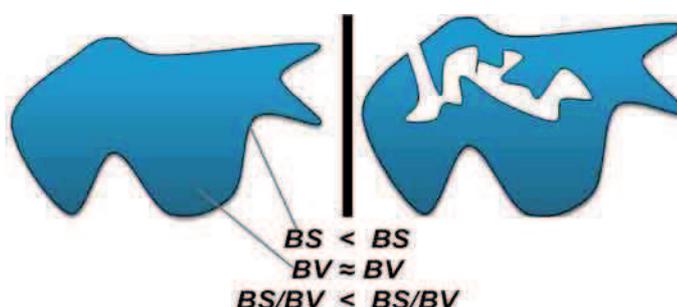


FIGURE 6.5 – Illustration de la complexité d'une forme avec le paramètre BS/BV . En 2D BS correspond au périmètre de la forme et BV à sa surface

Le calcul de ces paramètres a été effectué avec le logiciel Ct-An (Skyscan) sur des images binaires obtenues par seuillage global avec une valeur fixe identique pour tous les échantillons et définie après étude de l'ensemble des histogrammes 3D.

6.2.2 Article : "*Decrease in Particle-Induced Osteolysis in Ovariectomized Mice*"

Dans cet article nous montrons que :

- ce modèle animal couplé à l'analyse par micro-CT est pertinent pour la compréhension des mécanismes de perte osseuse liés aux particules de PE
- l'analyse par micro-CT a permis pour la première fois d'obtenir des paramètres quantitatifs 3D d'un os plat tel que la calvaria
- les paramètres 3D sont en accord avec l'histomorphométrie

Decrease in Particle-Induced Osteolysis in Ovariectomized Mice

Christophe Nich,¹ Arnaud Marchadier,² Laurent Sedel,¹ Hervé Petite,¹ Catherine Vidal,³ Moussa Hamadouche¹

¹Laboratoire de Recherche Orthopédique, Faculté de Médecine Paris VII—Denis Diderot, 10 Avenue de Verdun, 75010 Paris, France, ²Useful Progress, 23 Rue d'Anjou, 75008 Paris, France, ³Institut Pasteur and INSERM U747, Laboratory of Stem Cells, Signaling and Prions, Université René Descartes Paris 5, 45 Rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cédex 06, France

Received 4 May 2009; accepted 17 July 2009

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/jor.20987

ABSTRACT: Postmenopausal osteoporosis is a common disorder that results from increased osteoclastic activity caused by estrogen deficiency. Whether postmenopausal bone remodeling can alter the response to particulate debris is unknown. The purpose of this study was to evaluate the bone response to polyethylene particles in an ovariectomized murine model. Polyethylene particles were implanted onto the calvaria of seven control mice and seven ovariectomized (OVX) mice, as compared with calvaria from sham-operated and OVX mice. Calvaria were harvested after 14 days. Skulls were analyzed with a high-resolution micro-CT and by histomorphometry after staining with Stevenel blue and picrofuschine, and for tartrate-specific alkaline phosphatase. As assessed by micro-CT, particle implantation induced a significant decrease in bone thickness in control mice, while bone thickness remained stable in OVX mice. In particle-implanted animals, the osteoclast number was 2.84 ± 0.3 in control mice and 1.74 ± 0.22 in OVX mice. Mean bone loss was $-12\% \pm 1.9\%$ in control mice and $-4.7\% \pm 1.7\%$ in OVX animals. The reduction of osteolytic response suggests that ovariectomy may have a protective role against particle-induced bone resorption. © 2009 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc. *J Orthop Res*

Keywords: particle-induced osteolysis; aseptic loosening; ovariectomy; postmenopausal osteoporosis, 3D micro-CT

Aseptic loosening of total joint replacements appears as a consequence of periprosthetic osteolysis, caused by an inflammatory reaction initiated by macrophages.^{1–3} Polyethylene (PE) particles generated by the bearing couple are phagocytosed by macrophages, which in turn release various bone-resorptive cytokines.^{4–11} These cytokines enhance osteoclastogenesis directly or indirectly via the receptor activator of the nuclear factor κ B (RANK)-RANK ligand (RANKL) signaling pathway, leading to bone resorption.^{9–11} Although a significant relationship exists between PE linear wear and the risk for revision for aseptic loosening, great variations in the degree of osteolysis are sometimes encountered in the clinical practice, suggesting that patient-specific factors cause variability in the host response to PE particles. Recently, it has been reported that the severity of radiographic osteolysis correlated with an increase in IL-6 serum concentrations in retrieved peripheral blood stimulated by PE particles.¹² Experimentally, individual factors, such as genetically determined obesity¹³ and genetics,¹⁴ consistently influence particle-induced osteolysis.

Postmenopausal osteoporosis is a common disorder that results from increased osteoclastic activity caused by estrogen deficiency.¹⁵ The latter commonly affects middle-aged and older women. Powerful inducers of bone resorption, such as IL-1, IL-6, and TNF- α , appear to play an important role in the biological pathway of both particle-induced osteolysis and postmenopausal bone loss.^{16,17} Experimentally, ovariectomy is known to decrease bone mass,¹⁸ stimulate bone remodeling,^{19,20} and increase IL-6 levels in bone marrow.²¹ The demonstration that particle-induced osteolysis is increased

when bone remodeling is accelerated as a result of ovariectomy has not yet been established.

To address this question, we used the calvarial particle-induced osteolysis model developed by von Knoch.²² PE particles were implanted onto calvaria of control and ovariectomized (OVX) mice to stimulate particle-related osteolysis as assessed by micro-CT and histomorphometry.

MATERIALS AND METHODS

Particles

Pure PE particles (Ceridust VP 3620) were obtained as a gift from Clariant (Gersthofen, Germany). Particle size was determined as an equivalent circular diameter²³ using scanning electron microscopy (Stereoscan S260, Cambridge Instrument Co., Ltd., Cambridge, UK) after 20-nm Au/Pd metallization. More than 55% of the particles were $<5 \mu\text{m}$ in size. The mean particle size was $5.14 \pm 3.05 \mu\text{m}$ (median $4.39 \mu\text{m}$; range $0.52–15.5 \mu\text{m}$). All particles were washed in ethanol to remove endotoxins using previously described protocols.²⁴ The particles were then processed under sterile conditions in a cell culture hood.

Animal Surgery and Experimental Protocol

Twenty-eight 11-week-old C57BL/6J mice were purchased from Janvier Laboratory (Le Genest-Saint-Isle, France). All mice were handled in agreement with French and international guidelines for care and use of laboratory animals. Fourteen mice were ovariectomized by the dorsal approach under general anesthesia (isoflurane) and constituted the OVX group; 14 non-OVX mice constituted the control group. Animals were housed in quarantine under local vivarium conditions (24°C , 12 h/12 h light/dark cycle) for 1 week.

The surgical procedure has been described previously.²² Briefly, mice were operated under general anesthesia via inhaled isoflurane. All mice were 12 weeks of age at surgery. A $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$ area of periosteum was exposed by making a 10-mm midline sagittal incision over the calvaria. Seven control mice were sham-operated without particle implantation (group I, sham), and seven control animals received $20 \mu\text{g}$ of

Correspondence to: Christophe Nich (T: 0033157278570; F: 0033157278571; E-mail: chrnich@gmail.com)

© 2009 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc.

2 NICH ET AL.

dried PE particles (group II). Seven OVX animals were sham-operated (group III, sham), and seven OVX animals were implanted with 20 µg of PE particles (group IV). In groups II and IV, the particle powder was distributed uniformly over the intact periosteum using a sterile sharp surgical spoon. The incision was closed using nonabsorbable suture (Ethicon, Somerville, NJ). The mice were returned to their cages after they were able to right themselves. Water and food were given ad libitum. No mice died during the experiments, and no wound complications were observed. Fourteen days postoperatively, the mice were euthanized, and the calvaria harvested for micro-CT imaging and undecalcified histology.

Micro-CT Imaging and Volumetric Osteolysis Analysis

The skulls were analyzed with a high-resolution micro-CT (Skyscan 1172; Skyscan, Aartselaar, Belgium) to perform qualitative and quantitative analyses of the calvarial bone. Micro-CT analysis focused on the osseous properties in the area of the sagittal suture of the skulls. The radiographic projections ($n = 210$) were acquired at 80 kV and 100 µA with a fixed exposure time of 100 ms. Eight frames were averaged for each rotation increment of 0.9° to increase the signal-to-noise ratio. Three-dimensional images were reconstructed with a voxel average size of 10 µm, using the manufacturer reconstruction software (NRecon, Skyscan). Data were analyzed with a global fixed threshold, according to the method previously described.²⁵ To minimize the bias from the 3D orientation of the calvaria, a spheric volume of interest (VOI) of 2 mm in diameter with the midline suture of the skull in its center was defined (Fig. 1A). For quantitative analysis of PE particle-induced osteolysis, the resident software (CTAn, Skyscan) was used to obtain the following parameters within

the VOI: bone volume (BV), tissue volume (TV), bone surface (BS), and trabecular thickness (Tb.Th.). To assess the particle-induced bone loss quantitatively, results were expressed as the mean difference of BV/TV [Δ (BV/TV)] and mean difference of Tb.Th [Δ (Tb.Th)] between sham-operated animals and particle-treated animals, in control and OVX groups.

Histological Evaluation of Osteolysis

The calvaria were dehydrated by daily changes of formaldehyde, before infiltration with a mixture of methylmethacrylate-2-hydroxyethyl and methylmethacrylate. The undecalcified calvaria were oriented on edge, embedded in the methylmethacrylate, and then cut with a microtome (Microcut 2; Brot Technologies, Argenteuil, France). Sections (10 µm) were collected at the depth where particles were detected within the calvaria tissue. These sections were stained with Stevenel blue and picrofuchsin, and a serial section stained for tartrate-specific acid phosphatase-positive (TRAP) osteoclasts (Acid Phosphatase kit; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Tissue analysis was performed with a photomicroscope (Eclipse TE 2000-U; Nikon, Amstelveen, The Netherlands) and an automated image analyzing system including a high-resolution color video-camera (DXM1200F; Nikon) and resident software (NIS Elements; Nikon).

Using $\times 20$ magnification, the histomorphometric analysis of each calvaria cap was performed on the most central section and on four adjacent sections. The region of interest was defined by the area of soft tissue including bone resorption pits adjacent to, and in continuity with, the midline suture. The sagittal suture area was determined by tracing the area of soft tissue between the parietal bones, and including resorption pits on the superior surface of the calvaria visible in the same field as the midline

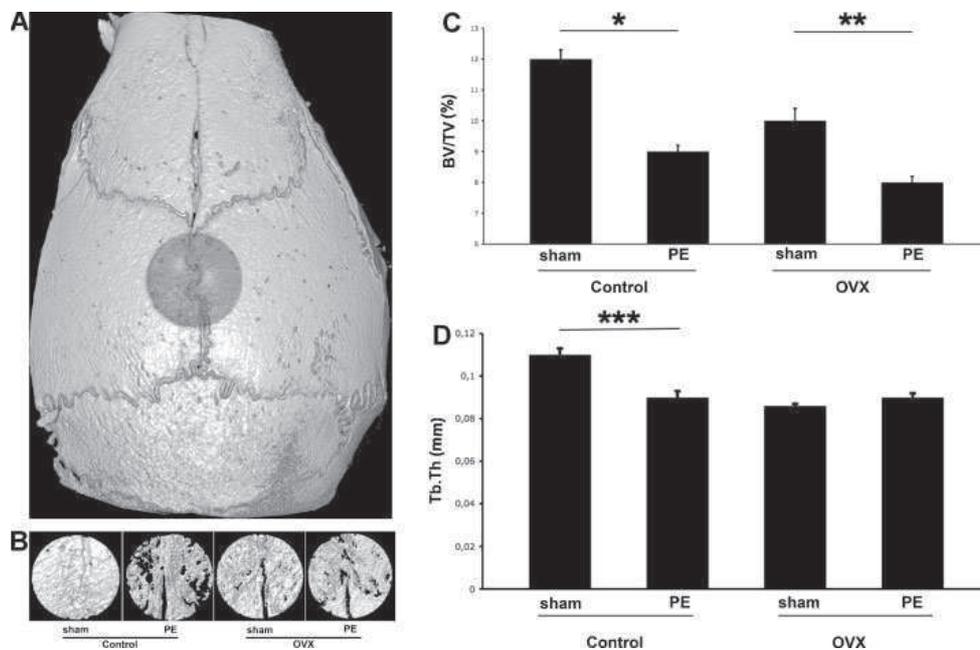


Figure 1. PE particle-induced osteolysis in control and OVX mice as assessed within the VOI by longitudinal 3D micro-CT (A). Representative reconstructed images of the VOI (B) are shown 2 weeks after sham-surgery or PE particles implantation, in control and OVX mice. Of note is the consistent extent of bone resorption area in control mice implanted with particles, while bone resorption area is limited in OVX animals implanted with particles. * $p < 0.005$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.05$, as determined using Student's *t*-test (C, D).

suture. To determine bone thickness, sections were divided using a digital caliper in four 100 μm steps to the left and right sides of the midline suture, respectively. The measurements were expressed as a percentage of the mean ratio of bone thickness to the total tissue thickness of the nine regional measurements in the five adjacent sections. To assess quantitatively the eventual bone loss due to the particles, results were also expressed as a percentage of the mean difference of BT (ΔBT) and BT/TT [$\Delta(\text{BT}/\text{TT})$] between sham-operated and particle-implanted animals, in control and OVX groups. Osteoclasts were identified as large multinucleated cells located on the bone perimeter within a resorption lacuna. Their localization was confirmed in a serial section stained for TRAP. Osteoclast number was measured in the region of interest of the five consecutive calvaria sections.

Statistical Analysis

All values are presented as means \pm SEM. BV/TV and Tb.Th were analyzed by two-tailed Student's *t*-test. Data concerning osteoclast number, sagittal suture area, and BT were initially analyzed using one-way ANOVA. Post hoc comparison between groups used the Fisher's PLSD. Two-way ANOVA was performed to determine whether a significant effect of either polyethylene particles or ovariectomy existed on osteoclast number, sagittal suture area, and bone thickness. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Micro-CT imaging showed differences in the osseous microstructure between the sham-operated (groups I and III) and the PE particle-implanted mice (groups II and IV), in control and OVX groups (Fig. 1B). The presence of PE particles induced a significant decrease in BV/TV in both control and OVX mice ($p = 0.006$ and $p = 0.002$, respectively) (Fig. 1C). However, while PE particles produced a significant decrease in bone thickness [$\Delta(\text{Tb.Th})$] in control mice (group II -9.6% /group I, $p = 0.04$), no significant variation occurred in OVX mice (group IV $+2\%$ /group III, $p = 0.40$) (Fig. 1D).

In particle-implanted mice (groups II and IV), fibrous and granulomatous scar tissue invaded the calvarial bone in an erosive way, as observed on histological sections (Fig. 2A). However, the tissue response to particles appeared limited in OVX animals. Using polarized light, many particles were found intracellularly within macrophages and foreign-body giant cells. TRAP staining revealed the presence of osteoclasts located in resorptive lacunae. The mean osteoclast number was 0.94 ± 0.15 (range, 0–3), 2.84 ± 0.3 (range, 0–8), 1.53 ± 0.23 (range, 0–5), and 1.74 ± 0.22 (range, 0–4) in groups I, II, III, and IV, respectively. One-way ANOVA revealed a significant difference for osteoclast number ($p < 0.0001$). A significant difference also existed in osteoclast number between groups I and II (Fisher's exact test, $p < 0.0001$), groups I and III ($p < 0.0001$), groups II and IV ($p = 0.002$), and groups III and IV ($p = 0.002$). Two-way ANOVA revealed a significant effect of PE particles on osteoclast number ($p < 0.0001$). There was also a significant effect of OVX on osteoclast number ($p < 0.0001$) (Fig. 2B).

The sagittal suture area was $0.036 \pm 0.003 \text{ mm}^2$ (range, 0.008–0.076 mm^2) in group I and $0.104 \pm 0.013 \text{ mm}^2$ (range, 0.05–0.337 mm^2) in group II. The sagittal suture area was $0.026 \pm 0.003 \text{ mm}^2$ (range, 0.006–0.105 mm^2) in group III and $0.095 \pm 0.014 \text{ mm}^2$ (range, 0.013–0.35 mm^2) in group IV. One-way ANOVA revealed a significant difference for the sagittal suture area ($p < 0.0001$). There was a significant difference in sagittal suture area between groups I and II ($p < 0.0001$) and groups III and IV ($p < 0.0001$). No significant difference was found in sagittal suture area between groups I and III ($p = 0.51$) and groups II and IV ($p = 0.52$). Two-way ANOVA revealed a significant effect of PE particles on sagittal suture area ($p < 0.0001$). There was no independent effect of OVX on sagittal suture area ($p = 0.84$) in the absence of particles (Fig. 2C).

The mean bone thickness (BT/TT) was $60\% \pm 1.7\%$ (range, 42%–80%), $48\% \pm 1.9\%$ (range, 23%–73%), $54\% \pm 1.8\%$ (range, 35%–73%), and $49\% \pm 1.7\%$ (range, 26%–65%) in groups I, II, III, and IV, respectively. One-way ANOVA revealed a significant difference for bone thickness ($p < 0.0001$). A significant difference existed in bone thickness between groups I and II ($p < 0.0001$) and groups I and III ($p = 0.01$). No significant difference in bone thickness was found between groups III and IV ($p = 0.056$) and groups II and IV ($p = 0.59$). Two-way ANOVA revealed a significant effect of PE particles on bone thickness ($p < 0.0001$). There was also a significant statistical effect of OVX on bone thickness ($p = 0.038$). The mean difference [$\Delta(\text{BT}/\text{TT})$] between group I and group II was $-12\% \pm 1.9\%$ (range, -37% – -12.6%); the mean difference between group III and group IV was $-4.71\% \pm 1.7\%$ (range, -27.6% – -10.8%) ($p = 0.004$) (Fig. 2D).

DISCUSSION

Several studies reported on the potential role of patients' individual factors in particle-induced osteolysis.^{12–14} The identification of patient-related factors could help in preventing the consequences of PE wear by considering alternative bearings or close monitoring in these high-risk patients. In this study, we asked whether bone response to PE particles would be affected by ovariectomy. We hypothesized that experimental stimulation of bone turnover by ovariectomy would induce an increase in particle-induced osteolysis. To test our hypothesis, we employed the murine calvarial model, which is known to develop marked osteolysis in the presence of PE particles.²² The current study provided the first evidence, to our knowledge, that ovariectomy significantly affects bone response to wear debris.

Macrophages are thought to be the most important cellular target of wear debris.⁴ Active phagocytosis of debris initiates the release of pro-inflammatory cytokines such as IL-1, IL6, and TNF- α , which promote production of pro-resorptive cytokines, such as RANKL, by osteoblasts and fibroblasts, and recruitment and activation of osteoclasts.^{4,26} Similarly, enhanced

4 NICH ET AL.

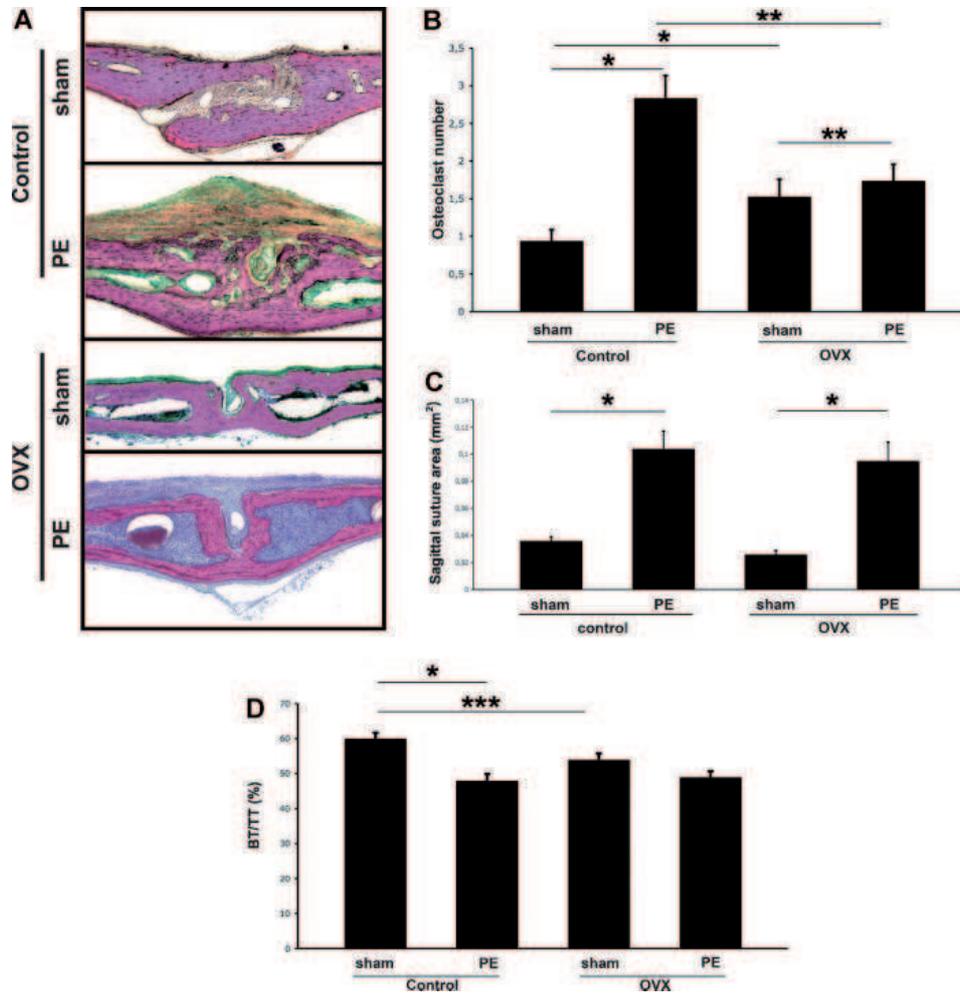


Figure 2. PE particle-induced osteolysis as assessed by histology. Mice were euthanized 2 weeks after surgery, and their calvaria harvested for Stevenel blue and picrofuschine stained histology. Representative histology is presented at $\times 20$ original magnification (A). Of note is the lowest calvarial bone thickness in OVX mice without particle implantation in comparison with control mice without particle implantation. PE particles induced a consistent decrease in bone thickness in control mice, while it was moderate in OVX mice. $*p < 0.0001$, $**p < 0.005$, $***p < 0.05$, as determined using Fisher's exact test (B–D).

osteoclastogenesis is observed in the postmenopausal period,^{15,17} resulting from increased recruitment of osteoclast precursors,^{27,28} reduced osteoclast apoptosis, and increased osteoclast activity.¹⁷ However, the molecular basis for this is not fully known. Various pro-inflammatory cytokines, identified as TNF, IL-1, and IL-7, are upregulated in the postmenopausal period.^{29,30} Bone-resorptive cytokine RANKL expression was observed on osteoblasts/stromal cells and on bone marrow in postmenopausal women,³¹ but its role in the mechanism by which estrogen deficiency induces accelerated osteoclastogenesis remains controversial.³² Also, selective ablation of estrogen receptor in mature osteoclasts mimicked an osteoporotic bone phenotype in mice, suggesting that estrogen directly regulates the life span

of differentiated osteoclasts, independently of an inflammatory pathway.³³

In line with these data, we noted an increased number of TRAP-positive osteoclasts in the presence of PE particles in control and OVX mice. However, particle-induced osteolysis was considerably decreased in OVX mice in comparison with controls. These findings suggest that the combination of two well-known bone-resorptive situations, namely OVX and the presence of PE particles, paradoxically altered the osteolytic reaction. This phenomenon could be explained by either osteoclast activity and/or recruitment downregulation or accelerated apoptosis. Our experimental conditions did not permit us to confirm that estrogen deficiency was a risk factor for increased particle-induced osteolysis, as might have

been anticipated. The decreased osteolysis observed in OVX mice rather supports the idea that both resorptive mechanisms are competitive. Further animal and clinical studies are underway to test this hypothesis.

Our findings may have several clinical implications. Young age (<65 years) and male gender are risk factors for development of periprosthetic osteolysis.³ High activity levels in these populations are presumably associated with high wear rates and subsequent osteolysis. Interestingly, the activity level of young total hip replacement patients may be lower than originally thought. Sechriest et al.³⁴ recently showed that average gait cycles per year in patients <50 years of age were comparable to average values reported in older populations. Taken in combination with our findings, it raises the hypothesis that menopause may act as an independent protective factor against osteolysis.

We recognize limitations may have affected our findings. First, the osteolysis murine model does not fully reproduce the mechanical conditions of a prosthetic implant subjected to loosening, and the resulting tissue response should be considered as acute osteolysis rather than chronic osteolysis.²² Second, we did not investigate the supplementation of sex steroid hormones to OVX mice. Thus, it is impossible to conclude whether the reduction of osteolytic response in OVX mice was due to the deprivation of estrogen or progesterone, or both. Also, the consequences of OVX on mouse calvarial bone have been poorly studied. However, our observations revealed that basal calvarial bone thickness was significantly reduced in OVX mice, confirming previous findings.^{18,20} This is consistent with bone resorption of the skull and subsequent parietal bone thinning observed in postmenopausal osteoporotic women.³⁵ Therefore, the current experimental protocol likely mimicked comparable cellular and biologic bone responses in OVX mice that occur in the early postmenopausal period.

Our results suggest that bone loss caused by PE particles and those caused by ovariectomy substantially interact on each other. The reason for reduced particle-induced osteolysis in ovariectomized mice is presently unknown. Based on our findings, we conclude that sex steroid hormone deficiency following ovariectomy substantially alters bone-resorptive mechanisms due to PE particles, and that postmenopausal osteoporosis may not be a critical risk factor for particle-induced osteolysis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Isabel Le Disquet, IFR de Biologie Intégrative, Service de Microscopie Electronique, Université Pierre et Marie Curie—Paris VI, for providing scanning electron microscopy analysis.

REFERENCES

1. Goodman SB, Fornasier VL, Lee J, et al. 1990. The histological effects of the implantation of different sizes of polyethylene particles in the rabbit tibia. *J Biomed Mater Res* 24:517–524.
2. Willert HG, Bertram H, Buchhorn GH. 1990. Osteolysis in alloarthroplasty of the hip. The role of ultra-high molecular

- weight polyethylene wear particles. *Clin Orthop Relat Res* 258:95–107.
3. Korovessis P, Repanti M. 1994. Evolution of aggressive granulomatous periprosthetic lesions in cemented hip arthroplasties. *Clin Orthop Relat Res* 300:155–161.
4. Green TR, Fisher J, Stone M, et al. 1998. Polyethylene particles of a critical size are necessary for the induction of cytokines by macrophages in vitro. *Biomaterials* 19:2297–2302.
5. Kim KJ, Rubash H, Wilson SC, et al. 1993. A histologic and biochemical comparison of the interface tissues in cementless and cemented hip prostheses. *Clin Orthop Relat Res* 287:142–152.
6. Chiba J, Rubash H, Kim KJ, et al. 1994. The characterisation of cytokines in the interface tissue obtained from failed cementless total hip arthroplasty with and without femoral osteolysis. *Clin Orthop Relat Res* 300:304–312.
7. Sabokbar A, Rushton N. 1995. Role of inflammatory mediators and adhesion molecules in the pathogenesis of aseptic loosening in total hip arthroplasties. *J Arthroplasty* 10:810–815.
8. Xu JW, Kotinen YT, Lassus J, et al. 1996. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in loosening of total hip replacement (THR). *Clin Exp Rheumatol* 14:643–648.
9. Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, et al. 1998. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiating factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 253:395–400.
10. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, et al. 1999. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 145:527–538.
11. Schwarz EM, Lu AP, Goater JJ, et al. 2000. Tumor necrosis factor-alpha 1 nuclear transcription factor-kappa β signaling in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res* 18:472–480.
12. Ise K, Kawanabe K, Matsusaki T, et al. 2007. Patient sensitivity to polyethylene particles with cemented total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 22:966–973.
13. von Knoch M, Jewison DE, Sibonga JD, et al. 2004. Decrease in particle-induced osteolysis in obese (ob/ob) mice. *Biomaterials* 25:4675–4681.
14. Zhang C, Tang T, Ren W, et al. 2008. Influence of mouse genetic background on wear particle-induced in vivo inflammatory osteolysis. *Inflamm Res* 57:211–215.
15. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. 1998. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 13:763–773.
16. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, et al. 1986. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. *Nature* 319:516–518.
17. Lerner UH. 2006. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res* 85:596–607.
18. Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, et al. 1989. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 45:360–366.
19. Manolagas SC, Jilka RL. 1995. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 332:305–311.
20. Libouban H, Moreau MF, Baslé MF, et al. 2003. Increased bone remodeling due to ovariectomy dramatically increases tumoral growth in the 5T2 multiple myeloma mouse model. *Bone* 33:283–292.
21. Passeri G, Girasole G, Jilka RL, et al. 1993. Increased interleukin-6 production by murine bone marrow and bone cells after estrogen withdrawal. *Endocrinology* 133:822–828.

6 NICH ET AL.

22. von Knoch M, Jewison DE, Sibonga JD, et al. 2004. The effectiveness of polyethylene versus titanium particles in inducing osteolysis in vivo. *J Orthop Res* 22:237–243.
23. ASTM Standard F1877-98. 2003. Standard practice for characterization of particles. West Conshohocken, PA: ASTM International.
24. Ragab AA, Van De Motter R, Lavish SA, et al. 1999. Measurement and removal of adherent endotoxin from titanium particles and implant surfaces. *J Orthop Res* 17:803–809.
25. Müller R, van Campenhout H, van Damme B, et al. 1998. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 23:59–66.
26. Ragab AA, Nalepka JL, Bi Y, et al. 2002. Cytokines synergistically induce osteoclast differentiation: support by immortalized or normal calvarial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:679–687.
27. Sato T, Shibata T, Ikeda K, et al. 2001. Generation of bone-resorbing osteoclasts from B220+ cells: its role in accelerated osteoclastogenesis due to estrogen deficiency. *J Bone Miner Res* 16:2215–2221.
28. Katavić V, Grević D, Lee SK, et al. 2003. The surface antigen CD45R identifies a population of estrogen-regulated murine marrow cells that contain osteoclast precursors. *Bone* 32:581–590.
29. Kimble RB, Srivastava S, Ross FP, et al. 1996. Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production. *J Biol Chem* 271:28890–28897.
30. Weitzmann MN, Cenci S, Rifas L, et al. 2000. Interleukin-7 stimulates osteoclast formation by up-regulating the T-cell production of soluble osteoclastogenic cytokines. *Blood* 96:1873–1878.
31. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, et al. 2003. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 111:1221–1230.
32. Sato T, Watanabe K, Masuhara M, et al. 2007. Production of IL-7 is increased in ovariectomized mice, but not RANKL mRNA expression by osteoblasts/stromal cells in bone, and IL-7 enhances generation of osteoclast precursors in vitro. *J Bone Miner Metab* 25:19–27.
33. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, et al. 2007. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* 130:811–823.
34. Sechriest VF II, Kyle RF, Marek DJ, et al. 2007. Activity level in young patients with primary total hip arthroplasty: a 5-year minimum follow-up. *J Arthroplasty* 22:39–47.
35. Takata S, Takao S, Yoshida S, et al. 2008. Therapeutic effects of one-year alendronate treatment in three cases of osteoporosis with parietal thinning of skull. *J Med Invest* 55:297–302.

6.2.3 Résultats complémentaires à ceux de l'article

Effet de l'ovariectomie sur l'os plat de la calvaria Nous avons utilisé la visualisation en MIP ("Maximum Intensity Projection") pour accentuer les contrastes entre les structures denses et les cavités. La Figure 6.6 montre clairement un "mouquetage" de la calvaria chez les souris OVX comparativement aux contrôles.

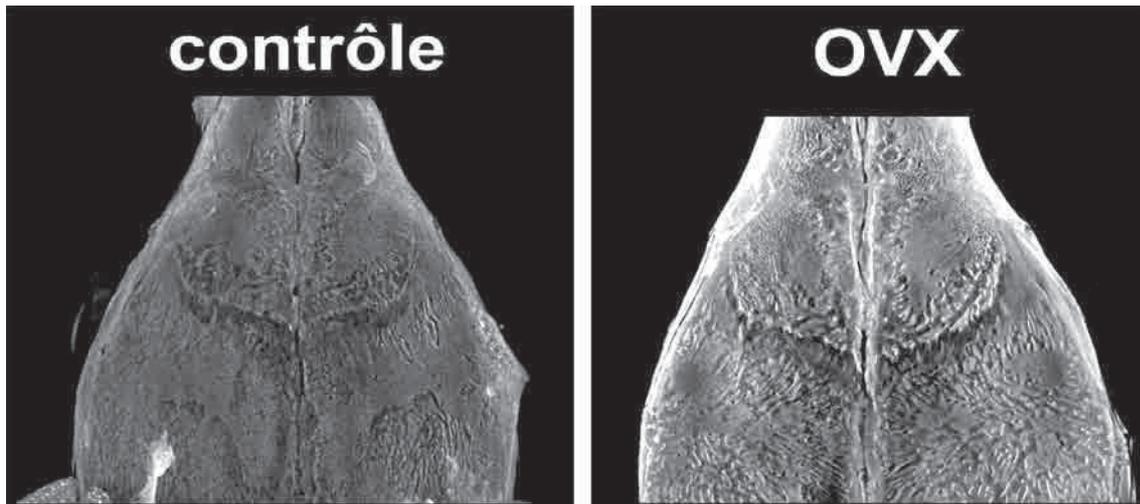


FIGURE 6.6 – Illustration 3D en MIP de la réponse osseuse à l'ovariectomie de la calvaria

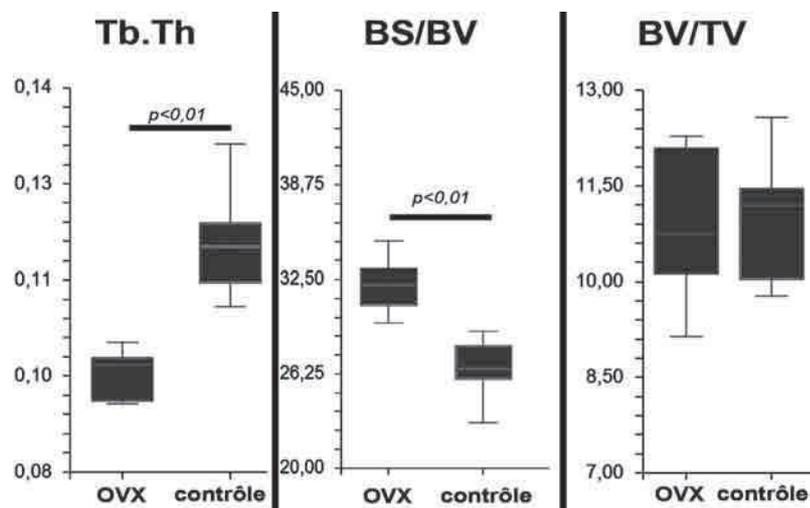


FIGURE 6.7 – Illustrations de la réponse osseuse à l'ovariectomie avec les résultats d'analyse quantitatifs

Les résultats qualitatifs (Figure 6.7) confirment les résultats de l'imagerie. Le paramètre *BS/BV* de surface spécifique montre une complexité statistiquement plus importante de l'os des souris OVX. Le paramètre *Tb.Th* indique une épaisseur moyenne de la calvaria statistiquement plus fine chez les souris OVX.

Ces résultats suggèrent que l'ovariectomie a pour conséquence une porosité accrue de la calvaria chez les souris opérées.

Ostéolyse induite par les particules de PE La visualisation 3D en MIP des souris ayant reçues des particules de PE montre des différences de densités apparentes au niveau et sur les côtés de la suture passant au centre de la ROI (Figure 6.8).

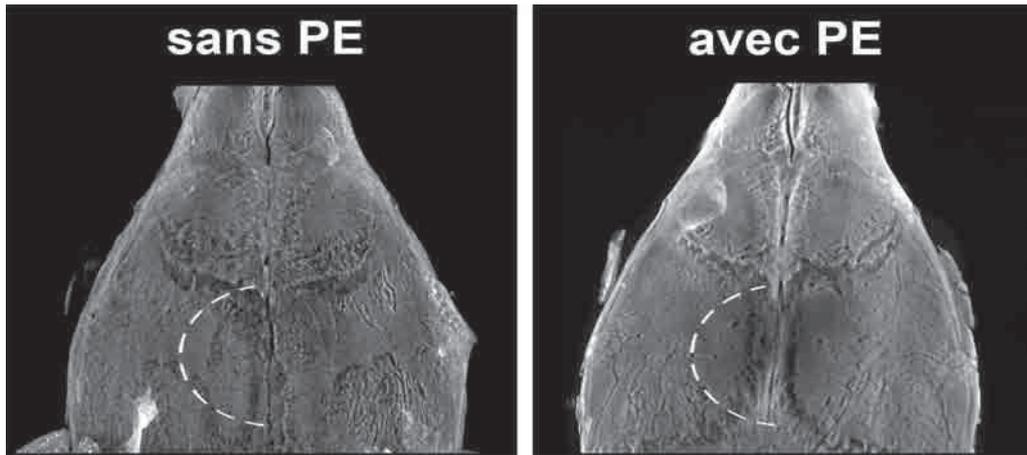


FIGURE 6.8 – Illustration 3D en MIP de la réponse osseuse à l'implantation de particules de PE sur la calvaria

Les paramètres 3D confirment une perte osseuse en volume (Figure 6.9 BV/TV) et l'apparition de porosité (Figure 6.9 Tb.Th et BS/BV) pour les souris avec PE. Ces résultats qualitatifs et quantitatifs démontrent bien une ostéolyse de la calvaria chez les souris avec PE et confirment la pertinence de ce modèle animal.

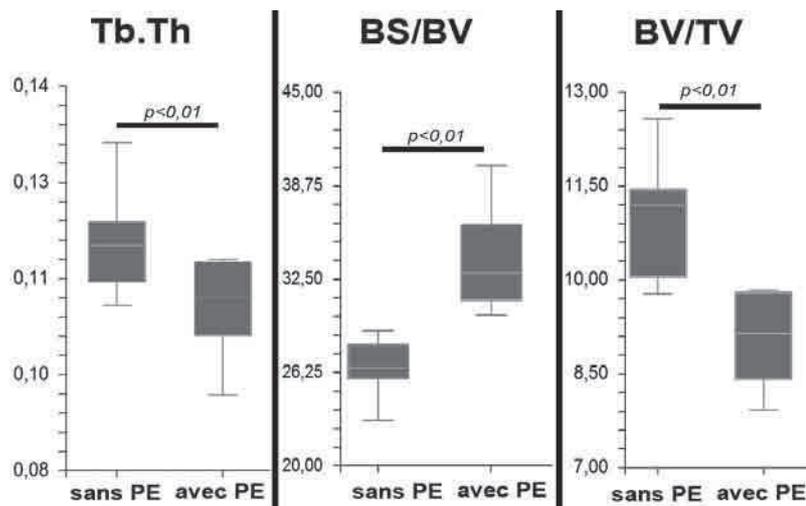


FIGURE 6.9 – Analyse quantitative de la réponse osseuse à l'implantation de particules de PE

Influence de l'ovariectomie sur la réaction aux particules de PE La visualisation 3D centrée sur les ROI montre une porosité maximale de la calvaria chez les souris contrôles avec PE. Les particules de PE ne semblent pas aggraver la porosité consécutive à l'ovariectomie (Figure 6.10).

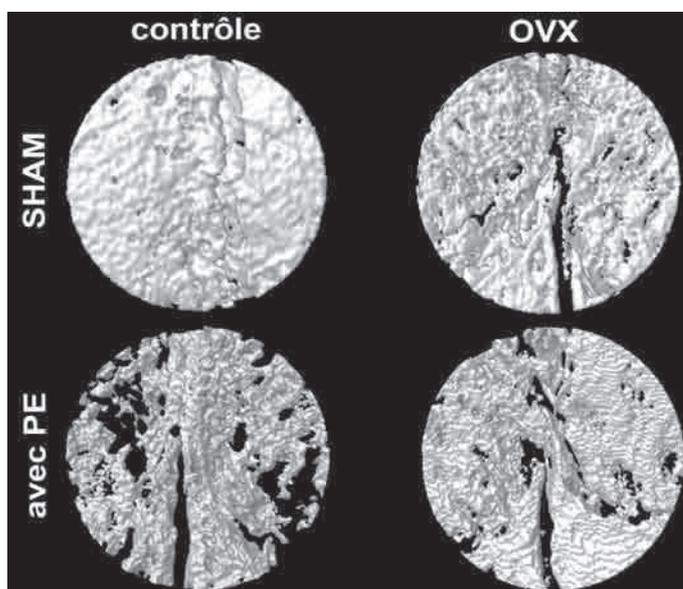


FIGURE 6.10 – Illustration 3D en "volume rendering" de l'effet des particules de PE et de l'ovariectomie

Ce résultat, confronté aux données biochimiques suggère une interaction entre les voies de signalisation des cytokines inflammatoires et les oestrogènes.

L'ensemble des résultats décrits dans l'article (micro-CT, histologie et biochimie) suggèrent que l'ovariectomie entraînait une protection relative vis à vis de l'ostéolyse induite par les particules de PE, probablement via une réduction de la réaction inflammatoire associée.

6.3 Etude B : effets de la supplémentation en oestrogènes sur l'ostéolyse induite par les particules de PE

Cette étude a eu pour but d'analyser plus en détail les mécanismes impliqués dans l'ostéolyse induite par les particules de PE et l'influence des oestrogènes sur ces mécanismes.

Les calvarias des souris ont été analysées par micro-CT et histologie avec le protocole décrit précédemment. De plus nous avons procédé à la mise en culture de calvarias pour analyser les mécanismes biochimiques de production de cytokynes (IL-1 β ,IL-16,TNF- α ,RANKL).

En complément des paramètres BV/TV , $Tb.Th$ et BS/BV utilisés précédemment, nous avons effectué une analyse relative des niveaux de gris afin d'apprécier le degré de minéralisation moyen de la calvaria.

Rappelons que l'information apportée par imagerie tomographique à rayons X est un reflet indirect de la densité des tissus. Les données du micro-CT ne donnent pas d'obtenir de valeurs absolues de la densité mais elles autorisent de comparer relativement les valeurs des niveaux de gris. Pour chaque échantillon, nous avons calculé la valeur moyenne μ_{os} des niveaux de gris des tissus correspondant à l'os suivant la Formule 6.1.

$$\mu_{os} = \frac{\sum_{g=seuilbas}^{seuilhaut} N_g \cdot V_g}{\sum_{g=seuilbas}^{seuilhaut} N_g} \quad (6.1)$$

Avec V_g la valeur du niveau de gris d'indice g et N_g le nombre de voxels avec la valeur V_g .

La Figure 6.11 montre un exemple d'histogramme d'un volume 3D dont le tissu osseux a été identifié entre les bornes 80 et 255 (histogramme 8 bits) avec une valeur moyenne μ_{os} de 110.

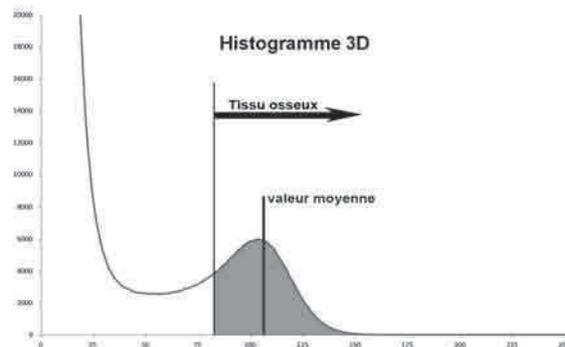


FIGURE 6.11 – Histogramme des valeurs de niveaux de gris du volume 3D

6.3.1 Article : "Oestrogen deficiency modulates particle-induced osteolysis"

Dans cet article nous montrons que :

- l'analyse des valeurs de niveaux de gris permet une comparaison relative de la densité moyenne des tissus osseux de la calvaria dans la ROI entre les groupes de souris
- l'imagerie micro-CT et les paramètres 3D sont complémentaires aux résultats d'histomorphométrie et aux dosages biologiques
- il existe des interactions entre les variations des taux d'oestrogène (ovariectomie et supplémentation) avec l'ostéolyse induite par les particules de PE

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Oestrogen deficiency modulates particle-induced osteolysis

Christophe Nich^{1*}, Jean Langlois¹, Arnaud Marchadier^{2,3}, Catherine Vidal³, Martine Cohen-Solal⁴, Hervé Petite¹ and Moussa Hamadouche¹

Abstract

Introduction: Postmenopausal osteoporosis may modulate bone response to wear debris. In this article, we evaluate the influence of oestrogen deficiency on experimental particle-induced osteolysis.

Methods: Polyethylene (PE) particles were implanted onto the calvaria of normal controls, sham-ovariectomized (OVX), OVX mice and OVX mice supplemented with oestrogen (OVX+E). After 14 days, seven skulls per group were analyzed using a high-resolution micro-computed tomography (micro-CT) and histomorphometry, and for tartrate-specific alkaline phosphatase. Five calvariae per group were cultured for the assay of IL-1 β , IL-6, TNF- α and receptor activator of the nuclear factor κ B (RANKL) secretion using quantitative ELISA. Serum IL-6 concentrations were obtained. The expression of RANKL and osteoprotegerin (OPG) mRNA were evaluated using real-time PCR.

Results: As assessed by μ CT and by histomorphometry, PE particles induced extensive bone resorption and an intense inflammatory reaction in normal controls, sham-OVX and OVX+E mice, but not in the OVX mice group. In normal controls, sham-OVX and OVX+E mice, PE particles induced an increase in serum IL-6, in TNF- α and RANKL local concentrations, and resulted in a significant increase in RANKL/OPG messenger RNA (mRNA) ratio. Conversely, these parameters remained unchanged in OVX mice after PE implantation.

Conclusions: Oestrogen privation in the osteolysis murine model ultimately attenuated osteolytic response to PE particles, suggesting a protective effect. This paradoxical phenomenon was associated with a down-regulation of pro-resorptive cytokines. It is hypothesized that excessive inflammatory response was controlled, illustrated by the absence of increase of serum IL-6 in OVX mice after PE implantation.

Introduction

Aseptic loosening of total joint replacements develops as a consequence of periprosthetic osteolysis, caused by a macrophage-mediated inflammatory reaction [1,2]. Although it is well established that generation of polyethylene (PE) particles by the bearing couple is correlated with the risk for revision due to aseptic loosening [3], great variations in the degree of osteolysis are sometimes observed in clinical practice. This suggests that patient-related factors cause variability in the host response to PE particles. Authors have reported various factors, such as genetically determined obesity [4], and genetic background [5], as potential candidates involved in the modulation of host response to PE particles. In a

recent work, we evaluated the bone response to particulate debris in an ovariectomized mice model [6]. We hypothesized that high bone turnover driven by oestrogen deficiency following ovariectomy would result in accelerated bone loss in the area in contact with the PE particles. Paradoxically, particle-induced osteolysis was found significantly decreased in this model, indicating that ovariectomy could be protective against wear debris-induced osteolysis, possibly via sex steroid hormone deficiency. Particle-induced osteolysis has been shown to follow a biologic pathway, driven by cytokines such as interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α . These mediators have been found in the soft tissue of joints with loosened prostheses [7] and appear to be released by human macrophage or macrophagelike cells *in vitro* [8]. There is evidence that the RANK (receptor activator of the nuclear factor κ B)/RANKL (RANK ligand) system acts downstream from IL-1, IL-6

* Correspondence: chnich@gmail.com

¹Laboratoire de Bioingénierie et Biomécanique Ostéo-articulaires, Faculté de Médecine Paris 7-Denis Diderot, 10, avenue de Verdun, 75010 Paris, France
Full list of author information is available at the end of the article

and TNF- α and may be the ultimate effector mediating the effects of cytokines on the regulation of bone resorption [9]. Ovariectomy has been shown to decrease bone mass, stimulate bone remodeling, and increase IL-6 levels in bone marrow [10,11], and to produce an osteoporotic bone phenotype, similar to postmenopausal osteoporosis. Interestingly, high levels of the three above-mentioned cytokines have been found in bone deprived of oestrogen [12].

Although the osteoprotective action of oestrogen is demonstrable in rodents, its implication in particle-induced osteolysis has never been shown. The purpose of the present study was to investigate the influence of oestrogen on the mechanism underlying particle-induced osteolysis in the murine calvaria model. Following our previous findings, we primarily hypothesized that oestrogen supplementation in ovariectomized mice would restore an extensive bone response to PE particles. In an attempt to shed light on possible underlying regulation, we secondly evaluated the local implication of the RANK/RANKL/OPG system and IL-1 β , IL-6, TNF- α cytokins.

Materials and methods

Particles

Pure polyethylene particles (Ceridust VP 3620) were obtained from Clariant (Gersthofen, Germany). In our hands, the particle size was determined using scanning electron microscopy as previously detailed [6]. The mean particle size was $5.14 \mu\text{m} \pm 3.05 \mu\text{m}$ (median $4.39 \mu\text{m}$; range 0.52 to $15.5 \mu\text{m}$). More than 55% of the particles were less than $5 \mu\text{m}$ in size. All particles were washed in ethanol to remove endotoxins, and then dried in a dessicator [6]. This treatment resulted in negative testing for endotoxins using a quantitative Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Assay (Charles River, Margate, UK) at a detection level of <0.05 EU/mL. Particles were stored at 4°C before implantation.

Animal surgery and experimental protocol

Eleven week-old C57BL/6J female mice ($n = 96$) were purchased from Janvier Laboratory (Le Genest-Saint-Isle, France). All mice were handled in agreement with French and international guidelines for care and use of laboratory animals. The protocol was given ethical

approval by the local Animal Care Committee. Forty-eight mice were subjected to bilateral ovariectomy (OVX group) via the dorsal approach under general anesthesia (isoflurane). Twenty-four mice were sham-ovariectomized (sham-OVX), that is, ovaries were exteriorized, but not removed. Twenty-four non-OVX mice constituted the normal control group. Animals were housed in quarantine under local vivarium conditions (24°C and 12 h/12 h light/dark cycle) for one week.

Surgical implantation of PE particles has been previously described [4]. Briefly, mice were operated on under general anesthesia via inhaled isoflurane. All animals were 12 weeks old at surgery. A $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$ area of periostum was exposed by making a 10 mm midline sagittal incision over the calvaria. In PE-implanted groups, the particle powder ($20 \mu\text{g}$) was distributed uniformly over the intact periosteum using a sterile sharp surgical spoon. Table 1 shows the treatment of the different experimental groups of mice. Postoperatively, 24 OVX animals, including 12 sham-implanted mice and 12 mice implanted with particles, were given subcutaneous oestrogen replacement therapy five days per week ($15 \mu\text{g}$ 17 beta-estradiol/kg body weight/day, Sigma Inc., St. Louis, MO, USA), and 24 OVX animals, including 12 sham-implanted mice and 12 mice implanted with particles, received subcutaneous vehicle only. Water and food were given *ad libitum*. Body weights were measured weekly, and the E injections were adjusted accordingly. Fourteen days postoperatively, the animals were sacrificed by an overdose of intraperitoneal sodium pentobarbital. The uteri were harvested and weighted to confirm oestrogen loss.

Micro-computed tomography imaging and volumetric osteolysis analysis

Seven calvariae per group were dissected after sacrifice. Specimens were freed of all soft tissues, and fixed in 4% neutralized paraformaldehyde. The skulls were analyzed with a high-resolution micro-computed tomograph (micro-CT) (Skyscan 1172; Skyscan, Aartselaar, Belgium) to perform qualitative and quantitative analyses of calvarial bone. Imaging analysis mainly focused on the osseous properties in the area of the skull sagittal suture. The radiographic projections ($n = 210$) were acquired at 80 kV and $100 \mu\text{A}$ with an exposure time

Table 1 Experimental mice groups

	Normal control group	Sham-OVX group	OVX group		Total (n)
			OVX + Vehicle	OVX+E	
PE (-)	12	12	12	12	48
PE (+)	12	12	12	12	48
Total (n)	24	24	24	24	96

E, oestrogen; PE(-), sham-implanted; PE(+), PE-implanted; OVX, ovariectomy.

of 100 ms. Eight frames were averaged for each rotation increment of 0.9° to increase the signal to noise ratio. 3D images were reconstructed with a voxel average size of $10\ \mu\text{m}$, using the manufacturer reconstruction software (NRecon, Skyscan). Qualitative and quantitative data were analyzed with a global fixed threshold [13]. To minimize the bias from the 3D orientation of the calvaria, a spheric volume of interest (VOI of 2 mm diameter) with the midline suture of the skull in its center was defined, as previously described [6]. For quantitative analysis of PE particle-induced osteolysis, the resident software (CTAn, Skyscan) was used to obtain the following measurements within the VOI: bone volume (BV, mm^3), and trabecular thickness (Tb.Th., mm). To address bone tissue mineralization following oestrogen depletion/substitution, a relative density measurement was computed. For this purpose, the mean value of grey-level intensity, reflecting the density of bone tissue, was obtained in entire calvariae.

Histologic evaluation of osteolysis

Calvariae were processed undecalcified after embedding in polymethyl-methacrylate according to a method previously described [6]. Sections ($10\ \mu\text{m}$) were obtained at the depth where the presence of particles was detected within the calvaria tissue. These sections were stained with Stevenel Blue and picrofuchsin and a serial section stained for tartrate-specific acid phosphatase-positive (TRAP) osteoclasts (Acid Phosphatase kit, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Using a magnification of $20\times$, the histomorphometric analysis of each calvaria cap was performed on the most central section and on four adjacent sections. The region of interest was defined as previously recommended [4]. The sagittal suture area (SSA) was determined by tracing the area of soft tissue between the parietal bones. It included resorption pits on the superior surface of the calvaria visible in the same field as the midline suture. To determine bone thickness, sections were divided using a digital caliper in four $100\ \mu\text{m}$ steps to the left and right sides of the midline suture respectively. The measurements were expressed as a percentage of the mean ratio of bone thickness to the total tissue thickness (BT/TT) of the nine regional measurements in the five adjacent sections. To quantify bone loss, results were also expressed as a percentage of the mean difference of BT/TT (Δ (BT/TT)) between sham-operated and particle-implanted animals, in normal controls, sham-OVX, OVX, and OVX + E mice groups. Osteoclasts were identified as large multinucleated cells located on the bone perimeter within a resorption lacuna. Their localization was confirmed in a serial section stained for tartrate-specific acid phosphatase. The osteoclast number

was measured in the region of interest of the five consecutive calvaria sections.

Calvariae culture

Calvariae were removed *en bloc* under sterile conditions from five animals per group randomly assigned for culture. Each calvaria was placed into one well of 12 wells/plate and cultured with 1 ml serum-and phenol-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with glutamine (Invitrogen, Paisley, UK), and 1% penicillin and streptomycin at 37°C and 5% CO_2 for 24 h. Twenty four hours later, the culture medium was collected and stored at -80°C for the assay of IL-1 β , IL-6, TNF- α and RANKL secretion. Then, calvariae were calcinated and ashes weighted to normalize the production of cytokines.

ELISA for IL-1 β , IL-6, TNF- α and RANKL detection

To measure IL-6 concentration in serum, blood was obtained by cardiac puncture before death, and collected in heparinized tubes. Blood samples were then centrifuged at $3,000 \times g$ for 10 minutes, aliquoted and frozen at -80°C until assayed. Serum measurements of IL-6 were performed using quantitative, noncompetitive, sandwich enzyme-linked immunosorbent assay kit for detecting mouse IL-6 (Quantikine, R&D Systems Europe, Ltd, Abingdon, UK). Similarly, ELISA kits for detecting mouse IL-6, IL-1 β , TNF- α and RANKL (R&D Systems) were employed to measure cytokines released into organ culture supernatant. The detection limits of the assay were 1.6 pg/mL for IL-6, 3 pg/mL for IL-1 β , 5.1 pg/mL for TNF- α , and 5 pg/mL for RANKL. Cytokines levels lower than the detection limit were considered to be 0 pg/ml. Absorbance was read in an ELISA reader (Micro-Quant, Bio-Tek Instruments, Colmar, France) at 490 and 540 nm as per manufacturer's instructions.

Quantitative real-time polymerase chain reaction

Calvariae were removed from culture medium, and immediately snap-frozen in liquid nitrogen, and pulverized to powder in a stainless steel mortar. RNA was extracted with 1 mL Trizol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), using the manufacturer's protocol. Quantity and purity of RNA was determined by absorbance on a NanoDrop[™] 1000 Spectrophotometer (Labtech France, Palaiseau, France) at 260 and 280 nm. All samples had ratios >1.7 and were accepted for analysis.

Samples of total RNA were reverse-transcribed using the first-strand synthesis kit of SuperScript[™] II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Quantitative gene expression analyses were carried out using Real-time PCR by means of the TaqMan[™] Gene Expression Assays Protocol (mouse RANK: Mm00437135_m1, mouse RANKL:

Mm01313943_m1, mouse OPG: Mm01205928_m1, and human 18S rRNA: Hs99999901_s1; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the iCycler thermal cycler RT-PCR Detection System, coupled to MyiQ™ Single-Color software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The absolute number of gene copies was normalized using 18S rRNA and the relative quantification of the genes was calculated using the “comparative C_T (threshold cycle) method” as per manufacturer’s instructions (Applied Biosystems).

Data analysis

All values are presented as means \pm SEM. Quantitative parameters obtained from micro-CT (BV and Tb.Th) were analyzed by two-tailed Student’s *t*-test within each group. Comparisons across unpaired groups were made according to the Mann-Whitney U test. Data concerning osteoclast number, sagittal suture area, and bone thickness were initially analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA). *Post hoc* comparison between groups used the Fisher’s protected least significant difference. Two-way ANOVA was performed to determine whether there was a significant effect of either polyethylene particles or ovariectomy or oestrogen supplementation on osteoclast number, sagittal suture area and bone thickness. Cytokines concentrations and mRNAs expression were analyzed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni/Dunnett’s test. The level of statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

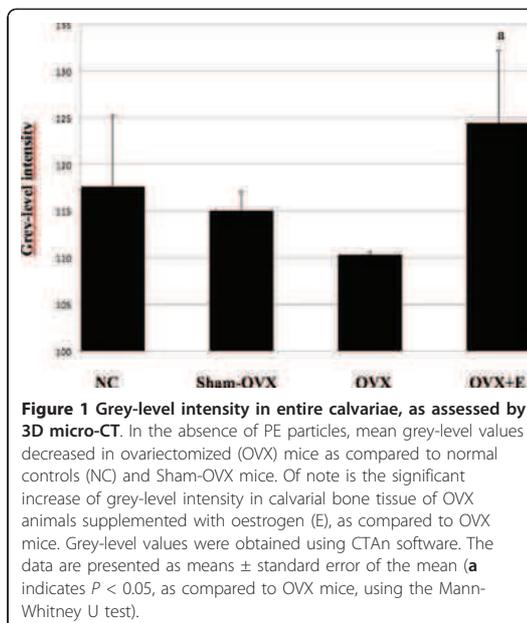
Changes after OVX

All mice had increased body-weight by the end of the experiment. The final body-weight gain was +18% in the OVX group as compared to +6.8% ($P < 0.0001$), +3.5% ($P < 0.0001$), and +11% ($P = 0.0001$) in normal controls, sham-OVX mice, and OVX+E mice, respectively.

At sacrifice, atrophy of uterine tissue was noted, indicating the effectiveness of oestrogen privation following ovariectomy. There was a significant difference in uterine weight in OVX mice group (mean, 24.5 \pm 3.6 mg), as compared to normal control animals (mean, 107.9 \pm 12 mg, $P < 0.0001$), sham-OVX mice (mean, 86.4 \pm 17 mg, $P < 0.0001$) and OVX+E mice (mean, 80.2 \pm 10.9 mg, $P < 0.0001$). In contrast, uterine weight was notably less altered after oestrogen supplementation in OVX animals as compared to normal controls (80.2 \pm 10.9 mg versus 107.9 \pm 12 mg, $P = 0.002$).

Micro-CT evaluation of osteolysis

Ovariectomy induced a consistent, although non-significant, decrease in mean grey-level intensity in calvariae without PE particles as compared to normal controls (Figure 1). Specifically, mean grey-level values were



117.6 \pm 7.7 (range, 107 to 48), 115 \pm 2 (range, 107 to 120) and 110 \pm 0.3 (range, 109 to 111), in normal controls, sham-OVX mice and OVX mice, respectively. In contrast, grey-level intensity significantly increased in OVX animals after oestrogen supplementation (124 \pm 7.8), as compared to OVX mice ($P = 0.02$), while it was similar to normal controls ($P = 0.22$) and sham-OVX mice ($P = 0.07$). The presence of PE particles induced profound changes in calvarial bone microarchitecture in all groups (Figure 2). In particle-implanted animals, BV significantly decreased within the VOI as compared to sham-implanted animals in normal control group ($P = 0.004$), in sham-OVX group ($P = 0.003$), in OVX group ($P = 0.04$) and in OVX+E group ($P = 0.001$) (Figure 3). However, decrease in BV following particle implantation was consistently less marked in the OVX group (-7.8%, as compared to -21.2% in normal control group, $P = 0.04$, to -19.9% in sham-OVX group, $P = 0.003$, and to -21.4% in OVX+E group, $P = 0.005$). Polyethylene particles did not produce any significant decrease in bone thickness (Tb.Th) in OVX mice (+3.8% as compared to sham-implanted OVX mice, $P = 0.08$), in contrast with normal controls (-13.6% as compared to sham-implanted normal controls, $P = 0.01$), sham-OVX mice (-11.1% as compared to sham-implanted sham-OVX mice, $P = 0.008$), and OVX+E group (-11.6% as compared to sham-implanted OVX+E mice, $P = 0.005$) (Figure 4).

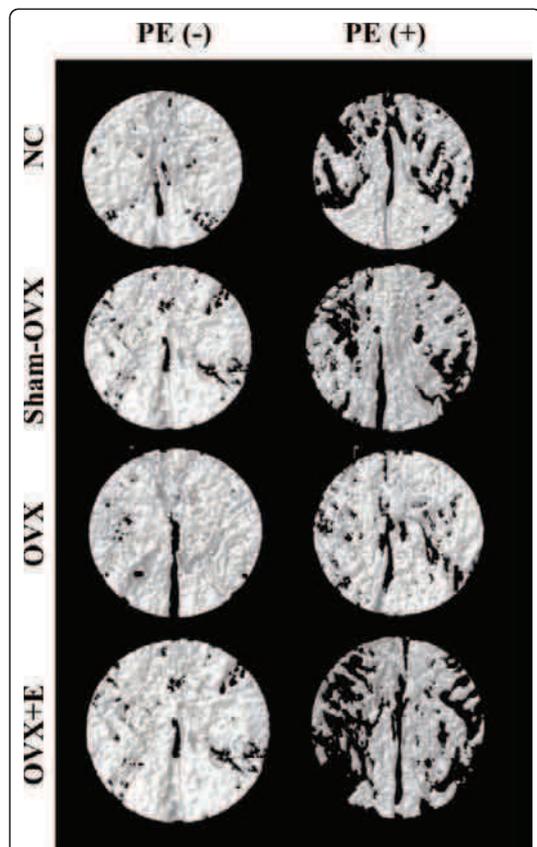


Figure 2 Effect of polyethylene particles on calvariae, as assessed by longitudinal 3D micro-CT. Representative reconstructed images of the calvarial volume of interest (VOI), two weeks after sham-implantation (PE(-)) or PE particles implantation (PE(+)) in different mice groups are shown ($n = 7$ per group). Of note is the consistent extent of bone resorption area following particles implantation in normal controls (NC), sham ovariectomized (OVX) mice and OVX animals supplemented with oestrogen (E), while bone resorption area appears limited in OVX animals implanted with particles.

Histology

Histological sections showed a consistent erosion of the calvarial bone, associated to fibrous and granulomatous scar tissue layer on the periosteal side of the calvaria in particle-implanted mice, in all groups. The most dramatic lesions were observed when PE particles were implanted in the OVX+E group (Figure 5). However, the tissue response to particles appeared limited in OVX animals without E supplementation. Using polarized light, many particles were found intracellularly within macrophages and foreign-body giant cells. TRAP

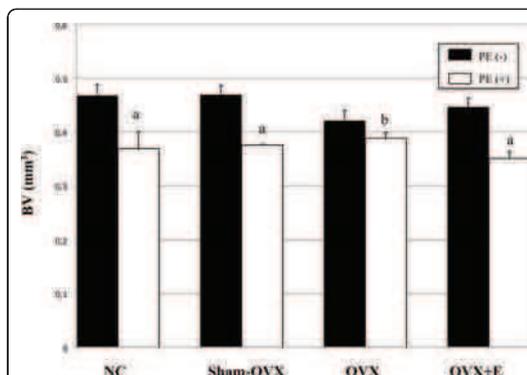


Figure 3 Effect of polyethylene particles on bone volume (BV), as assessed by longitudinal 3D micro-CT. Bone volume consistently decreased in all mice groups. However, bone loss was significantly lower in ovariectomized (OVX) mice as compared to normal controls (NC), sham-OVX mice and OVX animals supplemented with oestrogen (E). Bone volume was quantified using CTAn software. The data are presented as means \pm standard error of the mean (**a** indicates $P < 0.005$; **b** indicates $P < 0.05$, compared to internal control, using Student's *t*-test).

staining confirmed the presence of osteoclasts located in resorptive lacunae.

Histomorphometric data are shown in Table 2. One-way ANOVA revealed a significant difference for the sagittal suture area ($P < 0.0001$). The presence of PE particles induced a significant increase in SSA in normal control group ($P < 0.001$), in sham-OVX group ($P < 0.001$), in OVX group ($P < 0.001$), and in OVX+E group

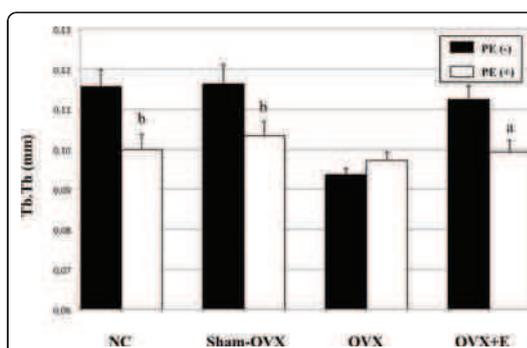


Figure 4 Effect of polyethylene particles on trabecular thickness (Tb.Th), as assessed by longitudinal 3D micro-CT. Trabecular thickness was not altered by the presence of particles in ovariectomized (OVX) mice, as opposed to the other mice groups. Trabecular thickness was quantified using CTAn software. The data are presented as means \pm standard error of the mean (**a** indicates $P < 0.005$; **b** indicates $P < 0.05$, compared to internal control, using Student's *t*-test).

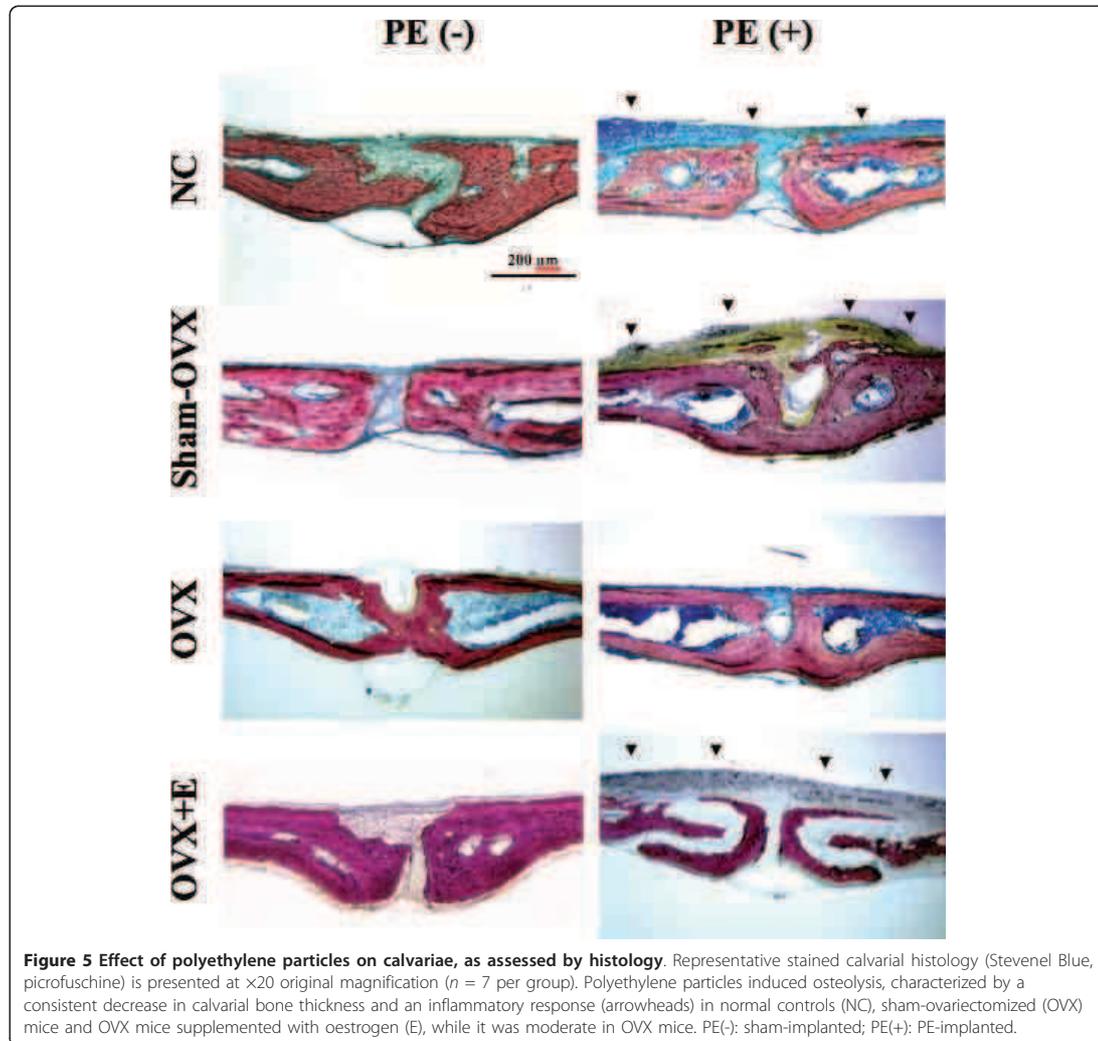


Figure 5 Effect of polyethylene particles on calvariae, as assessed by histology. Representative stained calvarial histology (Stevenel Blue, picrofuschine) is presented at $\times 20$ original magnification ($n = 7$ per group). Polyethylene particles induced osteolysis, characterized by a consistent decrease in calvarial bone thickness and an inflammatory response (arrowheads) in normal controls (NC), sham-ovariectomized (OVX) mice and OVX mice supplemented with oestrogen (E), while it was moderate in OVX mice. PE(-): sham-implanted; PE(+): PE-implanted.

Table 2 Histomorphometric results for each mice group

	Normal control group		Sham-OVX group		OVX group			
	PE (-)	PE (+)	PE (-)	PE (+)	OVX + Vehicle		OVX+E	
					PE (-)	PE (+)	PE (-)	PE (+)
SSA (mm²)	0.036 ± 0.008 (0.008 to .076)	0.10 ± 0.04 (0.05 to 0.33)	0.034 ± 0.007 (0.008 to 0.07)	0.093 ± 0.03 (0.05 to 0.34)	0.026 ± 0.01 (0.006 to 0.1)	0.09 ± 0.04 (0.01 to 0.35)	0.038 ± 0.01 (0.01 to 0.11)	0.20 ± 0.05 (0.07 to 0.46)
BT/TT	60 ± 4.7% (42% to 80%)	48 ± 5.3% (23% to 73%)	62 ± 4.6% (49% to 80%)	45 ± 4% (23% to 56%)	55 ± 5.2% (35% to 73%)	49 ± 4.9% (26% to 65%)	54 ± 5.5% (31% to 73%)	37 ± 5.1% (17% to 55%)
Δ(BT/TT)		-12 ± 5.3% (-37% to 12%)		-16 ± 4.5% (-39% to 5%)		-6.7 ± 4.9% (-30% to 9%)		-17 ± 5% (-37% to 1.2%)
Oc Nb	0.31 ± 0.3 (0 to 2)	2.2 ± 0.7 (0 to 5)	0.42 ± 0.3 (0 to 2)	2.5 ± 0.7 (0 to 5)	0.65 ± 0.4 (0 to 3)	0.7 ± 0.5 (0 to 4)	0.27 ± 0.2 (0 to 1)	2.1 ± 0.8 (0 to 6)

Values are expressed as mean ± standard error of the mean (extremes). BT, bone thickness; E, oestrogen; Oc Nb, osteoclast number; OVX, ovariectomy; PE, polyethylene; PE(-), sham-implanted; PE(+), PE-implanted; SSA, sagittal suture area; TT, tissue thickness.

($P < 0.0001$). No significant difference was found in SSA between sham-implanted normal controls group and sham-implanted OVX group ($P = 0.9$), between PE-implanted normal control mice and PE-implanted OVX mice ($P = 0.99$), and between sham-implanted normal control mice and sham-implanted OVX+E mice ($P = 1$). Two-way ANOVA revealed a significant effect of PE particles on SSA ($P < 0.0001$). There was no independent effect of OVX on SSA ($P = 1$) in the absence of particles. One-way ANOVA revealed a significant difference for osteoclast number ($P < 0.0001$). The presence of PE particles induced a consistent increase in osteoclast number in normal control group ($P < 0.0001$), in sham-OVX group ($P < 0.001$), and in OVX+E group ($P < 0.0001$), but not in OVX group ($P = 0.99$). There was also a significant effect of ovariectomy on osteoclast number ($P = 0.047$) in the absence of particles.

One-way ANOVA showed a significant difference for bone thickness ($P < 0.0001$). Implantation of PE particles resulted in a marked decrease in BT/TT in normal control group ($P = 0.001$), in sham-OVX group ($P < 0.001$), and in OVX+E group ($P < 0.0001$). However, the presence of PE particles did not influence BT/TT in OVX group ($P = 0.088$). Also, two-way ANOVA showed an independent effect of ovariectomy on BT/TT ($P < 0.001$) in the absence of particles.

Serum levels of IL-6

Serum levels of IL-6 significantly increased after PE particles implantation in all mice groups, as compared with sham-implanted internal controls ($P = 0.008$ in normal control group, $P = 0.01$ in sham-OVX mice, and $P = 0.02$ in OVX+E mice), except in OVX mice group ($P = 0.57$) (Figure 6). Ovariectomy did not significantly increase serum IL-6 concentrations in the absence of particle implantation (sham-implanted OVX group versus sham-implanted normal controls, $P = 0.78$, and sham-implanted OVX+E group versus sham-implanted normal control mice, $P = 0.84$).

Production of cytokines in organ culture

The presence of PE particles induced a significant increase in IL-1 β concentration in all mice groups (Figure 7). However, particles implantation did not significantly influence IL-6 media rates as compared to internal controls (Figure 7). In OVX mice without particles, the levels of TNF- α were significantly lower than in normal controls ($P = 0.02$). In addition, in this group, PE particles did not increase the rates of TNF- α ($P = 1$), which remained considerably lower than in normal controls and in OVX+E mice with PE particles ($P = 0.002$ and $P = 0.002$, respectively) (Figure 7). Significant differences in RANKL basal release (absence of particles implantation) were found between OVX mice and each

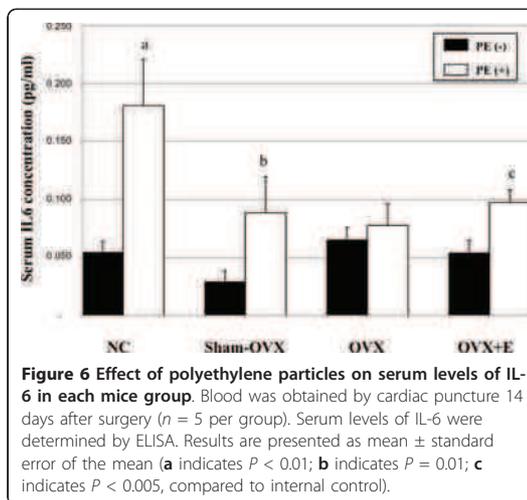


Figure 6 Effect of polyethylene particles on serum levels of IL-6 in each mice group. Blood was obtained by cardiac puncture 14 days after surgery ($n = 5$ per group). Serum levels of IL-6 were determined by ELISA. Results are presented as mean \pm standard error of the mean (a indicates $P < 0.01$; b indicates $P = 0.01$; c indicates $P < 0.005$, compared to internal control).

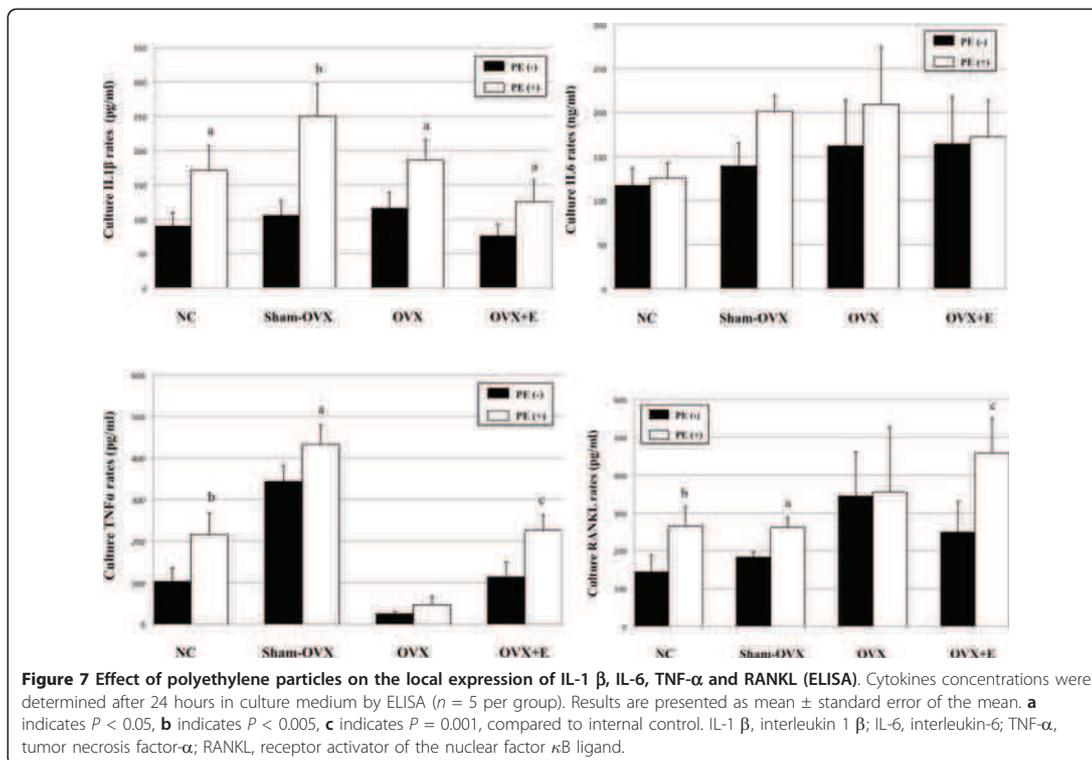
other mice groups (normal controls, $P = 0.047$, sham-OVX mice, $P = 0.016$, OVX+E mice, $P = 0.02$). Noteworthy, RANKL local production appeared to be stimulated by PE particles in normal controls, in sham-OVX mice, and in OVX+E mice, while in OVX group, no significant modification in RANKL rates could be detected following particles implantation ($P = 0.95$) (Figure 7).

Quantitation of RANKL and OPG mRNA expressions in calvariae

As shown in Figure 8, the combined effect of ovariectomy and PE particles implantation stimulated RANKL mRNA expression in calvariae, in all mice groups. However, PE-implanted calvariae in normal controls, sham-OVX and OVX+E mice expressed RANKL mRNA at levels more than twice higher than OVX mice. OPG mRNA expression was not significantly different between groups (Figure 8). As a result, the RANKL/OPG mRNA ratio significantly increased in all mice groups after PE implantation, but appeared consistently downregulated in OVX mice (Figure 8). The RANKL/OPG mRNA ratio significantly differed between OVX mice and each other mice group in the absence of particles ($P = 0.047$ as compared to normal controls, $P = 0.034$ as compared to sham-OVX mice, and $P = 0.049$ as compared to OVX+E mice). In addition, no significant difference could be observed in the basal RANKL/OPG mRNA ratio between normal controls and OVX+E mice, indicating that E supplementation reestablished RANKL mRNA expression relative to OPG mRNA.

Discussion

In a recent work [6], we have shown that experimental stimulation of bone turnover by OVX resulted in a



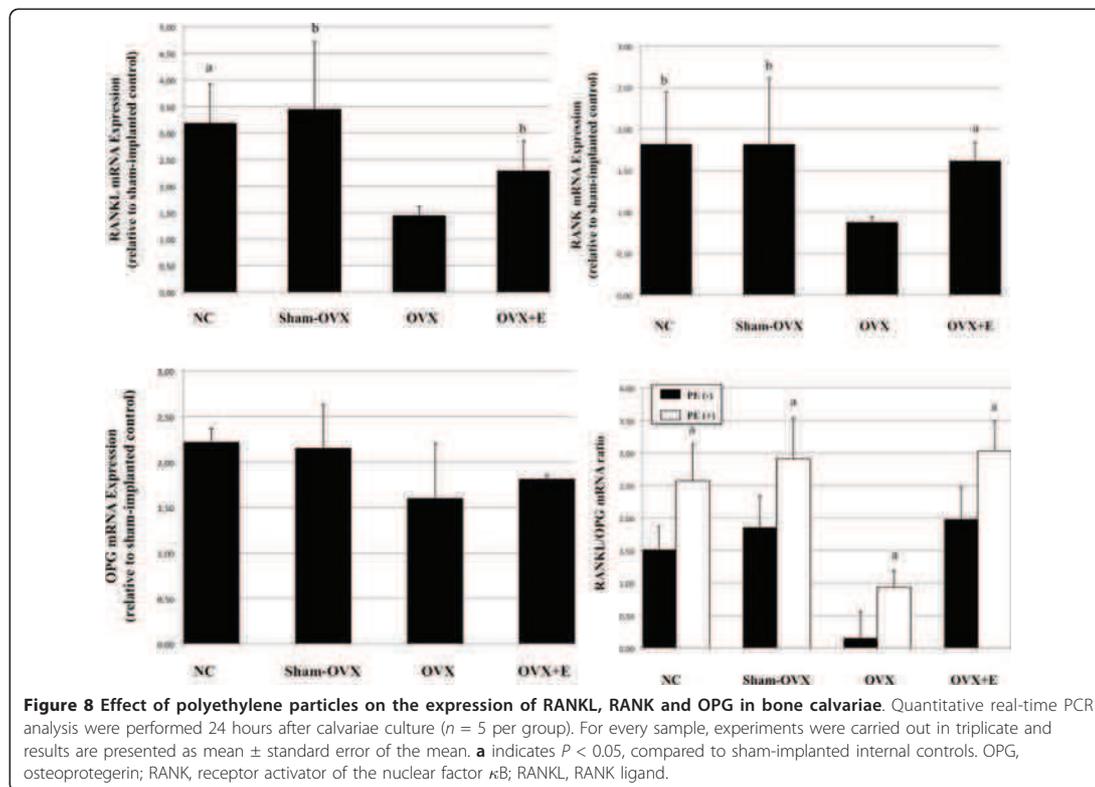
paradoxical decrease in particle-induced osteolysis in the murine calvaria model. To test the hypothesis that oestrogen-deficiency induced by OVX modulated the bone response to particulate debris, we supplemented PE particle-implanted OVX mice with 17 β -estradiol. Then, we evaluated osteolysis and the involvement of the pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β , TNF- α , and RANKL.

Our experiments show that the presence of PE particles induced an osteolytic reaction in bone calvaria in normal controls, in sham-OVX mice and in OVX+E mice, as illustrated by an extensive bone resorption and an intense inflammatory reaction involving both bone and periosteal tissue. In contrast, this process was considerably attenuated in OVX mice, with almost no modification in trabecular thickness, osteoclast number and periosteum thickness following PE implantation. In addition, Bone volume appeared consistently less altered following particles implantation, as compared to normal controls and OVX mice supplemented with oestrogen. Taken together, these data suggest that oestrogen deficiency influenced positively bone response to particulate debris. This finding appears paradoxical as clinical trials [14-16] and experimental studies [17,18] have

demonstrated the protective effects of oestrogen against inflammatory processes, such as rheumatoid arthritis (RA). However, the relationship between oestrogen and inflammation is controversial and might be related to a different response of bone and inflammation cells. Although it is admitted that oestrogen provides a protection against inflammation, it is also known that female patients are more prone to develop inflammatory diseases such as RA [19]. This point illustrates the dual action of oestrogen, both anti- and pro-inflammatory.

Numerous cellular and molecular mechanisms leading to bone resorption are common to osteolysis and oestrogen deficiency pathways. Cytokines such as IL-1, IL6, TNF- α , and RANKL are up-regulated in both bone-resorptive situations [20-24]. Differentiation of RANKL-primed osteoclasts precursors, activation of mature osteoclasts, and osteoclasts survival are enhanced by TNF- α [25]. Zhang *et al.* [26] showed that TNF- α and RANKL act synergistically on osteoclastogenesis *in vitro*. The role of TNF- α in OVX-induced bone loss is well documented [20,27,28]. Collectively, these studies suggest that up-regulation of TNF-producing cells in the bone marrow is a mechanism by which oestrogen deficiency induces bone loss. Indeed, functional blockade of

6.3. Etude B : effets de la supplémentation en oestrogènes sur l'ostéolyse induite par les particules de PE



TNF- α in mice leads to protection from OVX-induced bone loss [27]. Accordingly, we found that TNF- α local production was consistently altered in oestrogen deficient mice, suggesting its involvement in limited osteoclastogenesis in this group.

In our experiments, local release of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 appeared heterogeneous. On one hand, we found that pro-inflammatory cytokine IL-1 β was stimulated by PE particles in all groups. On the other hand, IL-6 local rates were not increased in the presence of PE particles in any group. Indeed, it has been suggested that the involvement of pro cytokines *in vivo* may be difficult to demonstrate due to compensatory process [29], and to the delayed time course of release after particle implantation. Conversely, serum IL-6 was stimulated by PE implantation in normal controls, sham-OVX and E-supplemented OVX mice, whereas no significant change occurred in OVX mice. This point correlated well with the degree of osteolytic reaction combining bone resorption and periosteal inflammatory granuloma. The role of IL-6 as a stimulator of bone resorption in post-menopausal osteoporosis is well-known [30]. IL-6 promotes bone resorption by

affecting osteoclast differentiation and activity [31]. Our results are in line with clinical data showing that serum levels of IL-6 were consistently increased in patients with loosened hip prosthesis [32]. However, authors failed to correlate serum levels of IL-6 and the volume of osteolysis [33]. These discrepancies suggest that serum cytokine levels may be influenced by various factors, such as cytokine release from other organs, and cytokine clearance rates from the joint. Taken together with our findings, we speculate that serum and local IL-6 changes may be involved in the mechanism underlying the reduction of particle-induced osteolysis observed in OVX mice. Thus, the hormonal status appears as a key factor influencing serum IL-6 levels to be considered in further clinical studies.

We observed that the combination of two bone-resorptive stimuli resulted in a down-regulation of local pro-resorptive cytokines TNF- α and RANKL, in parallel with a limitation of bone loss. The latter appeared as a consequence of decreased osteoclast activity and/or recruitment and/or accelerated apoptosis. We assume this process is regulated by the RANK/RANKL/OPG pathway, synergistically with TNF- α secretion, since

RANKL is required for osteoclasts differentiation, survival and activity [21]. Pro-resorptive cytokine production could have been altered at the cellular level. Hence, particle-induced osteolysis and postmenopausal osteoporosis represent pro-inflammatory states with increased inflammatory cytokines and activated T cells [34]. Cytokines produced or regulated by T cells can enhance osteoclast formation by increasing the RANKL/OPG ratio [35]. Oestrogen deficiency also increases the RANKL/OPG ratio through increases in pro-inflammatory effectors, including IL-1 β , IL-6, IL-11, TNF- α , MCSF and PGE [36]. RANKL expression was observed in osteoblasts/stromal cells and bone marrow in postmenopausal women. The molecular basis of the mechanism by which oestrogen deficiency induces accelerated osteoclastogenesis is not yet elucidated [37]. In mice, the selective ablation of oestrogen receptor in mature osteoclasts mimicked an osteoporotic bone phenotype [24], suggesting that oestrogen directly regulates the life span of differentiated osteoclasts, independently of an inflammatory pathway.

We hypothesize that the paradoxical decrease in bone response to PE particles in OVX mice could be driven by an innate protective mechanism that ultimately attenuated focal bone resorption. Hence, a tight control of innate immunity is essential because a disproportionate immune response may considerably compound morbidity. Recent studies suggested the involvement of T cells not only in pathogen clearance but also in regulating adaptative and innate immunity [38]. Recently, Guarda *et al.* [39] reported that excessive inflammation was suppressed by effector and memory T cells, via the blockade of mature IL-1 β secretion, suggesting a possible mechanism for the control of excessive inflammatory responses.

We recognize limitations may have affected our findings. First, calvarial bone tissue considerably differs from long bone tissue with respect to cells, matrix composition and mineralization. Osteoclasts activity has been shown to be highly variable, depending on bone-site origin [40,41]. Specifically, it was reported that proteolytic enzymes used for bone matrix digestion [40,42], expression of TRAP enzyme, and size of osteoclasts originated from calvarial bone differed from those present in long bones [41,43]. Additionally, van den Bos *et al.* [44] reported that calvarial bone exhibited differences in matrix composition compared to long bone, including degree of mineralization, amounts of collagen, osteoglycin, and pigment epithelium derived factor. These data together indicate a putative difference in bone resorption characteristics in calvaria. Although the murine calvarial model has been extensively used to evaluate particle-induced osteolysis [4-6], the clinical relevance of our data should be considered with caution. Second, the

osteolysis murine model does not fully reproduce the loading conditions of a prosthetic implant subjected to loosening. The consequences of OVX on mouse calvarial bone have been poorly studied. However, our observations revealed that basal calvarial bone thickness was significantly reduced in OVX mice, confirming previous findings [10,45]. This is consistent with bone resorption of the skull and subsequent parietal bone thinning observed in postmenopausal osteoporotic women [46]. Therefore, the current experimental protocol likely mimicked comparable cellular and biologic bone responses in OVX mice that occur in the early postmenopausal period. In the present work, we did not evaluate cytokines local rates in a time-dependant fashion after particles implantation. Hence, pro-inflammatory cytokines are known to be highly labile and, subsequently, their local and serum concentrations may vary with time. However, we limited our experiments to the time period preceding the onset of theoretical substantial bone repair. Therefore, it is likely that our cytokines and mRNA evaluations are compatible with bone cellular response tested in our model.

Conclusions

The present study analysed the consequences of oestrogen deprivation in a murine model of particle-induced osteolysis. We demonstrated that oestrogen deficiency significantly attenuated osteolytic response to PE particles. This phenomenon was associated with a down-regulation of pro-inflammatory and pro-resorptive cytokines TNF- α and RANKL, together with an absence of increase of serum IL-6. We favour the alternative that the combination of two bone-resorptive phenomenon altered cytokines production, possibly via the implication of the periosteum in this mice model.

Abbreviations

BT: bone thickness; BV: bone volume; CT: computed tomography; E: oestrogen; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; IL-1 β : interleukin-1 β ; IL-6: interleukin-6; LAL: Limulus Amebocyte Lysate; OPG: osteoprotegerin; OVX: ovariectomy; PE: polyethylene; RANKL: RANK ligand; RANKL: receptor activator of the nuclear factor κ B; RT-PCR: real-time polymerase chain reaction; SSA: sagittal suture area; Tb.Th: trabecular thickness; TNF- α : tumor necrosis factor- α ; TRAP: tartrate-specific acid phosphatase-positive; TT: tissue thickness; VOI: volume of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Isabel Le Disquet, IFR de Biologie Intégrative, Service de Microscopie Electronique, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, for providing particles scanning electron microscopy analysis, and Laurent Havard, Service de Pharmacie, European Teaching Hospital, Paris, for providing particles decontamination and endotoxins tests.

Author details

¹Laboratoire de Bioingénierie et Biomécanique Ostéo-articulaires, Faculté de Médecine Paris 7-Denis Diderot, 10, avenue de Verdun, 75010 Paris, France. ²Useful Progress, 23, rue d'Anjou, 75008 Paris, France. ³Institut Pasteur and INSERM U747, Laboratory of Stem cells, Signaling and Prions, Université Paris 5-René Descartes, 45 Rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06, France.

6.3. Etude B : effets de la supplémentation en oestrogènes sur l'ostéolyse induite par les particules de PE

Nich et al. *Arthritis Research & Therapy* 2011, **13**:R100
<http://arthritis-research.com/content/13/3/R100>

Page 11 of 12

⁴INSERM U606, Faculté de Médecine Paris 7-Denis Diderot, 10, avenue de Verdun, 75010 Paris, France.

Authors' contributions

CN carried out the histological experiments and analyses and drafted the manuscript. JL carried out the cytokines measurements and RT-PCR. AM carried out micro-CT analyses. All other authors were involved in the design of the study, interpretation of the data and revision of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 4 January 2011 Revised: 17 May 2011

Accepted: 22 June 2011 Published: 22 June 2011

References

- Willert HG, Bertram H, Buchhorn GH: Osteolysis in alloarthroplasty of the hip. The role of ultra-high molecular weight polyethylene wear particles. *Clin Orthop Relat Res* 1990, **258**:95-107.
- Schwarz EM, O'Keefe RJ, Looney RJ: Bone implant interface, osteolysis and potential therapies. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2004, **4**:390-392.
- Kobayashi S, Takaoka K, Saito N, Hisa K: Factors affecting aseptic failure of fixation after primary Charnley total hip arthroplasty. Multivariate survival analysis. *J Bone Joint Surg Am* 1997, **79**:1618-1627.
- von Knoch M, Jewison DE, Sibonga JD, Turner RT, Morrey BF, Loer F, Berry DJ, Scully SP: Decrease in particle-induced osteolysis in obese (ob/ob) mice. *Biomaterials* 2004, **25**:4675-4681.
- Zhang C, Tang T, Ren W, Zhang X, Dai K: Influence of mouse genetic background on wear particle-induced *in vivo* inflammatory osteolysis. *Inflamm Res* 2008, **57**:211-215.
- Nich C, Marchadier A, Sedel L, Petite H, Vidal C, Hamadouche M: Decrease in particle-induced osteolysis in ovariectomized mice. *J Orthop Res* 2010, **28**:178-183.
- Ishiguro N, Kojima T, Ito T, Saga S, Anma H, Kurokouchi K, Iwahori Y, Iwase T, Iwata H: Macrophage activation and migration in interface tissue around loosening total hip arthroplasty components. *J Biomed Mater Res* 1997, **35**:399-406.
- Green TR, Fisher J, Matthews JB, Stone MH, Ingham E: Effect of size and dose on bone resorption activity of macrophages by *in vitro* clinically relevant ultra high molecular weight polyethylene particles. *J Biomed Mater Res* 2000, **53**:490-497.
- Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y: IL-6, RANKL, TNFalpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004, **15**:49-60.
- Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M: Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 1989, **45**:360-366.
- Passeri G, Girasole G, Jilka RL, Manolagas SC: Increased interleukin-6 production by murine bone marrow and bone cells after estrogen withdrawal. *Endocrinology* 1993, **133**:822-828.
- Spelsberg TC, Subramaniam M, Riggs BL, Khosla S: The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. *Mol Endocrinol* 1999, **13**:819-828.
- Müller R, van Campenhout H, van Damme B, Van Der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, Rügsegger P: Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 1998, **23**:59-66.
- van den Brink HR, van Everdingen AA, van Wijk MJ, Jacobs JW, Bijlsma JW: Adjuvant oestrogen therapy does not improve disease activity in postmenopausal patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1993, **52**:862-865.
- Hall GM, Daniels M, Huskisson EC, Spector TD: A randomized controlled trial of the effect of hormone replacement therapy on disease activity in postmenopausal rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1994, **53**:112-116.
- D'Elia HF, Mattsson LA, Ohlsson C, Nordborg E, Carlsten H: Hormone replacement therapy in rheumatoid arthritis is associated with lower serum levels of soluble IL-6 receptor and higher insulin-like growth factor 1. *Arthritis Res Ther* 2003, **5**:202-209.
- Yoneda T, Ishimaru N, Arakaki R, Kobayashi M, Izawa T, Moriyama K, Hayashi Y: Estrogen deficiency accelerates murine autoimmune arthritis associated with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand-mediated osteoclastogenesis. *Endocrinology* 2004, **145**:2384-2391.
- Subramanian S, Tovey M, Afentoulis M, Krogstad A, Vandenbark AA, Offner H: Ethinyl estradiol treats collagen-induced arthritis in DBA/1LacJ mice by inhibiting the production of TNF-alpha and IL-1beta. *Clin Immunol* 2005, **115**:162-172.
- da Silva JA, Willoughby DA: The influence of sex in arthritis: is cartilage an overlooked factor? *J Rheumatol* 1994, **21**:791-796.
- Kimble RB, Srivastava S, Ross FP, Matayoshi A, Pacifici R: Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production. *J Biol Chem* 1996, **271**:28890-28897.
- Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, Mc Cabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM: Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999, **402**:304-309.
- Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S, Elliott R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan SC, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, Mc Cabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ: RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:1566-1571.
- Teitelbaum SL: Osteoclasts, integrins, and osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2000, **18**:344-349.
- Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S: Estrogen prevents bone loss via oestrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* 2007, **130**:811-823.
- Childs LM, Goater JJ, O'Keefe RJ, Schwarz EM: Efficacy of etanercept for wear debris-induced osteolysis. *J Bone Miner Res* 2001, **16**:338-347.
- Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM, Mukherjee A, Abu-Amer Y: Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem* 2001, **276**:563-568.
- Kimble RB, Matayoshi AB, Vannice JL, Kung VT, Williams C, Pacifici R: Simultaneous block of interleukin-1 and tumor necrosis factor is required to completely prevent bone loss in the early postovariectomy period. *Endocrinology* 1995, **136**:3054-3061.
- Roggia C, Gao Y, Cenci S, Weitzmann MN, Toraldo G, Isaia G, Pacifici R: Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which oestrogen deficiency induces bone loss *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:13960-13965.
- Taki N, Tatro JM, Lowe R, Goldberg VM, Greenfield EM: Comparison of the roles of IL-1, IL-6, and TNFalpha in cell culture and murine models of aseptic loosening. *Bone* 2007, **40**:1276-1283.
- Lerner UH: Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res* 2006, **85**:596-607.
- Lorenzo J: Interactions between immune and bone cells: new insights with many remaining questions. *J Clin Invest* 2000, **106**:749-752.
- Hernigou P, Intrator L, Bahrami T, Bensussan A, Farcet JP: Interleukin-6 in the blood of patients with total hip arthroplasty without loosening. *Clin Orthop Relat Res* 1999, **366**:147-154.
- Tanaka R, Yasunaga Y, Hisatome T, Yamasaki T, Iwamori H, Ochi M: Serum interleukin 8 levels correlate with synovial fluid levels in patients with aseptic loosening of hip prosthesis. *J Arthroplasty* 2005, **20**:1049-1054.
- Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, Pacifici R: Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J Clin Invest* 2000, **106**:1229-1237.
- Weitzmann MN, Pacifici R: The role of T lymphocytes in bone metabolism. *Immunol Rev* 2005, **208**:154-168.
- Pacifici R: Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996, **11**:1043-1051.
- Sato T, Watanabe K, Masuhara M, Hada N, Hakeda Y: Production of IL-7 is increased in ovariectomized mice, but not RANKL mRNA expression by osteoblasts/stromal cells in bone, and IL-7 enhances generation of osteoclast precursors *in vitro*. *J Bone Miner Metab* 2007, **25**:19-27.

38. Kim KD, Zhao J, Auh S, Yang X, Du P, Tang H, Fu YX: **Adaptive immune cells temper initial innate responses.** *Nat Med* 2007, **13**:1248-1252.
39. Guarda G, Dostert C, Staehli F, Cabalzar K, Castillo R, Tardivel A, Schneider P, Tschopp J: **T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes.** *Nature* 2009, **460**:269-273.
40. Everts V, de Vries TJ, Helfrich MH: **Osteoclast heterogeneity: lessons from osteopetrosis and inflammatory conditions.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1792**:757-765.
41. de Souza Faloni AP, Schoenmaker T, Azari A, Katchburian E, Cerri PS, de Vries TJ, Everts V: **Jaw and long bone marrows have a different osteoclastogenic potential.** *Calcif Tissue Int* 2011, **88**:63-74.
42. Everts V, Korper W, Hoeben KA, Jansen ID, Bromme D, Cleutjens KB, Heeneman S, Peters C, Reinheckel T, Saftig P, Beertsen W: **Osteoclastic bone degradation and the role of different cysteine proteinases and matrix metalloproteinases: differences between calvaria and long bone.** *J Bone Miner Res* 2006, **21**:1399-1408.
43. Perez-Amodio S, Jansen DC, Schoenmaker T, Vogels IM, Reinheckel T, Hayman AR, Cox TM, Saftig P, Beertsen W, Everts V: **Calvarial osteoclasts express a higher level of tartrate-resistant acid phosphatase than long bone osteoclasts and activation does not depend on cathepsin K or L activity.** *Calcif Tissue Int* 2006, **79**:245-254.
44. van de Bos T, Speijer D, Bank RA, Bromme D, Everts V: **Differences in matrix composition between calvaria and long bone in mice suggest differences in biomechanical properties and resorption: Special emphasis on collagen.** *Bone* 2008, **43**:459-468.
45. Libouban H, Moreau MF, Baslé MF, Bataille R, Chappard D: **Increased bone remodeling due to ovariectomy dramatically increases tumoral growth in the 5T2 multiple myeloma mouse model.** *Bone* 2003, **33**:283-292.
46. Takata S, Takao S, Yoshida S, Hayashi F, Yasui N: **Therapeutic effects of one-year alendronate treatment in three cases of osteoporosis with parietal thinning of skull.** *J Med Invest* 2008, **55**:297-302.

doi:10.1186/ar3381

Cite this article as: Nich *et al.*: Oestrogen deficiency modulates particle-induced osteolysis. *Arthritis Research & Therapy* 2011 **13**:R100.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



6.4 Conclusion

L'imagerie par micro-tomographie X couplée aux outils d'analyses 3D a permis l'étude qualitative et quantitative de la morphologie de l'os de la calvaria. Cette étude présente l'originalité de s'intéresser à la structure d'un os plat comparativement aux études classiques centrées sur l'os trabéculaire et cortical.

Dans notre modèle murin d'ostéolyse aux particules de PE, l'analyse par micro-CT apporte un complément substantiel à l'histomorphométrie notamment par l'aspect tridimensionnel. De plus les zones d'intérêts sont d'avantage contrôlées que les coupes histologiques. La définition d'une ROI sphérique a permis de s'affranchir des problèmes d'orientation de l'échantillon, favorisant ainsi une meilleure reproductibilité.

Nos observations en imagerie sont en accord avec les données d'histologie et de biochimie relatives aux mécanismes d'ostéolyse par les particules de PE. De plus le déficit en oestrogènes chez les souris ovariectomisées et à l'inverse la supplémentation hormonale montre des modulations de la réponse osseuse tant sur le plan morphologique que biochimique. L'ensemble de ces résultats montre une protection relative de l'ovariectomie vis à vis de l'ostéolyse induite par les particules de PE via des mécanismes de régulation impliquant des cytokines pro-inflammatoires et pro-résorptives.

Chapitre VII

Analyse des tissus adipeux

Collaborations :

- Catherine Vidal, Institut Pasteur et INSERM U 747, Paris
- Jean-Pierre Tafani, APCIS, Paris
- Roger Lédée, Laboratoire PRISME, Orléans
- Sylvain Ordureau, UsefulProgress, Paris
- Christophe Léger, Laboratoire PRISME, Orléans

Sommaire

7.1	Introduction	128
7.2	Imagerie des tissus adipeux chez l'humain	128
7.3	Imagerie des tissus adipeux chez le petit animal	129
7.4	Analyses des images du tissu adipeux	129
7.5	Article : "Quantitative CT imaging for adipose tissue analysis in mouse model of obesity"	130
7.6	Discussion	139
7.6.1	Imagerie avec le scanner médical CT	139
7.6.2	Classification des voxels du tissu adipeux	139
7.6.3	Validation des outils basée sur les corrélations avec le poids de l'animal	140
7.7	Conclusion	141

7.1 Introduction

L'obésité, un des problèmes de santé publique, se caractérise par une augmentation de la masse de tissu adipeux chez un individu. Pour comprendre ce problème sous-jacent à l'obésité, il est important de pouvoir disposer d'une estimation quantitative et qualitative du tissu adipeux. Le volume total de tissu adipeux n'est pas réparti uniformément dans le corps. On observe de plus une accumulation dans des sites spécifiques de l'abdomen, ces amas constituent la graisse viscérale et la graisse sous-cutanée. chez l'humain ces différents types de tissus adipeux jouent des rôles physiologiques différents dans les pathologies associées à l'obésité [Kuo et al., 2007] [Pou et al., 2009]. La quantité de graisse viscérale est un facteur de risque de maladies cardiovasculaire et de diabète [Sumner et al., 2002]. La graisse sous-cutanée a été associée à des problèmes de régulation des taux d'insuline, de triglycérides ou encore de cholestérol [Despres et al., 2008] [Demerath et al., 2008].

La compréhension des mécanismes des pathologies liées à l'obésité chez l'humain peut être abordée par l'analyse de modèles animaux. Les souris génétiquement modifiées, qui constituent un modèle de choix de l'obésité, nécessitent des outils spécifiques à la fois pour l'imagerie et pour le traitement des données.

Dans ce travail nous utilisons le scanner médical associé à des méthodes de traitement d'image pour l'imagerie et l'analyse des tissus adipeux chez la souris.

7.2 Imagerie des tissus adipeux chez l'humain

Chez l'humain, les méthodes d'évaluation de la composition corporelle permettent d'étudier la répartition dans le corps entre les tissus minéralisés, musculaires et adipeux. Une revue détaillée des méthodes d'investigation de la composition corporelle est donnée par Mattsson [Mattsson and Thomas, 2006].

L'indice de masse corporelle (IMC, rapport entre la taille et le poids) et l'épaisseur des plis cutanés sont des techniques utilisées pour évaluer la quantité de tissu adipeux dans le corps. Elles ne donnent pas de mesures directes mais sont un reflet de la répartition de la graisse. L'impédancemétrie (évaluation fonction de la taille, du poids et de l'impédance du corps), la pléthysmographie (évaluation à partir des volumes d'airs déplacés) ou l'hydrodensitométrie (évaluation en fonction du volume du corps et de son poids) sont d'autres techniques indirectes qui renseignent sur la composition corporelle à l'échelle de l'individu. Ces techniques ne permettent cependant pas d'apprécier la distribution des tissus adipeux.

Avec les ultrasons, il est possible d'étudier localement les amas de graisse localisés sous la peau mais leurs faible pénétration en profondeur dans les tissus rend impossible l'analyse des amas de graisse localisés dans l'abdomen.

Les méthodes par imagerie offrent la possibilité de distinguer les tissus adipeux des autres tissus et de les localiser dans le corps. La densitométrie donne la répartition en 2D des tissus adipeux, musculaires et minéralisés. L'imagerie par IRM et CT, qui apportent une information 2D [Ellis et al., 2007] [Positano et al., 2009] ou 3D [Al-Attar et al., 2006] [Brennan et al., 2005] [Jin et al., 2003] [Furukawa et al., 2010],

sont reconnues comme des méthodes de références.

Les premières études par imagerie ne permettaient une investigation que sur quelques coupes 2D. La zone de positionnement de ces coupes était centrée sur la région ombilicale, qui présente à la fois un maximum de graisse et un ratio important entre graisse viscérale et sous-cutanée. Cette région est également celle considéré lors des études en 3D.

Que ce soit en IRM ou en tomographie X, l'analyse 3D des tissus adipeux est divisée en trois points importants :

- la définition de la région d'analyse qui doit être la plus représentative de l'ensemble de l'individu
- la quantification des volumes de graisse
- la séparation entre graisse viscérale et sous-cutanée

7.3 Imagerie des tissus adipeux chez le petit animal

Chez le petit animal, la majorité des études estiment le degré d'obésité post-mortem par dissection du tissu adipeux ; méthodes coûteuses en temps et en sacrifices d'animaux. Récemment, d'autres approches ont été décrites, utilisant du matériel dédié au petit animal par micro-IRM [Du et al., 2005] [Hildebrandt et al., 2002] [Papademetris et al., 2005] et micro-CT [Lublinsky et al., 2007] [Lublinsky et al., 2009] [Luu et al., 2008]. L'imagerie IRM reste limitée par sa complexité et son coût qui ne permettent pas une utilisation en routine. Le micro-CT in vivo, est très performant, cependant les temps d'acquisitions sont longs (environ 40minutes) et entraînent une irradiation des animaux qui s'avère nocive pour un suivi longitudinal. De plus la résolution des derniers scanners CT est similaire à la résolution nécessaire pour l'imagerie des tissus adipeux de la souris [Judex et al., 2010].

Le Tableau 7.1 reprend les éléments caractéristiques des modalités d'imagerie utilisées pour l'imagerie des tissus adipeux.

On peut remarquer que l'imagerie CT appliquée à la souris semble offrir le meilleur compromis entre de temps d'acquisition, de coûts d'exploitation et de résolution.

7.4 Analyses des images du tissu adipeux

Les modalités IRM et CT donnent des images volumiques en niveaux de gris. La méthode la plus simple pour segmenter les voxels de graisse est d'utiliser un seuillage global avec deux valeurs de seuils fixes. Cette méthode a souvent été utilisée pour les images IRM [Brennan et al., 2005] [Al-Attar et al., 2006] et CT [Hildebrandt et al., 2002] [Luu et al., 2008] [Judex et al., 2010]. En tomographie X, ces bornes de seuillage sont choisies, soit par calibration ex vivo [Luu et al., 2008], soit avec des valeurs issues d'études antérieures [?]. Hormis l'aspect restrictif de cette

7.5. Article : "Quantitative CT imaging for adipose tissue analysis in mouse model of obesity"

Technique	2D/3D	Résolution des images	Temps corps entier	Contraste graisse	<i>in vivo</i>	Limitations
IRM (homme)	2D/3D	2x2x8mm		+++	oui	non-homogénéité
CT (homme)	2D/3D	0.8x0.8x3mm		++	oui	irradiation
DXA (souris)	2D	180 μ m	3min	++	oui	reproductibilité
micro-IRM	2D/3D	x500 μ m	3min	+++	oui	coût
micro-CT)	2D/3D	76 μ m	45min	++	??	irradiation
CT (souris)	2D/3D	150 μ m	1sec	++	oui	résolution ?

TABLE 7.1 – Comparaison des méthodes d'imagerie utilisées pour l'étude de la graisse chez l'humain et la souris

méthode, il s'ajoute le problème de l'homogénéité des niveaux de gris. La variation d'intensité due à la chaîne d'acquisition entraîne avec cette méthode de seuillage des erreurs sur l'estimation des volumes. Ce problème a été démontré récemment pour le CT [Lang et al., 2008] et également pour l'IRM [Li et al., 2008].

D'autres méthodes semi-automatiques ont été proposées pour la correction des non-homogénéité des niveaux de gris et pour la segmentation des voxels de graisse. Ces méthodes sont basées sur l'égalisation d'histogrammes [Brennan et al., 2005] ou sur la modélisation des niveaux de gris avec des surfaces [Kullberg et al., 2007]. Une méthode à base de logique floue (FCM) a également été proposé comme méthode de segmentation non supervisée [Positano et al., 2004] [Sussman et al., 2010].

Pour la séparation des amas de graisse viscérale et sous-cutanée, certains auteurs ont proposé d'utiliser des méthodes segmentation basées sur des contours actifs [Positano et al., 2009] ou avec des opérations morphologiques [Lublinsky et al., 2009].

7.5 Article : "Quantitative CT imaging for adipose tissue analysis in mouse model of obesity"

Dans cet article, nous montrons que :

- les tissus adipeux de la souris peuvent être imagés à l'aide d'un scanner médical normalement dédié à l'humain
- la modélisation de l'histogramme avec des mixtures gaussiennes permet de classifier les voxels de graisse
- l'analyse en 2D le long de l'animal des rapports entre graisse et muscle permet d'identifier des région d'interet
- la segmentation avec des contours actifs permet la séparation entre graisse viscérale et sous-cutanée

Quantitative CT imaging for adipose tissue analysis in mouse model of obesity

A. Marchadier^{a,c}, C. Vidal^b, J.-P. Tafani^d, S. Ordureau^c, R. Lédée^a C. Léger^a

^a Institut PRISME, UPRES EA n°4229, 12 rue de Blois, 45067 Orléans, France;

^b Institut Pasteur and INSERM U747, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris

^c UsefulProgress, 23 rue d'Anjou, 75008 Paris, France

^d APCIS, 14 avenue du Général Leclerc, 94700 Maisons Alfort

ABSTRACT

In obese humans CT imaging is a validated method for follow up studies of adipose tissue distribution and quantification of visceral and subcutaneous fat. Equivalent methods in murine models of obesity are still lacking. Current small animal micro-CT involves long-term X-ray exposure precluding longitudinal studies. We have overcome this limitation by using a human medical CT which allows very fast 3D imaging (2 sec) and minimal radiation exposure. This work presents novel methods fitted to in vivo investigations of mice model of obesity, allowing (i) automated detection of adipose tissue in abdominal regions of interest, (ii) quantification of visceral and subcutaneous fat.

For each mouse, 1000 slices (100µm thickness, 160 µm resolution) were acquired in 2 sec using a Toshiba medical CT (135 kV, 400mAs). A Gaussian mixture model of the Hounsfield curve of 2D slices was computed with the Expectation Maximization algorithm. Identification of each Gaussian part allowed the automatic classification of adipose tissue voxels. The abdominal region of interest (umbilical) was automatically detected as the slice showing the highest ratio of the Gaussian proportion between adipose and lean tissues. Segmentation of visceral and subcutaneous fat compartments was achieved with 2D $\frac{1}{2}$ level set methods.

Our results show that the application of human clinical CT to mice is a promising approach for the study of obesity, allowing valuable comparison between species using the same imaging materials and software analysis

Keywords: small animal imaging, medical CT, adipose tissue, gaussian mixture model, expectation maximization, level set segmentation

1. INTRODUCTION

In human, the accurate determination of adipose tissue deposits throughout the body is an important issue in medical analysis of obesity. Different types of adipose tissue at different locations (subcutaneous versus visceral) play different physiological roles. Visceral adipose tissue is a significant risk factor for coronary artery diseases or diabetes [1] and more predictive of obesity-induced pathologies than total or subcutaneous adipose tissues. MRI and CT imaging techniques allow accurate and non invasive analysis of adipose tissue distribution. These imaging modalities differ in term of cost, reproducibility, accuracy and acquisition time. Both MRI and CT, have been used in 2D [2-6] and in 3D [7-12] in human. Better assessment of adipose tissue distribution is provided using a 3D region of interest than using a single slice [6].

Equivalent methods in murine models of obesity are still lacking. Micro-MRI technique was used for adipose tissue analysis in rodent but involves prohibitive costs and long acquisition time [13,14]. Current small animal micro-CT involves long-term X-ray exposure precluding longitudinal studies [15-17]. We have overcome this limitation by using a human medical CT which allows accurate and very fast 3D imaging and minimal radiation exposure. The resolution, reaches in the last generation of medical CT, is similar to the resolution needed to image adipose tissue in small rodent [16].

For both human and small animal, manual adipose tissue quantification is often performed using two fixed level of thresholds [15-17]. Several automatic methods have been developed to classify adipose tissue voxel using connectedness map [7] or FCM [4,5] and to segment visceral and subcutaneous compartments [4,5,10,13]

We present an automatic method that classify adipose tissue in 3D, segment visceral and subcutaneous adipose tissue and detect the abdominal region of interest. Our method uses Gaussian mixture model, expectation maximization algorithm like Positano's method, and Chan-Vese based level sets.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Method overview

A human medical CT was used for imaging adipose tissue in mice. The global data processing of the data included three studies : 1) a Gaussian mixture model (GMM) designed to identify voxels of adipose tissue and lean tissue, 2) analysis of GMM proportions along the mouse body in order to automatically define the region of interest and 3) segmentation of visceral versus subcutaneous adipose tissue using level sets method (Figure 1).

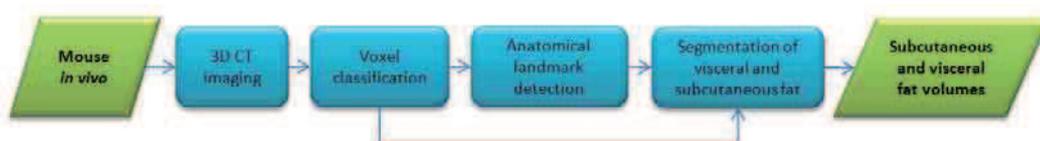


Fig 1: Fat tissue classification process

2.2 Mouse model of obesity

Male and female Swiss OF1, 10 weeks old, were obtained from the Charles River laboratory (France). The control group (n=8) received normal diet. Experimental obesity was produced in mice fed with highly energetic food pellets (A4010 rodent food pellets, Safe, Augy, France). Group1 mice (n=4) received a controlled amount of pellets. Group2 mice (n=4) was fed ad libitum (group2). For the CT imaging, mice were briefly anesthetized with isoflurane.

2.3 Scanning procedures

We used a medical multi-detector row CT (Aquilon 64, Toshiba Medical Systems Corp., Tochigi, Japan). The X-ray source was set with a voltage peak of 135 kV and a tube current of 400mAs. The imaging time of the mouse whole body was two seconds allowing the acquisition of 1000 slices. The resolution of the reconstructed image was a non-isotropic voxel of 160x160x100 μ m. Figure 2 shows different views obtained from the same scan illustrating various organs and tissues visualization.



Figure 2 : Different views of the same CT scan of a mouse : skin (a), lung (b), adipose tissue (c), mineralization (e) and bone (e) visualisations

2.4 Voxel classification of fat and lean tissues

We focused the analysis on a subpart of the Hounsfield curve [-400 HU ; 300 HU] to avoid contribution of other tissues such as lung or bone. We used a mixture model of three Gaussians, two for adipose and lean tissues and one for others tissues. Each Gaussian can be expressed as:

$$f_i(x, \mu, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (1)$$

where μ is the mean and σ^2 the variance of the Gaussian function f_i . The mixture model is the linear combination of three Gaussian functions as described below:

$$G = \sum_{n=1}^3 \alpha_i \cdot f_i \quad (2)$$

where G represents the Gaussian mixture model, α_i is the proportion corresponding to the Gaussian function f_i . The three Gaussian proportions are driven by the following equation:

$$\alpha_1 + \alpha_2 + \alpha_3 = 1 \quad (3)$$

For each Gaussian, three parameters were estimated by means of the Expectation Maximization algorithm (EM). EM is an iterative method which alternates between performing an expectation (E) step and a maximization (M) step [18]. The parameter values used at the initial step are shown in Table 1 :

	Mean	Variance	Proportion
Gaussian 1 : Fat	-135 HU	2500 HU	0.3
Gaussian 2 : Lean	80 HU	2500 HU	0.3
Gaussian 3 : Others tissues	300 HU	2500 HU	0.3

Table 1: Values of the initialization of the parameters of the Gaussian model

The Figure 3 illustrates the Hounsfield curve obtained from a slice in the abdominal area and the corresponding fitted curve obtained with the Gaussian mixture model (GMM).

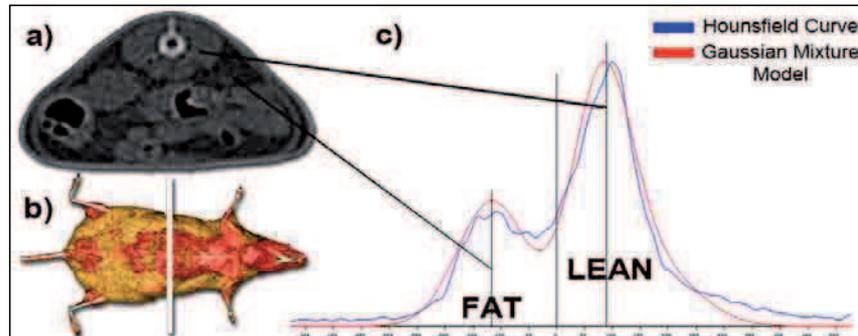


Fig 3: On the left, example of 2D slice (a) and its localization on whole body mouse. On the right, Hounsfield curve of the slice and corresponding Gaussian mixture model of the distribution of fat and lean tissues (c).

This model was applied on each 2D transverse slices along the animal as shown in Figure 4.

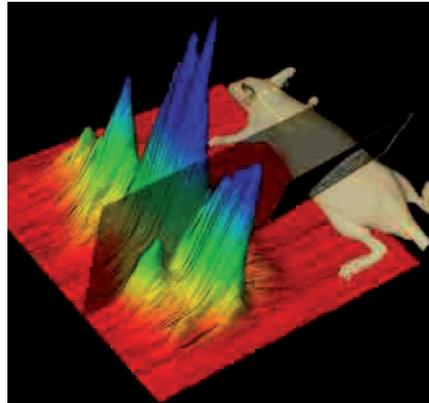


Fig 4: Serial slice associated mixture model of the whole body.

Analysis of adipose tissue volumes was performed with two methods : 1) the GMM method and 2) the method with a Fixed Thresholding (FT method) range of [-250 HU ; -50 HU].

2.5 Automatic detection of the region of interest

We defined a reference abdominal slice of interest (corresponding to umbilical in human) by the image showing the highest amount of adipose tissue compared to amount of lean tissue. This slice was automatically detected using the proportions of the GMM previously computed as described in the following equations :

$$R_i = \left(\frac{\alpha_{fat,i}}{\alpha_{lean,i}} \right) \quad (4)$$

$$I = \max_i(R_i) \quad (5)$$

where R_i represents the ratio of slice i , $\alpha_{adipose,i}$ the proportion parameter of the adipose tissue Gaussian model of slice of index i , and $\alpha_{lean,i}$ the proportion parameter of the lean tissue Gaussian model of slice of index i and I the index of the detected slice. The distribution of the ratio R along the body is shown in figure 5.

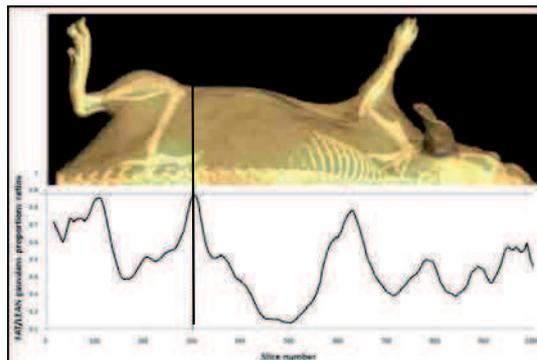


Figure 5 : The bottom curve shows the ratio R for each slice. The slice of interest has been detected around the slice numbered 300. The up picture illustrates the anatomical localization of the slice.

The Region Of Interest (ROI) included 200 slices (20 mm) centered on the detected slice. This ROI was compared to previously described regions of interest [] [], extracted manually in vertebral levels : 1) L1-L5 and 2) L5-C1.

2.6 Segmentation of visceral and subcutaneous adipose tissue

Segmentation of visceral adipose tissue (SAT) and subcutaneous adipose tissue (VAT) was performed using active contours. Our method was based on level set without edges [19] and used the dense implementation of the Chan and Vese method [20] available in the Insight toolkit (ITK) in 2D to segment the fat compartments limited by the abdominal muscular wall and the skin. The segmentation protocol was initialized on the slice of interest and then extended to the adjacent slices as a $2^{1/2}$ method.

3. RESULTS

3.1 Analysis of whole body adipose tissue volumes

Figure 6 shows the repartition of adipose tissues in obese and control mice using the GMM method and the FT method.

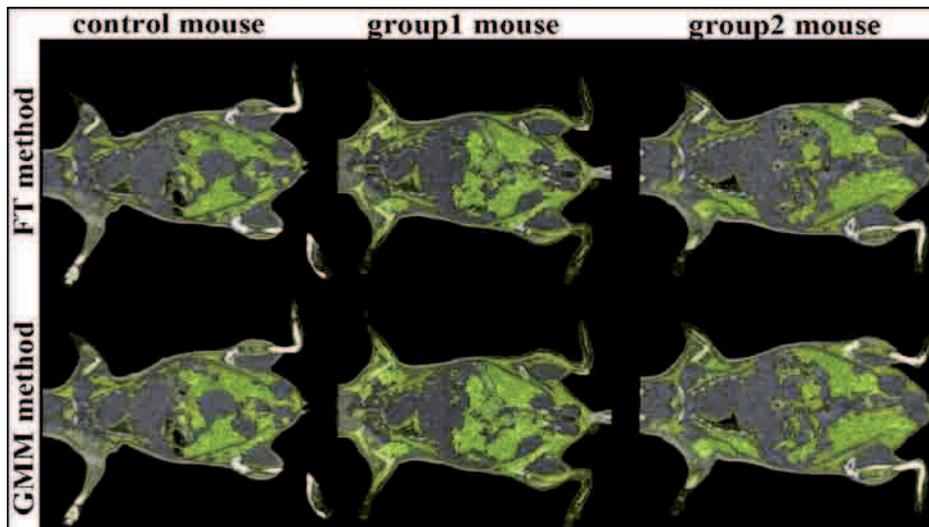


Figure 6 : Fat tissue visualization of a mouse of each group with the GMM method and with the FT method

The quantitative analysis confirms the imaging data showing higher adipose tissue in obese mice than in control mice (Table2).

Group	Mice weight in g	Total adipose tissue volume in mm3	
		FT	GMM
control	33.9 +/- 3.5	2212.4 +/- 583.6	2063.2 +/- 365.5
group1	40.1 +/- 3.8	2795.2 +/- 491.5	3000.0 +/- 377.5
group2	42.8 +/- 3.3	3564.0 +/- 530.2	3308.8 +/- 120.1
Total	38.5 +/- 5.1	2768.8 +/- 692.8	2725.9 +/- 629.6

Table 2: Mean volumes of adipose tissue (in mm3) computed for each group of mice, using FT and GMM

The comparative analysis shows minor differences between GMM and FT measurements. When adipose tissue volumes are correlated with the mouse weight, we obtain slightly better correlation with the GMM method than with the FT method (Table 3).

Group	Coefficient of correlation weight/adipose tissue volume	
	FT	GMM
control	0.791	0.968
group1	0.952	0.981
group2	0.997	0.998
Total	0.937	0.981

Table 3: Coefficient of correlation between the weight and the adipose volumes computed with FT and GMM

As the whole, these results demonstrate the validity of the GMM method as compared to the FT method.

3.2 Automatic detection of the region of interest

In our protocol, the automatic localization of the slice of interest was based on the relative amounts of adipose and lean tissues. Interestingly, this criteria corresponded to skeletal landmark : the lumbosacral junction of L6 and S1 vertebrae. The mean distance between this landmark and the detected slice was of $1.01 \pm 0.45 \text{ mm}$. Figure 7 illustrates the ROI compared to others regions.

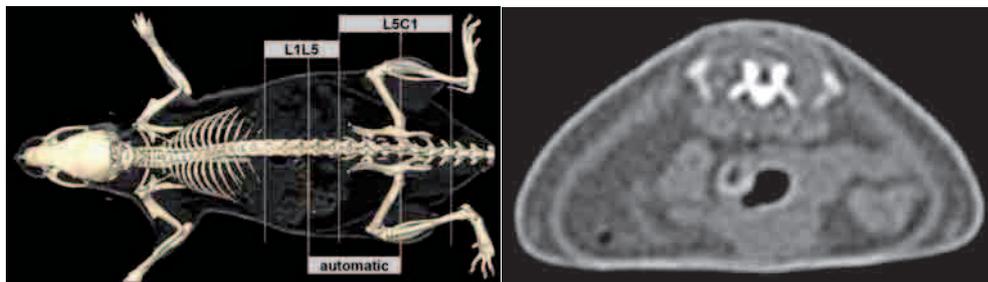


Figure 7 : Localization of the detected slice and comparison of the region with others area used in literature (left) ; detected slice of interest (right)

Group	Coefficient of correlation weight/fat volume		
	<i>Automatic thresholds</i>		
	L1-L5	L5-C1	ROI
control	-0.9997	0.7661	0.9416
group1	0.8671	0.9993	0.9996
group2	0.9898	0.8874	0.9991
Total	0.1058	0.9157	0.9679

Table 4: Coefficient of correlation between the weight and the adipose volume for the three regions of interest. The adipose tissue volumes used for the correlation were computed with the automatic thresholds.

The volumes of adipose tissue were computed on the three regions showing a higher amount of fat tissue in group1 and group2 as compared to control (respectively : 1107.1 mm^3 , 1396.3 mm^3 , 816.9 mm^3). Adipose tissue volumes in the ROI were better correlated with the body weight than the two others regions (Table 4).

This result reinforces the validity of the choice of the selected region.

3.3 Segmentation of visceral and subcutaneous compartments

Figure 8 illustrates the visceral and subcutaneous adipose tissue compartments.

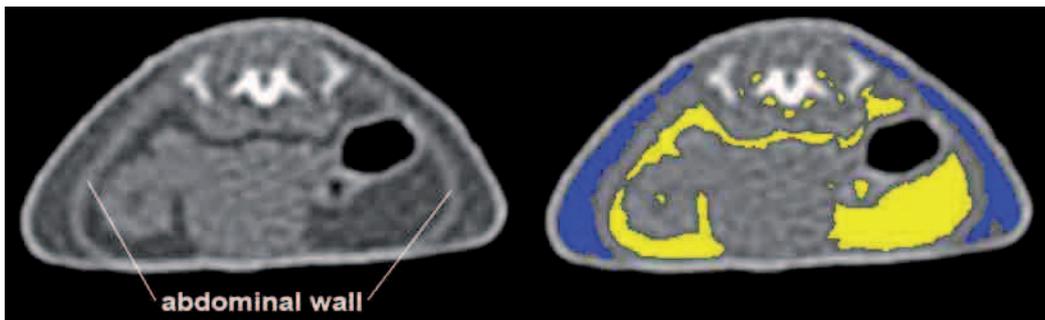


Fig 8 : Segmentation of fat compartments limited by the abdominal wall (visceral fat, yellow) and the skin (subcutaneous fat, blue) in the reference slice.

The segmentation protocol did not show any obvious correlation between weight and VAT, SAT and ratio VAT/SAT (Table 5).

Group	Coefficient of correlation weight/fat volume		
	VAT	SAT	Ratio VAT/SAT
control	0.410	0.580	0.061
group1	0.539	0.682	-0.857
group2	0.842	0.142	0.876
Total	0.694	-0.349	0.008

Table 5 : Correlation coefficients between weight and fat volumes in subcutaneous and visceral adipose tissue area and for the ration VAT/SAT

This result may be due to our animal model of obesity which exhibits relatively limited visceral fat accumulation as compared to genetically modified mice model of obesity.

4. CONCLUSIONS

This work presents novel methods fitted to in vivo investigations of mice model of obesity, allowing (i) automated detection of adipose tissue in abdominal regions of interest, (ii) automated detection of the region of interest, (iii) quantification of visceral and subcutaneous fat.

Our results show that medical CT imaging combined with automatic image analysis provide precise and reproducible quantification of adipose tissue in mice in vivo allowing repetitive examinations for longitudinal studies. This new approach in experimental animals is of particularly interest for the study of obesity, allowing valuable comparison between species using the same imaging materials and software analysis

REFERENCES

- [1] J.C. Seidell, P. Bjorntorp, L. Sjostrom, R. Sannerstedt, M. Krotkiewski, H. Kvist, "Regional distribution of muscle and fat mass in men – new insight into the risk of abdominal obesity using computed tomography", Int J Obes 13, 289-303 (1989)

- [2] A.E. Summe, N.M. Farmer, M.K. Tulloch-Reid, "Sex differences in visceral adipose tissue volume among African Americans", *Am J Clin Nutr* 76 (2002)
- [3] W. Shen, M. Punyanitya, Z. Wang, "Visceral adipose tissue : relations between single-slice areas and total volume", *Am J Nutr* 80 (2004)
- [4] D. L. Sussman, J. Yao, R. M. Summers, "Automated fat measurement and segmentation with intensity inhomogeneity correction," *Proc. SPIE Medical Imaging Vol. 7623* (2010)
- [5] V. Positano, T. Christiansen, F. Santarelli, S. Ringgaard, L. Landini, A. Gastaldelli, "Accurate segmentation of subcutaneous and intermuscular adipose tissue from MR images of the thigh", *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 29, 677–684 (2009)
- [6] K. J. Ellis, B. Grund, F. Visnegarwala, L. Thackeray, C. G. Miller, C. E. Chesson, W. El-Sadr, A. Carr, "Visceral and Subcutaneous Adiposity Measurements in Adults: Influence of Measurement Site", *Obesity* 15(6), 1441-1447 (2007)
- [7] S. A. Al-Attar, R. L. Pollex, J. F. Robinson, B. A. Miskie, R. Walcarius, B. K. Rutt, R. A. Hegele, "Semi-automated segmentation and quantification of adipose tissue in calf and thigh by MRI: a preliminary study in patients with monogenic metabolic syndrome," *BMC Med Imaging*, 6(11) (2006)
- [8] D. D. Brennan, P. F. Whelan, K. Robinson, O. Ghita, J. M. O'Brien, R. Sadleir, S. J. Eustace, "Rapid automated measurement of body fat distribution from whole-body MRI," *AJR* 185, 418-423 (2005).
- [9] Y. Jin, C. Z. Imielinska, A. F. Laine, J. Udupa, W. Shen, S. B. Heymsfield, "Segmentation and Evaluation of Adipose Tissue from Whole Body MRI Scans", *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention - MICCAI 2003, Lecture Notes in Computer Science, 2003, Volume 2878/2003, 635-642, DOI: 10.1007/978-3-540-39899-8_78*
- [10] P. S. Jørgensen, R. Larsen, K. Wraae, "Unsupervised Assessment of Subcutaneous and Visceral Fat by MRI", *Image Analysis, Lecture Notes in Computer Science, 2009, Volume 5575/2009, 179-188, DOI: 10.1007/978-3-642-02230-2_19*
- [11] S. Makrogiannis, S. Serai, K.W. Fishbein, W. Laney, C. Schreiber, W.B. Ershler, L. Ferrucci, R.G. Spencer, "Automated Quantification of Muscle and Fat in the Thigh from Water-, Fat- and Non-suppressed MR Images", *IEEE International Conference on BioInformatics and BioEngineering (BIBE)* (2010)
- [12] K. Furukawaa, T. Katabamia, Y. Nakajimab, T. Satoa, H. Katoa, R. Koganeia, S. Asaia, T. Matsuaia, Y. Sataa, T. Kawataa, A. Kondoa, A. Ohtaa, Y. Tanaka, "Evaluation of whole-abdominal fat volume by 700-slice CT scanning and comparison with the umbilical fat area anthropometric indices", *Obesity Research & Clinical Practice* 4, e111-e117 (2010)
- [13] S. Tu, S. Zhang, Y. Chen, M. T. Freedman, B. Wang, J. Xuan, Y. Wang, " Automatic tracing and segmentation of rat mammary fat pads in MRI image sequences based on cartoon-texture model", *Transactions of Tianjin University, Volume 15, Number 3, 229-235, DOI: 10.1007/s12209-009-0041-2*
- [14] D. H. Johnson, C. A. Flask, P. R. Ernsberger, W. C. K. Wong, D. L. Wilson, "Reproducible MRI measurement of adipose tissue volumes in genetic and dietary rodent obesity models," *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 28:915-927 (2008).
- [15] A.L. Hildebrandt, D. M. Kelly-Sullivan, S. C. Black, "Validation of a high-resolution X-Ray computed tomography system to measure murine adipose tissue depot mass in situ and longitudinally," *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 47, 99-106 (2002).
- [16] S. Judex, Y.K. Luu, E. Ozcivici, B. Adler, S. Lublinsky, C.T. Rubin, "Quantification of adiposity in small rodents using micro-CT," *Methods* 50, 14-19 (2010).
- [17] Y.K. Luu, S. Lublinsky, E. Ozcivici, E. Capilla, J.E. Pessin, C.T. Rubin, S. Judex, "In vivo quantification of subcutaneous and visceral adiposity by micro-computed tomography in a small animal model," *Medical Engineering and Physics* 31, 34-41 (2009).
- [18] A. Dempster, N. Laird, D. Rubin. "Likelihood from incomplete data via the EM algorithm". *J Royal Statistical Society* 739, 1–38 (1977)
- [19] T. Chan and L. Vese. An active contour model without edges. In *Scale-Space Theories in Computer Vision*, pages 141–151 (1999).
- [20] K. Mosaliganti, B. Smith, A. Gelas, A. Gouaillard, S. Megason, Level Set Segmentation: Active Contours without edge. *The Insight Journal* - 2009. <http://hdl.handle.net/1926/1532>

7.6 Discussion

7.6.1 Imagerie avec le scanner médical CT

Avec le CT la résolution est plus faible que pour le micro-CT et ne permet pas l'analyse fine de pièce isolées. Par contre à l'échelle du corps entier, elle est un outil de "screening" très intéressant. comme le montre la Figure 7.1, à partir d'une acquisition réalisée en 1sec, il est possible d'obtenir des informations sur la morphologie globale de la souris, sur les voies aériennes, sur la graisse ou la répartition des densités du squelette.

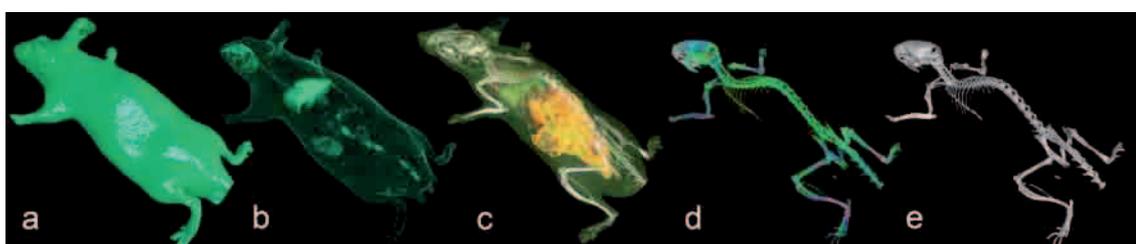


FIGURE 7.1 – Vues 3D en "volume rendering" obtenues à partir des données d'une seule souris scannée en 1 sec dans un scanner médical (CT)

L'utilisation du CT permet de plus de bénéficier des dernières avancées technologiques en matière de tomographie X. Par exemple, l'acquisition en double énergie, utilisée en micro-CT à titre expérimental ??, est déjà implémentée dans certains scanners (Siemens Flash CT). Parmi les applications du double énergie, on note la possibilité de l'analyse quantitative des densités (par absorption relative comme en DXA) ou l'amélioration de la qualité des images en supprimant le "Beam Hardening". D'autre part, les méthodes de reconstruction itératives, également disponible en CT, permettent une reconstruction moins bruitée avec une nombre de vue plus restreint limitant encore plus l'exposition aux rayons X et réduisant le temps d'acquisition.

La réduction du temps d'acquisition par rapport à un micro-CT dédié au petit animal, peut laisser penser que la dose délivrée est plus faible. Ce point nécessite d'être étudié plus en détail car si le temps est plus court, le courant utilisé est plus élevé que dans un micro-CT.

Dans l'optique d'évaluer l'utilisation du CT pour les études précliniques *in vivo*, nous avons voulu caractériser la dose associée à cette technique, cette étude sera abordée au Chapitre 10.

7.6.2 Classification des voxels du tissu adipeux

La méthode que nous avons utilisé n'est pas non-supervisée comme c'est le cas avec les K-Means ou FCM. Les paramètres des gaussiennes du modèle sont initialisés avec une information a priori sur les valeurs en unité Hounsfield des niveaux de gris des tissus adipeux et musculaires. Pour notre application, cela ne pose pas de

problème car les données sont toujours calibrées et donc varie peu autour de valeurs de références.

Le modèle, initialisé pour chaque coupe 2D avec les mêmes paramètres, converge relativement vite avec l'algorithme "Expectation Maximisation". Après 10 itérations, le modèle évolue très peu et les résultats de quantification des volumes de graisse sont identiques. C'est pourquoi nous avons fixé à 15 le nombre d'itérations maximal.

Avec une application différente, pour la classification des tissus du cerveau, la modélisation avec des mixtures gaussiennes associée avec l'algorithme "Expectation Maximisation" peut être initialisée automatiquement à partir de K-Means [Srinivasan et al., 2011]. Cette méthode pourrait être envisagée pour notre application.

La Figure 7.2 montre une représentation en 3D de l'ensemble des modélisations calculées sur les coupes 2D le long du corps de la souris.

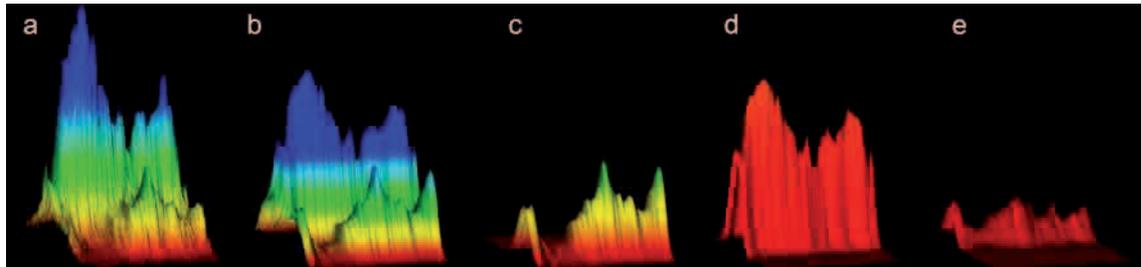


FIGURE 7.2 – Représentation 3D des histogrammes 2D de chaque coupe le long du corps de la souris (a), de sa modélisation avec les mixtures de Gaussiennes (b) et des trois Gaussiennes du modèle (c pour la graisse, d pour le muscle et e)

7.6.3 Validation des outils basée sur les corrélations avec le poids de l'animal

N'ayant pas de valeurs de références pour les volumes de graisse, nous avons utilisé comme critères de validation la corrélation avec le poids de l'animal. Dans des études précédentes en micro-CT [Hildebrandt et al., 2002] [Judex et al., 2010], deux techniques ont été utilisées pour obtenir des références de comparaison : le dosage des lipides par décomposition chimique Soxhlet et la dissection des amas de graisse. La méthode Soxhlet, utilisé habituellement dans le domaine agro-alimentaire et qui permet le dosage des lipides d'un extrait de l'échantillon broyé, peut être discuté quant à son utilisation comme méthode de référence chez la souris. D'autre part, la dissection est reconnue comme une technique dont la reproductibilité dépend fortement de l'opérateur. Ces éléments conforte notre choix pour la validation par corrélation avec le poids de l'animal.

Lors d'une postérieure (voir Chapitre 9), nous utilisons une double validation avec l'imagerie par densitométrie chez la souris avec un PIXMUS.

7.7 Conclusion

Notre approche pour l'analyse des tissus adipeux de la souris a été de combiner l'utilisation d'un scanner médical normalement dédié à l'humain avec des outils d'analyse des images 3D développés spécifiquement pour la caractérisation de la graisse.

Le CT a permis d'imager *in vivo* la souris avec une résolution suffisante pour l'analyse des tissus adipeux. De plus, la vitesse d'acquisition en CT laisse envisager cette méthode comme outil de "screening" à haut débit pour des études longitudinales.

La chaîne de traitement proposée pour l'analyse des images permet la classification de voxels correspondant à la graisse, la détection automatique de la région d'intérêt 3D au sein de l'abdomen et la séparation entre la graisse viscérale et sous-cutanée.

Les méthodes d'analyse développées sont spécifiques aux tissus adipeux mais pas à la souris. Elles pourraient être appliqués à l'humain. Dans ce contexte, notre approche présente un intérêt particulier pour l'étude de l'obésité, en permettant un passage simplifié de l'animal à l'humain en utilisant les mêmes matériels d'imagerie et les mêmes outils d'analyse.

Chapitre VIII

Analyse phénotypique des souris invalidées pour le gène du récepteur 2B de la sérotonine

Collaborations :

- Catherine Vidal, Institut Pasteur et INSERM U 747, Paris
- Sylvain Ordureau, UsefulProgress, Paris
- Yassine Harrichane, INSERM U747, Paris
- Sasha Dimitri-Nakov, INSERM U747, Paris
- Corinne Collet, AP-HP, Hôpital Lariboisière
- Jean-Marie Launay, AP-HP, Hôpital Lariboisière
- Anne Baudry, INSERM U747, Paris
- Agnès Kamoun-Goldrat, Hôpital Necker et INSERM U747, Paris
- Odile Kellermann, INSERM U747, Paris
- Michel Goldberg, INSERM U747, Paris
- Roger Lédée, Laboratoire PRISME, Orléans
- Christophe Léger, Laboratoire PRISME, Orléans

Sommaire

8.1	Introduction	144
8.2	Etude A : analyse du phénotype des souris R2B-KO à l'échelle du corps entier	145
8.2.1	Protocole expérimental	145
8.2.2	Etude des tissus minéralisés	145
8.2.3	Etude des tissus adipeux	145
8.2.4	Etude des voies respiratoires	148
8.2.5	Conclusion	150
8.3	Etude B : analyse du phénotype du tissu dentaire chez les souris R2B-KO	150
8.3.1	Article : "Enamel alterations in serotonin 2B receptor knockout mice"	151
8.3.2	Conclusion	174

8.1 Introduction

La sérotonine (5-hydroxytryptamine : 5-HT) joue un double rôle de neuromédiateur du système nerveux central et d'hormone dans l'ensemble du corps . Elle est impliquée la régulation de fonctions telles que la thermorégulation, les comportements alimentaires et sexuels, le cycle veille-sommeil, la douleur ou encore l'anxiété. De plus la sérotonine joue un rôle dans le développement embryonnaire.

On a pu observer que le traitement de souris par des antagonistes pharmacologiques du récepteurs 2B de la sérotonine induit des malformations cardiaques, craniofaciales et un retard de croissance [Lauder and Zimmerman, 1988]. L'obtention récente de souris invalidées pour le gène du récepteur 2B de la sérotonine (R2B-KO) a confirmé le rôle de de ce récepteur dans l'embryogenèse et la morphogénèse des tissus osseux [Gaspar et al., 2003]. Chez la souris adulte une étude *ex vivo* sur des fémurs de souris R2B-KO a montré un déficit osseux de la micro-architecture [Collet et al., 2008].

Nous avons entrepris de compléter cette étude en utilisant la tomographie X, d'une part à l'échelle de la souris entière *in vivo* et d'autre part en ciblant spécifiquement les tissus dentaires de la mandibules *ex vivo*.

8.2 Etude A : analyse du phénotype des souris R2B-KO à l'échelle du corps entier

8.2.1 Protocole expérimental

Deux groupes de souris femelles R2B-KO âgées de 2 mois et 1 an ont été comparées à des souris contrôles (WT) de même fond génétique (Tableau 8.1).

	WT	R2B-KO
2 mois	8	9
1 an	10	10

TABLE 8.1 – Description des groupes de souris

Les souris ont été imagées *in vivo* à l'aide d'un scanner médical (CT) Toshiba Aquilon 64 avec les paramètres d'acquisition suivant : $135kV$ et $400mAs$ pour la source X, acquisition des projections pour le corps entier en $2sec$, résolution des images reconstruites avec un voxel non-isotrope de $160 \times 160 \times 100 \mu m$.

8.2.2 Etude des tissus minéralisés

Nous avons défini des fonctions de transfert spécifiques à l'analyse de la répartition de la minéralisation sur le corps entier de la souris. D'après le code couleurs

indiqué sur la Figure 8.1, les os longs des membres inférieurs et supérieurs et le bassin sont plus pourpres (donc plus denses) chez les souris WT que chez les R2B-KO.

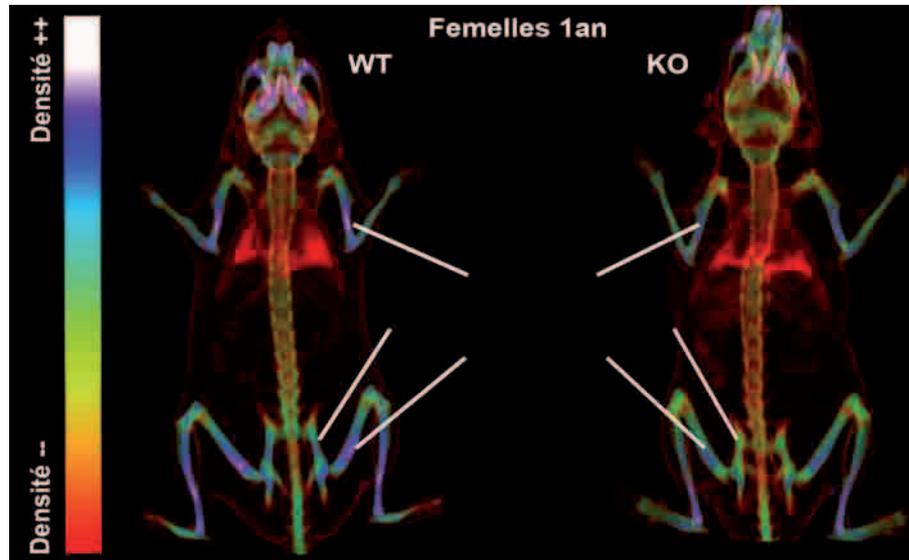


FIGURE 8.1 – Différences de minéralisation entre les souris femelles contrôles et R2B-KO âgées de 1an

Les figures 8.2 et 8.3 illustrent les visualisations de dessus des souris âgées de 2 mois et de 1 an. L'analyse comparative de ces vues 3D a révélé que les souris R2B-KO âgées de 2 mois et de 1 an sont ostéopéniques avec un déficit en minéralisation moins marqué pour les souris de 2 mois.

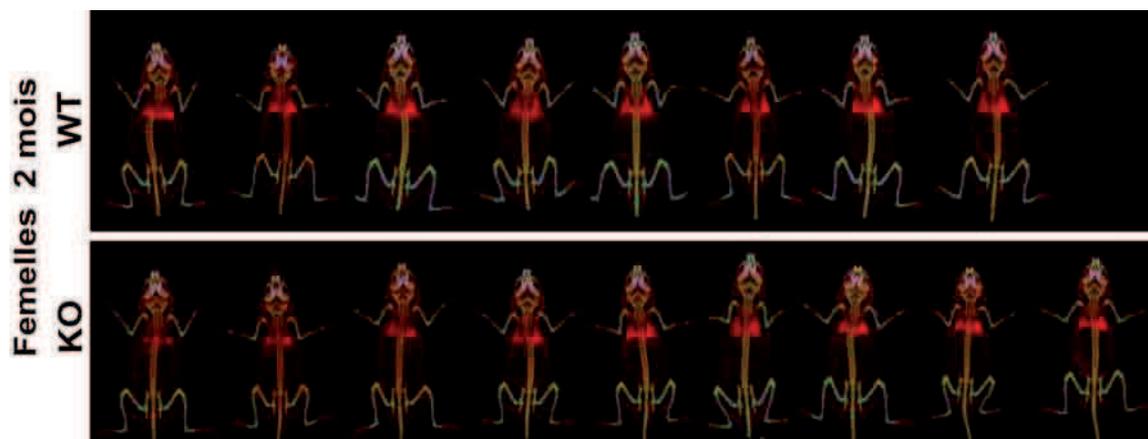


FIGURE 8.2 – Visualisation 3D en "volume rendering" de l'ensemble des souris âgées de 2 mois

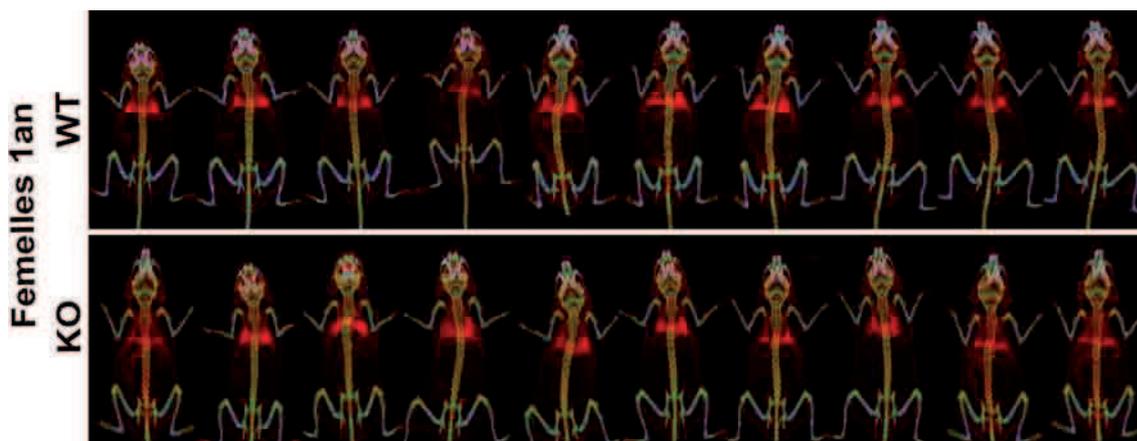


FIGURE 8.3 – Visualisation 3D en "volume rendering" de l'ensemble des souris âgées de 1 an

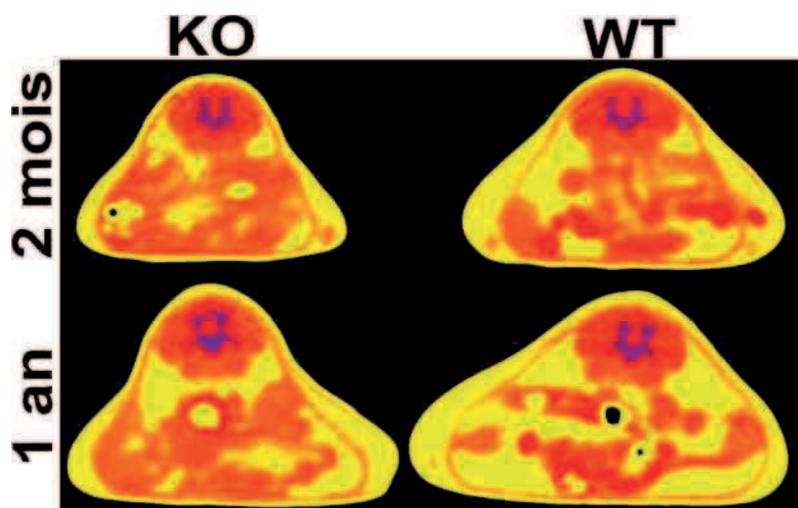


FIGURE 8.4 – Exemples de coupes extraites à l'intersection des vertèbres L5 et S1 pour les 4 groupes de souris. Les tissus adipeux sont représentés en jaunes et la masse maigre en rouge

8.2.3 Etude des tissus adipeux

Cette étude a été réalisée avant le développement des outils d'analyse des tissus adipeux décrites au chapitre 7. Nous avons analysé la répartition de la graisse en 2D sur un ensemble de 5 coupes contiguës au niveau de l'espace intervertébral L6/S1 (Figure 8.4). Pour chaque coupe nous avons identifié les volumes de graisse viscérale (V), sous cutanée (SC) et totale.

A 2 mois, les souris R2B-KO présentent un rapport entre graisse viscérale et graisse sous-cutanée significativement inférieur aux contrôles (Figure 8.5). Ces souris semblent avoir un volume de graisse totale plus faible que les WT mais non significatif.

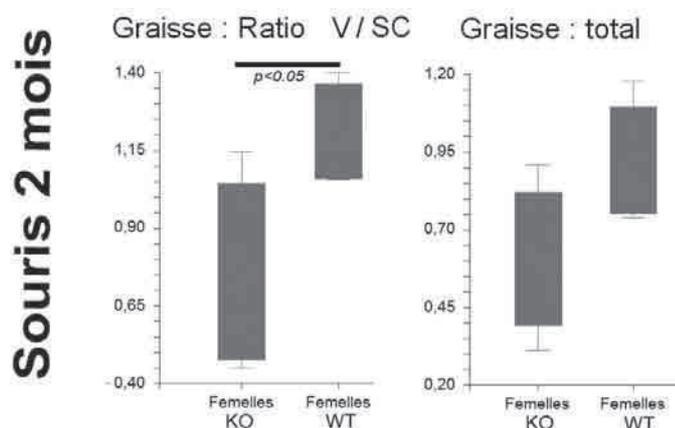


FIGURE 8.5 – Résultats des mesures du rapport entre graisse viscérale et graisse sous-cutanée et du volume total pour les souris R2B-KO et WT âgées de 2 mois

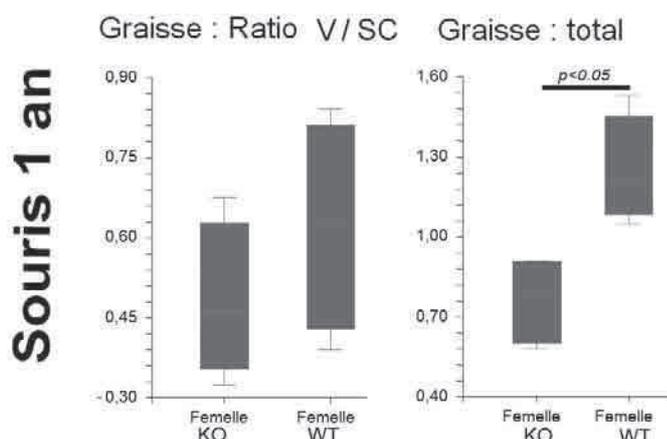


FIGURE 8.6 – Résultats des mesures du rapport entre graisse viscérale et graisse sous-cutanée et du volume total pour les souris KO et WT âgées de 1 an

Chez les souris d'un an, le rapport entre graisse viscérale et sous-cutanée n'est plus significativement différent entre les R2B-KO et les WT. Par contre les R2B-KO ont moins de graisse totale que les WT.

	WT 2 mois	R2B-KO 2 mois	WT 1 an	R2B-KO 1 an
sous-cutanée	0.480	0.253	0.460	0.240
viscérale	0.408	0.349	0.788	0.525

TABLE 8.2 – Valeurs moyennes des mesures de graisse sous-cutanée et viscérale pour chaque groupe de souris

Les données du Tableau 8.2 complètent les résultats précédents. Les souris R2B-KO présentent un volume de graisse sous-cutanée plus faible dès 2 mois alors que les volumes de graisse viscérale sont proches des WT. Avec la croissance, les R2B-KO se différencient par une augmentation plus faible de la quantité de graisse

viscérale.

8.2.4 Etude des voies respiratoires

Les poumons sont des tissus qui présentent peu de contraste en tomographie X, il est donc difficile de les distinguer des autres tissus mous environnants. Afin de pouvoir les étudier il faut considérer la transition entre l'air (contenu dans les poumons) et le poumon lui-même. Cette enveloppe intérieure du poumon est facilement détectable puisque le contraste entre les tissus mous du poumon et l'air est important.

Chez les souris de 2 moi, la visualisation 3D suggère un volume pulmonaire plus réduit chez les souris R2B-KO (Figure 8.7).

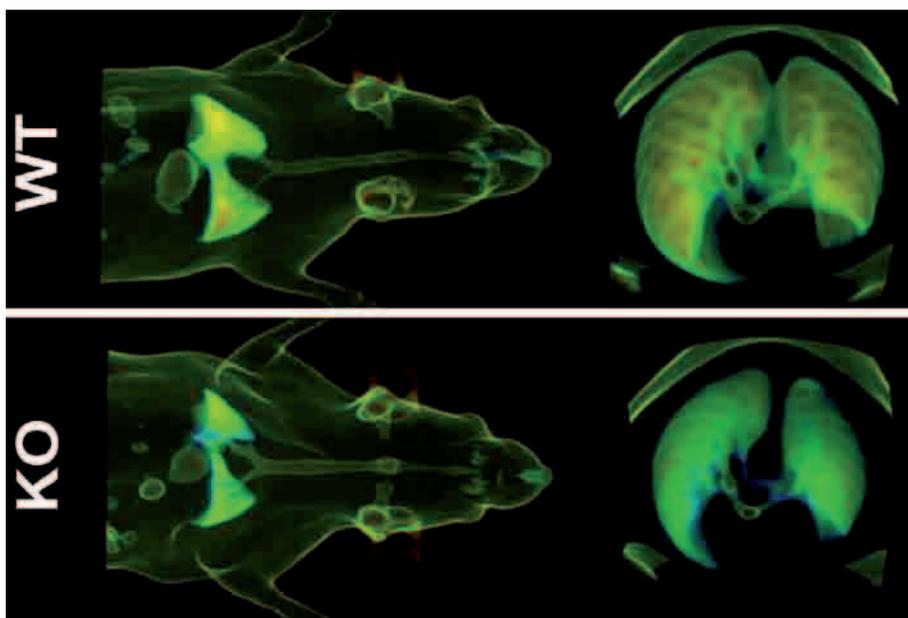


FIGURE 8.7 – Visualisation 3D en "volume rendering" des poumons des souris contrôles (WT) et R2B-KO (KO)

L'analyse quantitative du volume pulmonaire a été réalisée en se basant sur les voxels d'intensité correspondant aux tissus mous du poumon (dans la gamme d'unité Hounsfield [-800 HU, -400 HU]) isolés dans une ROI décrite autour des poumons (Figure 8.8).

La Figure 8.8 montre une différence significative des volumes pulmonaires uniquement liée à l'âge entre 2 mois et 1 an. Aucune différence statistique n'est observée chez les WT et KO.

Cette mesure du volume des poumons n'a pas validé l'appréciation qualitative puisqu'aucune différence statistique n'a été trouvée entre WT et KO (Figure 8.8). Les volumes pulmonaires étaient par contre significativement différents en fonction

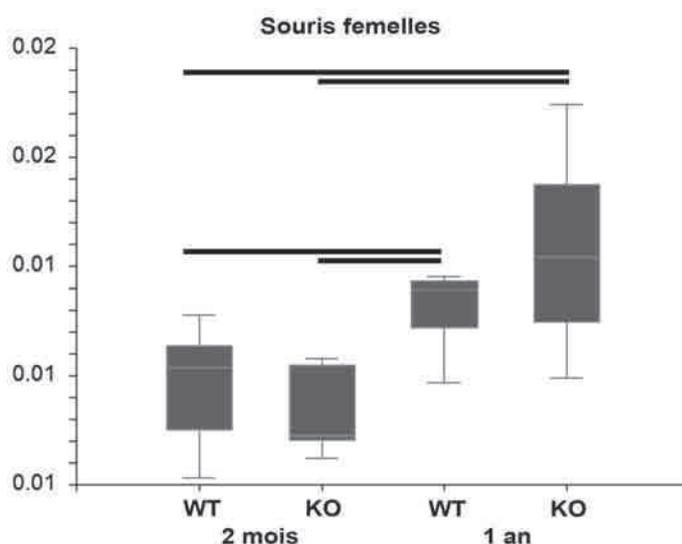


FIGURE 8.8 – Volume pulmonaire (en mm^3) des souris femelles de 2 mois. Les barres indique un seuil de significativité de $p < 0.05$

de l'âge.

L'interprétation de ces résultats est limitée car les images ont été réalisées sans synchronisation de l'imagerie avec les cycles respiratoires et cardiaques qui sont source de mouvement et de flous dans les images.

8.2.5 Conclusion

L'analyse phénotypique en CT des souris R2B-KO confirme sur les souris entière les observations sur des os isolés montrant une ostéopénie chez ces souris. Le phénomène est d'avantage marqué à l'âge de 1 an. De plus notre étude en imagerie a révélé chez ces souris une répartition différentielle des tissus adipeux. Comme pour les tissus minéralisés on retrouve un rôle de l'âge dans l'évolution du phénotype adipeux avec chez les souris de 2 mois un volume de graisse sous cutanée plus faible chez les R2B-KO alors que l'âge d'un an c'est la graisse viscérale qui est moins développée chez ces souris. Les données obtenues sur l'appareil respiratoire restent préliminaires pour conclure sur un effet de la validation du récepteur 5-HT_{2B}.

L'ensemble de nos observations souligne l'intérêt de l'imagerie CT à l'échelle du corps entier pour révéler des anomalies phénotypiques qui n'était pas a priori attendues chez les souris KO. Des travaux ont précédemment montré un rôle d'un autre récepteur de la sérotonine dans l'obésité (le 5HT_{2C}) [Nisoli and Carruba, 2000] [Bays and Dujovne, 2002] [Halford, 2006] [Salem and Bloom, 2010]. Notre étude montre pour la première fois l'implication du récepteur 5 – HT_{2B}R dans le métabolisme du tissu adipeux.

8.3 Etude B : analyse du phénotype du tissu dentaire chez les souris R2B-KO

Collaborations :

–

Nous avons poursuivi l'analyse des tissus minéralisés chez les souris R2B-KO par une analyse ex vivo des molaires de la mandibule de ces souris.

Pour chaque animal, l'hémi-mandibule droite a été analysée par micro-CT (émail des molaires) et la gauche par histologie en microscopie électronique à balayage (émail des molaires et de l'incisive). L'acquisition 3D a été effectuée avec le micro-CT VISCOM 8060 avec les paramètres d'acquisition suivants : $80kV$ et $160\mu A$ pour la source X, 514 projections de $200ms$ sur 360° . Les images reconstruites présentaient une résolution avec un voxel isotrope de $5\mu m$. Pendant l'acquisition, la mandibule était positionnée verticalement et le système était focalisé sur la région des molaires (Figure 8.9).

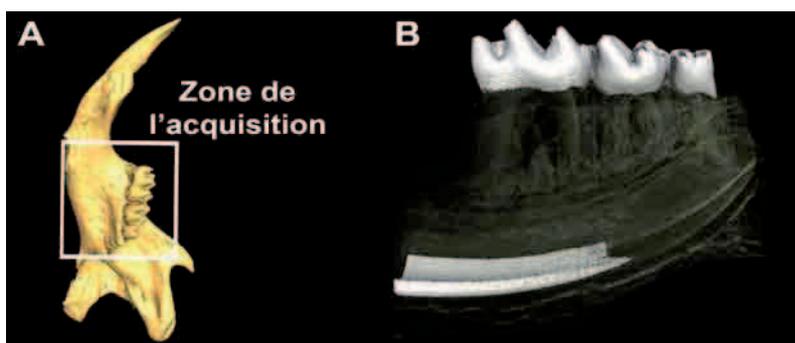


FIGURE 8.9 – Illustration de la zone des molaires (B) imagée par micro-CT au sein de la mandibule (A)

L'analyse des données a été effectuée avec un protocole similaire à celui décrit précédemment (Chapitre 4) avec une attention particulière sur l'analyse de l'émail des molaires :

- analyse qualitative en "volume rendering" pour l'appréciation de la morphologie de l'émail
- mesure du volume de l'émail des molaires

Pour la visualisation anatomique de l'émail nous avons défini des fonctions de transfert pour le "volume rendering" pour isoler l'émail des autres tissus constituant l'environnement de la dents (dentine, endodonte, os alvéolaire ...) (Figure 8.10).

La méthode de segmentation utilisée précédemment pour l'extraction du volume pulpaire des molaires (Chapitre 4) a été adaptée pour l'extraction du volume de l'émail des molaires.

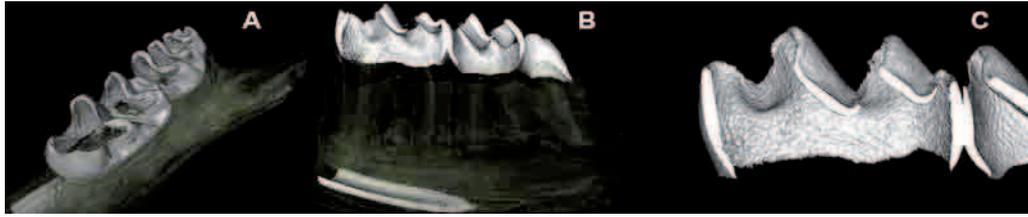


FIGURE 8.10 – Illustrations des vues obtenues en volume rendering" à partir des données micro-CT

8.3.1 Article : "Enamel alterations in serotonin 2B receptor knockout mice"

Dans cet article (accepté dans European Journal of Oral Sciences), nous montrons que :

- l'imagerie micro-CT permet une analyse quantitative du volume de l'émail des molaires
- la complémentarité entre les techniques d'analyse standard par histologie et l'imagerie micro-CT
- l'inactivation du récepteur $5HT_{2B}$ a une incidence sur la formation de l'émail

European Journal of Oral Sciences



Enamel alterations in serotonin 2B receptor knockout mice

Journal:	<i>European Journal of Oral Sciences</i>
Manuscript ID:	EOS-5256-CA-11
Manuscript Type:	Conference Article
Date Submitted by the Author:	08-sept-2011
Complete List of Authors:	Harichane, Yassine; Université Paris Descartes, UMR5747 Dimitrova-Nakov, Sasha; Université Paris Descartes, UMR5747 Marchadier, Arnaud; Université Paris Descartes, UMR5747 Collet, Corinne; AP-HP, Hopital Lariboisière Baudry, Anne; Université Paris Descartes, UMR5747 Vidal, Catherine; Institut Pasteur KAMOUN-GOLDRAT, Agnès; Hop Necker; Université Paris Descartes, UMR5747 Kellermann, Odile; Université Paris Descartes, UMR5747 Goldberg, Michel; Université Paris Descartes, UMR5747
Research Area:	Cell and molecular biology, Animal experiment, Craniofacial biology
Keywords (Please write 3 to 5 keywords according to Index Medicus):	Serotonin 2B receptor, knock-out mice, enamel rods, Hunter-Schreger bands, mineralization

SCHOLARONE™
Manuscripts

European Journal of Oral Sciences

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Enamel alterations in serotonin 2B receptor knockout mice

Yassine Harichane^{1,2}, Sasha Dimitrova-Nakov^{1,2}, Arnaud Marchadier^{1,2,3}, Corinne Collet⁴, Anne Baudry^{1,2}, Catherine Vidal⁵, Agnès Kamoun-Goldrat^{1,2}, Odile Kellermann^{1,2}, Michel Goldberg^{1,2}.

¹INSERM, UMR-S 747, F-75006, Paris, FRANCE

²Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR-S 747, F-75006, Paris, FRANCE

³UsefulProgress, Université Paris Descartes, Paris, FRANCE

⁴AP-HP, Hôpital Lariboisière, Service de Biochimie, Paris, FRANCE

⁵Institut Pasteur, Paris, FRANCE

Running title:

Enamel alterations in 5-HT_{2B}R KO mice

Corresponding author:

Michel Goldberg

UMR-S 747 INSERM & Université Paris Descartes

Biomédicale des Saints Pères

45 rue des Saints Pères

F-75006 Paris, France

Telephone: 33 (0)1 42 86 38 51

Fax: 33 (0)1 42 86 40 68

e-mail addresses: michel.goldberg@parisdescartes.fr or mgoldberg.goldberg004@gmail.com

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Yassine Harichane, Sasha Dimitrova-Nakov, Arnaud Marchadier, Corinne Collet, Anne Baudry, Catherine Vidal, Agnès Kamoun-Goldrat, Odile Kellermann, Michel Goldberg.

Enamel alterations in serotonin 2B receptor knockout mice

ABSTRACT

The role of the serotonin 2B receptor (5-HT_{2B}R) in enamel formation and mineralization was explored in adult 5HT_{2B}R knockout (KO) mice compared to wild type (WT). In the molar, quantitative data obtained by micro-computed tomography imaging show that the overall volume of the enamel layer was firmly reduced in KO mice. Defective mineralization was ascertained by energy dispersive X-ray microanalysis. We also observed, using the scanning electron microscope, that parazonies in the KO mice included 2-3 helicoidally twisted rods within Hunter-Schreger bands, instead of a single rod in the WT. Minor disturbances were also detected in the incisors of KO mice. Structural modifications, thinner enamel crystallites and porosities observed in KO mice indicate that the 5-HT_{2B}R-mediated signaling pathways take parts to enamel formation. These data provide a basis for evaluating the role of 5-HT_{2B}R on ameloblast functions. Defects observed in the mineralization and structure of enamel in KO mice highlight that the 5-HT_{2B}R interferes with the mechanisms directing amelogenesis.

KEY WORDS

Serotonin 2B receptor, knockout mice, enamel rods, Hunter-Schreger bands, mineralization.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

INTRODUCTION

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT), as a neurotransmitter in the central nervous system, modulates a wide variety of behavioral and physiological processes such as appetite, sleep, anxiety, cognition, and memory. In the periphery, 5-HT is exclusively synthesized by enterochromaffin cells of the gut and stored by platelets. Platelet-stored 5-HT broadly participates to the homeostasis of various tissues and plays a role in cardiovascular functions, smooth muscle response, gastrointestinal contraction and endocrine regulations (see for review (1)). 5-HT also exerts a trophic function during animal development. Both 5-HT and the 5-HT transporter (SERT) have been detected in early stage of mouse embryos (2, 3) and are involved in the migration of cells derived from the neural crest, in neurogenesis as well as in craniofacial and cardiovascular morphogenesis (4-6). Of note, embryos exposed to 5-HT_{2B} receptor (5-HT_{2B}R) antagonists or antidepressants which block 5-HT uptake by the SERT, exhibit morphological defects in mesodermal and neural crest derivatives including the craniofacial skeleton (4-8). Moreover, in adults, patients receiving serotonin reuptake inhibitors (SRIs) antidepressant appear to be at risk for osteoporosis (9-11).

The biological actions of 5-HT are mediated by numerous 5-HT receptors (5-HTR). At present, fifteen 5-HTR subtypes, divided into seven classes (5-HT₁₋₇R) have been characterized, based on their amino acid sequence, pharmacological profile, and transduction mechanisms (12). Such a diversity of 5-HTR makes difficult the elucidation of their precise role in 5-HT-mediated functions (13). An alternative way of investigation is the genetic inactivation of genes encoding these receptors.

As concerned mineralized tissues, the functional impact of 5-HT signaling in the skeleton is still debated since both enhancing and inhibitory effects on bone formation have been depicted in response to 5-HT (14). In previous studies, we have identified the 5-HT_{2B}R as an important player of bone metabolism (15-17). We used an inducible mesoblastic cell line, C1, able to fully differentiate into osteocytes within 12 days, assessing the involvement of 5-HT_{2B}R during osteogenic differentiation. The 5-HT_{2B}R-mediated coupling to the nitric oxide (NO) synthase and the phospholipase A2 (PLA2) pathways are necessary for optimal bone matrix mineralization (15). Blockade of this receptor causes a 40% reduction in calcium incorporation within the matrix. Further, we have identified the tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) as a target whose activity is entirely controlled by the 5-HT_{2B}R (17). In

1
2
3 agreement, primary calvarial osteoblasts obtained from 5-HT_{2B}R knockout (KO) mice
4 suffering from osteopenia (6), exhibit defects in TNAP activity (16, 17).
5
6

7
8 The role of 5-HT in enamel and dentin formation is poorly documented, although the
9 presence of (i) 5-HT receptors, namely 5-HT_{1A}, 2A, 2B, 2CR, (ii) tryptophan hydroxylase 1
10 (TPH1), the key enzyme which synthesizes 5-HT and (iii) SERT have been detected in the
11 enamel organ of both molar and incisors (18).
12
13

14
15 Since 5-HT contributes, during development, to differentiation of neuroectodermal, neural
16 crest and mesodermal derivatives and in view of the role of 5-HT_{2B}R in bone matrix
17 mineralization, we hypothesize that this receptor may be crucial for proper enamel
18 development and tooth homeostasis. We took advantage of 5-HT_{2B}R KO mice to investigate
19 whether 5-HT_{2B}R depletion could be at the origin of defects in enamel formation. We
20 compared the ultrastructure and mineralization of enamel in the wild type (WT) and the 5-
21 HT_{2B}R KO mice both in the continuously growing incisor and in the molar, a tooth of limited
22 growth. The well-organized matrix framework for mineral deposition was altered in 5-HT_{2B}R
23 KO mice as well as the mineral density of enamel. These data provide the first evidence that
24 5-HT_{2B}R-dependent signaling pathways act on enamel formation adjoining ameloblasts and
25 introduce this receptor as a novel actor in tooth development.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 MATERIALS AND METHODS

37
38 This study was performed using adult 5-HT_{2B}R KO mice in which exon 2 of the 5-HT_{2B}R
39 locus has been substituted for the selective bacterial neo cassette (6). The 5-HT_{2B}R KO mice
40 have a 129sv/PAS background as wild-type (WT) (Charles River Laboratories, L'arbresle,
41 France). The mice were allowed free access to food and water in full compliance with French
42 government and European Community animal welfare policy.
43
44
45
46
47

48 One third of the embryonic 5-HT_{2B}R KO mice die midgestation, and another third die at birth
49 from cardiac failure. The mice that survive have a cardiac phenotype, but a normal life span
50 (6, 16). In order to establish the potential indirect incidence of plasmatic calcemia and VEGF
51 on enamel formation, blood was collected by eye puncture. The mean values were determined
52 for each group of 10 mice at least.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Thirteen WT (8 males and 5 females) and twelve 5-HT_{2B}R KO mice (7 males and 5 females) were killed at 8 and 10 weeks by cervical dislocation, and the mandibles were dissected out.

One hemi-mandible was fixed with formaldehyde, embedded in methylcetone peroxide-polymerized Stratyl and cut with a diamond disk. To avoid variations in section angle, transverse sections were systematically performed in the middle of the first molar at right angles to the long axis of the mandible. The mandibles slices had a thickness of 2 mm and were glued on aluminum stub. After etching three fold 10 sec with 1% nitric acid, they were rinsed with water and sputter coated with platinum for Scanning Electron Microscopy (SEM) examination (Zeiss Supra 40). The ratio of calcium and phosphorus, from the enamel of mandible sections sputter-coated with carbon, was determined using Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis (Hitachi SU70 SEM and INCA microanalysis system).

The other mouse hemi-mandible was scanned by micro-Computed Tomography (micro-CT) for non-destructive studies (Viscom X8060). The X-ray source was operated at 80 kV and 160 mA, with a 5 µm spatial resolution. Volume rendering, a technique for 3D visualization of samples, was suitable to render images from mouse mandibles acquired by micro-CT and to identify the bone and different dental structures: pulp, dentin and enamel (19). Volumetric measurements were carried out following the selection of a 3D volume of interest drawn around the first molar. Software was used to visualize and quantify the volume of the first molar enamel. A threshold image filter allowed the isolation of the enamel according its mineral density. All samples were analyzed following the same threshold to obtain comparable volume measurements and visualization. By making the dentin, the pulp and the bone translucent, the enamel cap was observed from various directions. The volume of the enamel was calculated by subtracting the less mineralized tissues in the 3D volume of interest.

RESULTS

Our aim was to investigate whether the inactivation of 5-HT_{2B}R leads to disturbed enamel formation. We performed invasive and non-invasive techniques to analyze the composition, structure and volume of enamel.

Table 1 indicates the values found for plasmatic calcemia and VEGF in WT and 5-HT_{2B}R KO mice. The differences are not significant and demonstrate that the effects observed on amelogenesis are neither due to hypocalcemia nor to variations of VEGF.

1
2
3 X-ray spectrophotometric analysis allowed comparison of phosphorus and calcium levels in
4 enamel of WT and 5-HT_{2B}R KO mice (Table 2). The phosphorus level was similar in both
5 groups. The calcium level was lower for the 5-HT_{2B}R KO group ($20.43 \pm 2.63\%$) than for the
6 control ($21.62 \pm 4.26\%$). Consequently the Ca/P ratio was decreased in the 5-HT_{2B}R KO
7 group suggesting that the enamel was less calcified.
8
9

10
11
12
13 Histological analysis of incisor and molar enamel structure were compared in 5-HT_{2B}R KO
14 vs. WT mice. Depending on slight angle variations in the orientation of the small sized
15 samples, the enamel surface of the crown of the molar was more or less exposed but included
16 the buccal and lingual cusps, and presented an enamel-free occlusal surface. In the lower part
17 of the mandible, the alveolar and basal bones surrounded transverse sections of the incisor,
18 where enamel was always limited to a half moon structure.
19
20
21
22

23 24 25 **Incisor enamel**

26 In the WT incisors, acid etched-transverse sections of enamel (total width about 120-130 μm),
27 revealed a thin inner aprismatic enamel of about 4-5 μm located at the dentino-enamel
28 junction (DEJ), followed by parallel rods at right angles to the DEJ (Fig.1A). In the inner
29 prismatic enamel, rows of prisms (or rods) were grouped within single layered rows
30 (lamellae) with a decussation pattern, inclined alternatively in opposite directions. The
31 lamellae were approximately parallel to the DEJ. In the outer enamel, the rods were parallel
32 and at right angles with the enamel outer surface. The superficial border of the enamel, named
33 outer aprismatic enamel of about 10 μm thick, displayed weaker acid-etched pattern, probably
34 because enamel maturation was not completed, as shown also by small unfilled interrod
35 spaces (Fig 1A).
36
37

38 In the 5-HT_{2B}R KO mice (Fig. 1B), the inner aprismatic layer of the incisor enamel appeared
39 with a reduce thickness as compared to the WT. The lamellae located in the inner prismatic
40 enamel formed a 20-25° angle with the DEJ. It was obvious that the well-defined parallel
41 pattern of enamel was disorganized. In particular, rods and interrods were more angulated,
42 protruding mineral structures were formed while numerous porosities could be visualized at
43 the junction between rods and interrods. The poorly etched outer layer was thicker in the
44 5-HT_{2B}R KO compared with the WT mice, suggesting the 5-HT_{2B}R depletion affects not only
45 the angulation of mineral deposition but also later stages of enamel maturation.
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Molar enamel

Since enamel organization differs according to its localization, enamel structure was compared between WT and 5-HT_{2B}R KO mice on molar sections performed in the cusps, and in the buccal and lingual areas.

Tip of the cusp

In the outer buccal part of WT mice (Fig. 2A), near the tip of the cusp, rods and interrods displayed a feather-like structure in the inner half with some inclination to the DEJ. In the outer half, the rods became parallel to each other and at right angles to the surface. Outer aprismatic layer was almost undetectable.

In the 5-HT_{2B}R KO mice (Fig. 2B), the thickness of the outer prismatic enamel appeared significantly increased and the feather-like pattern was missing. Rods at right angles to the DEJ were first parallel and protruded, and then they curved in the inner half and finally expanded as long, thin and straight parallel lines. In addition, a 10 µm thick aprismatic outer layer was present. Thus, as observed for the incisor, the 5-HT_{2B}R depletion impacts on enamel spatial organization of the molar. This implies that the 5-HT_{2B}R contributes to the formation of the intricate matrix/mineral network elaborated by the ameloblasts.

Buccal enamel

In the WT mice, the aprismatic zone near the DEJ was 4-5 µm thick (Fig. 2C). Alternative Hunter-Schreger (HS) bands formed the inner prismatic enamel. Parazonies included one single rod, and diazones encompassed a series of superposed rods. In the prismatic outer layer (Fig. 2C), rods perpendicular to the enamel surface were crossing oblique lamellae before reaching the surface, where they formed ultimately a thin aprismatic outer layer.

In the 5-HT_{2B}R KO mice, the aprismatic enamel layer near the DEJ was enlarged reaching about 10 µm (Fig. 2D). The inner prismatic enamel included helicoidally twisted structures, formed by 2-3 rods, which constitute thicker parazonies, whereas diazones included piles of superposed rods. In the outer third, the rods fan out and were bent toward the tip of the cusp direction forming a 15-20° angle with the surface. Ultimately prisms merged and contributed to the formation of an aprismatic outer enamel (Fig. 2D).

At larger magnification (Fig. 3 A-D), important changes in mineral density were visualized between WT and 5-HT_{2B}R KO mice. In WT male mice, buccal enamel crystallites were densely packed in the molar (Fig. 3A). In contrast, crystallites were significantly thinner in 5-HT_{2B}R KO male mice and enamel exhibited many porosities (Fig. 3B). Moreover, 5-HT_{2B}R KO female mice (fig. 3D) displayed more pronounced defects than in the WT female mice

1
2
3 (fig. 3C). The crystallites had a fibrillar appearance and were disassociated. The thickness of
4 enamel crystallites of 5-HT_{2B}R KO male and female mice (82.80 ± 15.25 nm) was
5 significantly decreased compared to WT male and female mice (118.25 ± 13.50 nm) ($p <$
6 0.002). In mutant mice, large spaces increased the porous aspect of enamel at this
7 magnification indicating that the 5-HT_{2B}R may play a pivotal role in the mineralizing
8 processes sustaining enamel formation.
9

10 11 12 13 14 15 **Lingual enamel**

16 The differences in enamel structure were less obvious in the lingual part of WT and 5-HT_{2B}R
17 KO mice (Supplementary Fig. 1). Both mice displayed HS bands with similar appearance
18 (Supplementary Fig. 1 A, B). The aprismatic outer enamel was denser in the WT compared
19 with the 5-HT_{2B}R KO mice (Supplementary Fig. 1 C, D).
20
21
22

23 24 25 **Shape and volume of enamel**

26 We used micro-CT to analyze the shape, volume and distribution of enamel in the molars of
27 WT and 5-HT_{2B}R KO mice. The spatial resolution and the volume rendering isolated the
28 enamel cap from the underlying structures and provided qualitative information on the enamel
29 shape and thickness. As shown in Table 3, volume analysis revealed that the 5-HT_{2B}R KO
30 first molars display a statistically significant decreased enamel volume (about 30%) compared
31 to WT ($p < 0.005$). The 3D reconstruction of the molar enamel was illustrated by volume
32 rendering (Fig. 4 B-E). The side view of the crown showed the cusps and fissures in WT mice
33 (Fig. 4B). In the 5-HT_{2B}R KO mice, the enamel appeared rough and irregular, but hypoplasia
34 was never seen (Fig. 4C). The volume rendering method allowing virtual and transverse
35 sections of the enamel cap, also revealed a reduced enamel thickness in the 5-HT_{2B}R KO
36 mice. Moreover, in the occlusal view, an increased abrasion and a large dentin exposure were
37 observed in the 5-HT_{2B}R KO mice (Fig 4E) compared to WT mice (Fig. 4D).
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 **DISCUSSION**

49
50
51 Identification of factors affecting enamel formation may have implications in the field of
52 tooth development, homeostasis and for the design of preventive and restorative dentistry.
53 Serotonin reuptake inhibitors (SRI) are widely used as antidepressants and for the treatment
54 of anxiety disorders. These therapies may have clinical consequences on mineralized tissue
55 formation, namely on dentin and bone. The effects of such drugs on enamel formation may
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

also be effective, especially during amelogenesis. They may be similar to what is seen during congenital cardiac disease (CCD), although enamel hypoplasias were observed in 52% of the CCD children (20). As the 5-HT_{2B}R regulates cardiac embryonic development, discrete enamel hypomineralization may be associated with cardiomyopathy as it is the case for the mutant mice (6, 7, 13). We still ignore if it is a direct influence of the receptor (21), or an indirect action due to changes in blood pressure and vascularization. However, it has been shown that using the mouse model, blood pressure and lung remodeling associated with vascular proliferation are not detectable in normal and hypoxic mice (22). As no difference was found in the levels of calcium and VEGF, a growth factor implicated in angiogenesis, a direct effect of 5-HT_{2B}R is privileged. However, we cannot rule out that blood pressure, changes in vascularization and cardiac abnormalities have no influence on the enamel defects reported here. Identifying the actors that control enamel rods orientation is important in restorative dentistry, because enamel with disordered microstructures is prone to fracture.

The present work provides for the first time evidence for involvement of the 5-HT_{2B}R in ameloblast functions and enamel mineralization. The mineral density shown by EDX, the enamel volume evidenced by micro-CT, the crystallite thickness and the 3D organization of enamel rods observed with the SEM in the incisor and molar of 5-HT_{2B}R KO mice clearly differ from that of WT. In addition, as it was shown for bone (16), enamel defects are more pronounced in female compared to male mice. The 5-HT_{2B}R depletion does not impair enamel formation but disturbs the intricate matrix/mineral network leading to defects in the mineral repartition and the orientation of the enamel rods. Thus, the 5-HT_{2B}R contributes to optimal structuration and mineralization of enamel.

Of note, upon 5-HT_{2B}R depletion, defects could be observed in all layers from the dentino-enamel junction up to outer aprismatic enamel, depending on the observed area. This implies that 5-HT_{2B}R influences the backward movement of secretory ameloblasts during amelogenesis and affects rod torsions and twisting that are likely post-secretory events linked to mechanical forces.

Oblique direction of groups of rods and a double helix organization of prisms in mammalian teeth lead to the formation of Hunter-Schreger (HS) bands (23). In the incisor of rodents, it has been proposed that each HS band includes one rod alone, involving one single rod displaying respectively antiparallel orientation and consequently appearing either as diazones or parazones (24). This organization is more complex in the molar and depends on the observed areas (25, 26). In the buccal enamel of WT mice, HS bands are located only in the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

inner enamel, whereas near the tip of cusps and in groves, rods display parallel orientation at right angles to the surface. In the 5-HT_{2B}R KO mice, two major differences were detectable in the cervical part of the buccal enamel: i) instead of one rod per HS band in the buccal enamel, two or more twisted rods were visible in each parazone, and ii) in the outer part of buccal cervical enamel, the rods were bent toward the outer surface, oriented in the tip of cusps direction. The fact that such differences are not detectable in the lingual enamel suggests that these modifications are not dependent on cell movements but under the control of pressure distribution, although further investigations are needed to clarify the reasons of such differences.

Besides, mechanotransduction mechanisms are known to be involved in organogenesis and to mobilize diverse signaling pathways such as nitric oxide (NO) and phospholipids leading to changes in cytoskeletal, metabolism, cell adhesion and gene expression. Still very little is known about the signals and the mechanoreceptors that trigger cellular responses in numerous tissues. In the case of enamel, the hypomineralized porous enamel rods squeezed by occlusal pressures may receive a flux of forces expelling the residual matrix during rod formation and enamel maturation. The occlusal forces may produce unequal helicoidally pressures on a tooth, and consequently promote twisting of the prisms, and their association into thicker HS bands. Unequal distribution of forces may merely affect the buccal part of enamel cap, but not the lingual enamel. Such hypothesis cannot be excluded since the 5-HT_{2B}R impact on skeletal development and on bone turnover through diffusion of NO or eicosanoids (15). These data provide a basis to investigate a putative role of this receptor in mechanotransduction mechanisms, which might drive enamel structuration.

In summary, this work exploiting the 5-HT_{2B}R KO mice brings first evidence on a functional relationship between 5-HT_{2B}R and enamel formation. These findings further substantiate the recent notion that 5-HT system contributes to mineral tissue differentiation and skeletal development.

ACKNOWLEDGEMENTS

Y. Harichane is supported by an IFRO grant, and S. Dimitrova-Nakov by STEM-Pôle Ile-de-France. We are grateful to our colleague and friend Dr J.-Y. Sire (UMR 7138, Université Pierre et Marie Curie) for his advices and support during the preparation of the samples. We

1
2
3 thank F. Herbst (Université Paris Diderot) and David Montero (Université Pierre et Marie
4 Curie) for their technical assistance in the SEM-EDX analysis.
5
6
7
8

9
10 **REFERENCES**

- 11 (1) JONNAKUTY C, GRAGNOLI C. What do we know about serotonin? *J Cell Physiol.*
12 2008; **217**, 301-306.
13
14 (2) LAUDER JM, WILKIE MB, WU C, SINGH S. Expression of 5-HT(2A), 5-HT(2B) and
15 5-HT(2C) receptors in the mouse embryo. *Int J DevNeurosci.* 2000; **18**: 653-662.
16
17 (3) GASPAR P, CASES O, MAROTEAUX L. The developmental role of serotonin: news
18 from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci.* 2003; **4**: 1002-1012.
19
20 (4) MOISEWITSCH JRD, LAUDER JM. Serotonin regulates mouse cranial neural crest
21 migration. *Proc Natl Acad Sci.* 1995; **92**: 7182-7186.
22
23 (5) MOISEWITSCH JRD. The role of serotonin and neurotransmitters during craniofacial
24 development. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; **11** : 230-239.
25
26 (6) NEBIGIL CG, CHOI DS, DIERICH A, HICKEL P, LE MEUR M, MESSADDEQ N,
27 LAUNAY JM, MAROTEAUX L. Serotonin 2B receptor is required for heart development.
28 *Proc Natl Acad Sci.* 2000 ; **97** : 9508 –9513.
29
30 (7) CHOI D-S, WARD SJ, MESSADDEQ N, LAUNAY JM, MAROTEEAU L. 5-HT2B
31 Receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and
32 myocardial cells. *Development.* 1997; **124**: 1745-1755.
33
34 (8) BYRD KE, SHESKIN TA. Effects of post-natal serotonin levels on craniofacial complex.
35 *J Dent Res.* 2001; **80**: 1730–1735.
36
37 (9) WESTBROEK I, VAN DER PLAS A, DE ROOIJ KE, KLEIN-NULENDS J, NIJWEIDE
38 PJ. Expression of serotonin receptors in bone. *J BiolChem.* 2001; **276**: 28961-28968.
39
40 (10) GUSTAFSSON BI, THOMMESEN L, STUNES AK, TOMMERAS K, WESTBROEK
41 I, WALDUM HL, SLØRDAHL K, TAMBURSTUEN MV, RESELAND JE, SYVERSEN U.
42 Serotonin and Fluoxetine Modulate Bone Cell Function In Vitro. *J Cell Biochem.* 2006 ;
43 **98**:139–151.
44
45 (11) DUCY P, KARSENTY G. The two faces of serotonin in bone biology. *J Cell Biol.* 2010;
46 **191**: 7- 13.
47
48 (12) HOYER D, HANNON JP, MARTIN GR. Molecular, pharmacological and functional
49 diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002; **71**:533–554.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

(13) NEBIGIL CG, ETIENNE N, SCHAERLINGER B, HICKEL P, LAUNAY JM, MAROTEAUX L. Developmentally regulated serotonin 5-HT2B receptors. *Int J Dev Neurosci.* 2001; **19**:365-372.

(14) WARDEN SJ, ROBLING AG, HANEY EM, TURNER CH, BLIZIOTES MM. The emerging role of serotonin (5-hydroxytryptamine) in the skeleton and its mediation of skeletal effects of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRPS5). *Bone.* 2010; **46**: 4-12.

(15) LOCKER M, BITARD J, COLLET C, POLIARD A, MUTEL V, LAUNAY JM, KELLERMANN O. Stepwise control of osteogenic differentiation by 5-HT(2B) receptor signaling: nitricoxide production and phospholipase A2 activation. *Cell Signal.* 2006; **18**: 628-639.

(16) COLLET C, SCHILTZ C, GEOFFROY V, MAROTEAUX L, LAUNAY JM, DE VERNEJOL MC. The serotonin 5-HT2B receptor controls bone mass via osteoblast recruitment and proliferation. *FASEB J.* 2008; **22**: 418-427.

(17) BAUDRY A, BITARD J, MOUILLET-RICHARD S, LOCKER M, POLIARD A, LAUNAY JM, KELLERMANN O. Serotonergic 5-HT(2B) receptor controls tissue-non specific alkaline phosphatase activity in osteoblasts via eicosanoids and phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Biol Chem.* 2010; **285**: 26066-26073.

(18) RIKSEN EA, STUNES AK, KALVIK A, GUSTAFSSON BI, SNEAD ML, SYVERSEN U, LYGSTADAAS SP, RESELAND JE. Serotonin and fluoxetine receptors are expressed in enamel organs and LS8 cells and modulate gene expression in LS8 cells. *Eur J Oral Sci.* 2010; **118**: 566-573.

(19) GOLDBERG M, MARCHADIER A, VIDAL C, HARRICHANE Y, KAMOUN-GOLDRAT A, KELLERMANN O, KILTS T, YOUNG M. Differential effects of fibromodulin deficiency on mouse mandibular bones and teeth - a micro CT time course study. *Cells Tissue, Organ.* 2011; **194**: 205-210.

(20) HALLETT KB, RADFORD DJ, SEOW WK. Oral health of children with congenital cardiac diseases: a controlled study. *Pediatr Dent.* 1992; **14**: 224- 230.

(21) CALLEBERT J, ESTEVE JM, HERVÉ P, PEOC'H K, TOURNOIS C, DROUET L, LAUNAY JM, MAROTEAUX L. Evidence for a control of plasma serotonin levels by 5-hydroxytryptamine 2B receptors in mice. *J Pharmacol Exp Therapeut.* 2006; **317**: 724- 731.

(22) LAUNAY J-M, HERVÉ P, PEOC'H K, TOURNOIS C, CALLEBERT J, NEBIGIL CG, ETIENNE N, DROUET L, HUMBERT M, SIMONNEAU G, MAROTEAUX L. Function of serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nature Medicine* 2002; **8**: 1129- 1135.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

(23) HIROTA F. Prism arrangement in human cusp enamel deduced by X-ray diffraction. *Arch Oral Biol.* 1982 ; **27**:931-937.

(24) KAWAI N. Comparative anatomy of the band of Schreger. *Okajimas Fol Anat Jap.* 1955; **27**: 115-131.

(25) RISNES S. The prism pattern of rat molar enamel: a scanning electron microscope study. *Am J Anat.* 1979; **155**: 245-258.

(26) LYGSTADAAS SP, MØINICHEN CB, RISNE S. Crown Morphology, Enamel Distribution, and Enamel Structure in Mouse Molars. *Anat Rec.* 1998 ; **250**:268–280.

Manuscript Copy

Table 1. Analysis of plasmatic calcemia and VEGF in WT and 5-HT_{2B}R KO groups.

	WT	5-HT _{2B} R KO
Plasmatic calcemia (in mM)	1.43 ± 0.16	1.45 ± 0.11
Plasmatic VEGF (in ng/L)	15.7 ± 2.4	18.0 ± 1.9

Blood samples analysis for plasmatic calcemia and VEGF are expressed as mM and ng/L respectively (mean ± SD).

Table 2. Energy dispersive X-ray microanalysis (EDX) of enamel in WT and 5-HT_{2B}R KO groups.

EDX microanalysis	WT (atomic %)	5HT _{2B} R KO (atomic %)
Calcium	21.62 ± 4.26	20.43 ± 2.63*
Phosphorus	16.52 ± 1.92	16.16 ± 1.62*
Ca/P ratio	1.33 ± 0.09	1.26 ± 0.09*

EDX analysis for calcium (Ca) and phosphorus (P) showed the atomic percentage of K line elements (mean ± SD). The Ca/P ratio from WT and 5-HT_{2B}R KO samples is presented as the mean and standard deviation. *P < 0.05 vs. WT.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

LEGENDS OF THE FIGURES

Figure 1. 5-HT_{2B}R depletion alters mouse incisor enamel structure formation.

Transverse sections of incisors were analyzed by SEM. In WT incisor (1A), decussating prisms formed rows (lamellae) parallel to the dentino-enamel junction (DEJ). Incisor enamel in 5-HT_{2B}R KO mice (1B) showed a thicker outer aprismatic zone than that in WT mice, and lamellae displayed a 20-25° angle with the DEJ.

Figure 2. 5-HT_{2B}R KO mice display structural alterations in the buccal cusp of the molar enamel.

In WT mice (2A), rods and interrods seen in the inner and outer prismatic enamel are structural elements of the buccal tip of the cusp. The outer aprismatic border is thin. In the 5-HT_{2B}R KO mice (2B), the thickness of the outer prismatic enamel appeared significantly increased.

In WT mice (2C), the inner prismatic enamel of the buccal enamel is formed by parazonal and diazonal bands of the Hunter-Schreger (H-S) bands, which included one single rod. In the outer prismatic enamel layer, rods were at right angles (arrow) with the enamel surface. Conversely in 5-HT_{2B}R KO (2D), the H-S bands of the inner prismatic enamel included helicoidally twisted structures, formed by 2-3 rods. In the outer prismatic enamel layer, rods were bent toward the tip of the cusp.

Figure 3. 5-HT_{2B}R KO mice display enamel porosities more pronounced in female.

At higher magnification, WT male mice enamel (3A) exhibited dense structures and large crystallites while 5-HT_{2B}R KO male mice enamel (3B) presented numerous porosities and thin crystallites. Compared to WT female enamel (3C), the 5-HT_{2B}R KO female enamel (3D) displayed increased porosities and thin fibril-like crystallites form a network at the hypomineralized enamel surface.

Figure 4. Volume measurement and virtual reconstruction of mandibular first molar enamel in WT and 5-HT_{2B}R KO mice.

Micro-CT analysis indicated that the enamel volume of the first mandibular molars was decreased in the 5-HT_{2B}R KO mice compared to WT (4A). Three-dimensional images and virtual sections of 5-HT_{2B}R KO mice (4C) showed that the enamel surface appeared rough and thinner compared to the WT (4B). The enamel cap in WT molars displayed a normal

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

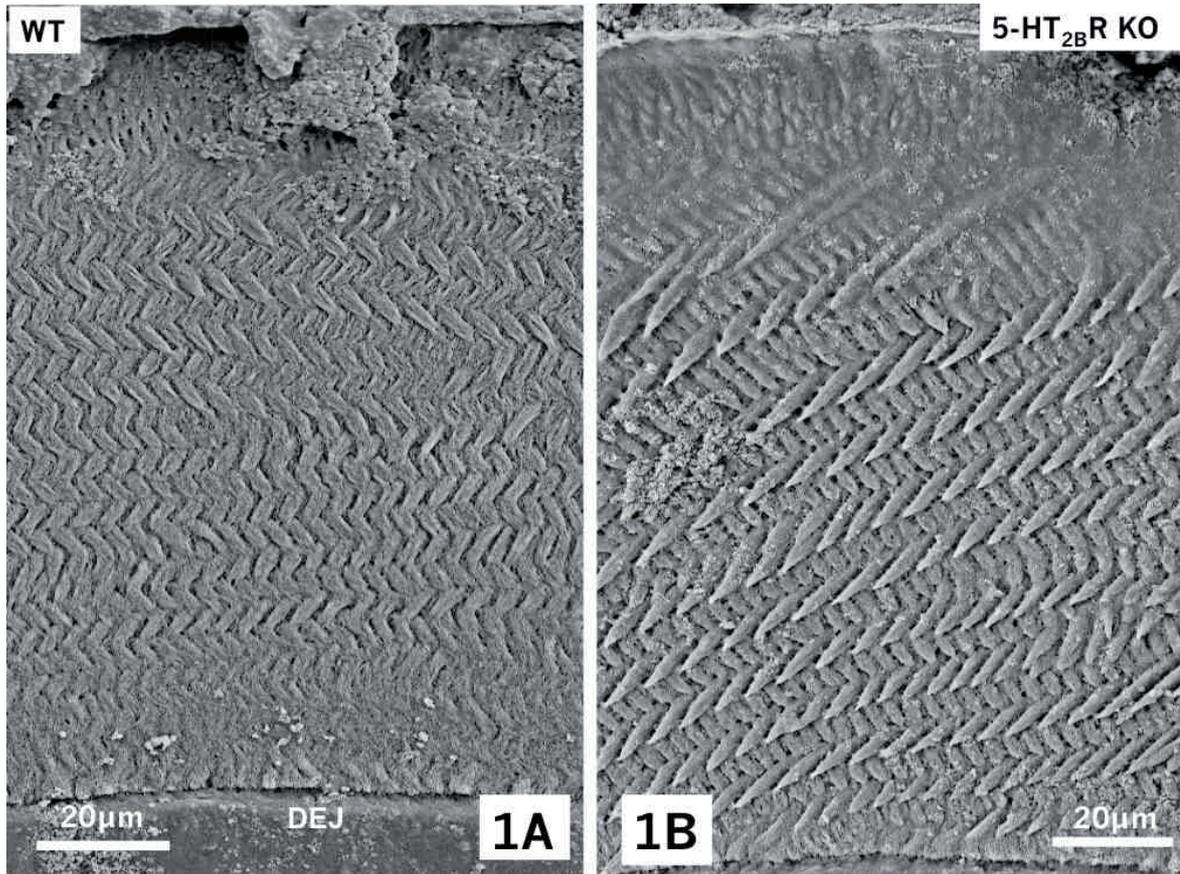
shape (4D), while the 5-HT_{2B}R KO molars presented an increased dentin exposure due to enamel abrasion (4E).

Supplementary Figure 1. Lingual molar enamel

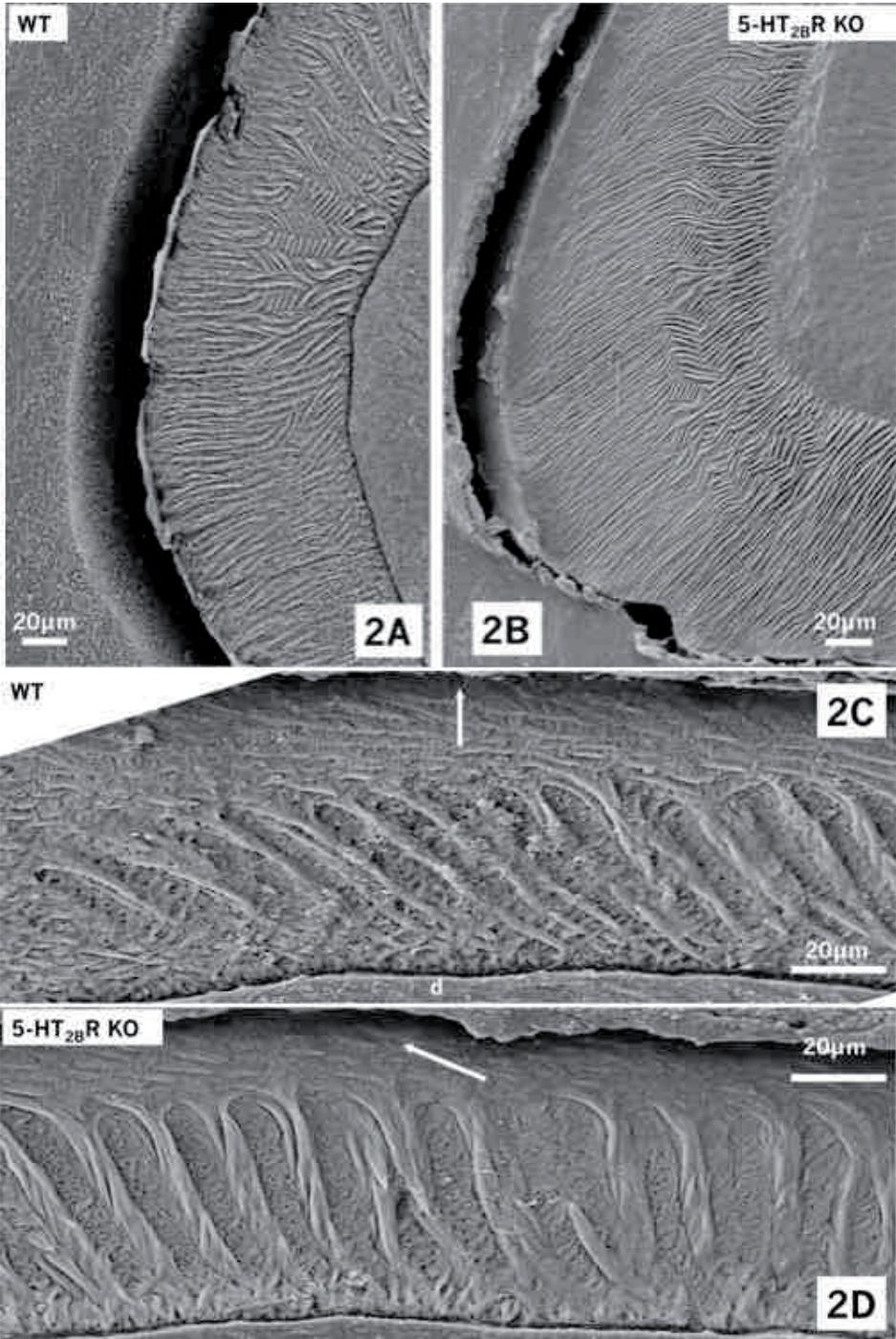
Lingual molar enamel organization is less affected in the 5-HT_{2B}R KO mice (5B, D) than in WT (5A, C).

Manuscript Copy

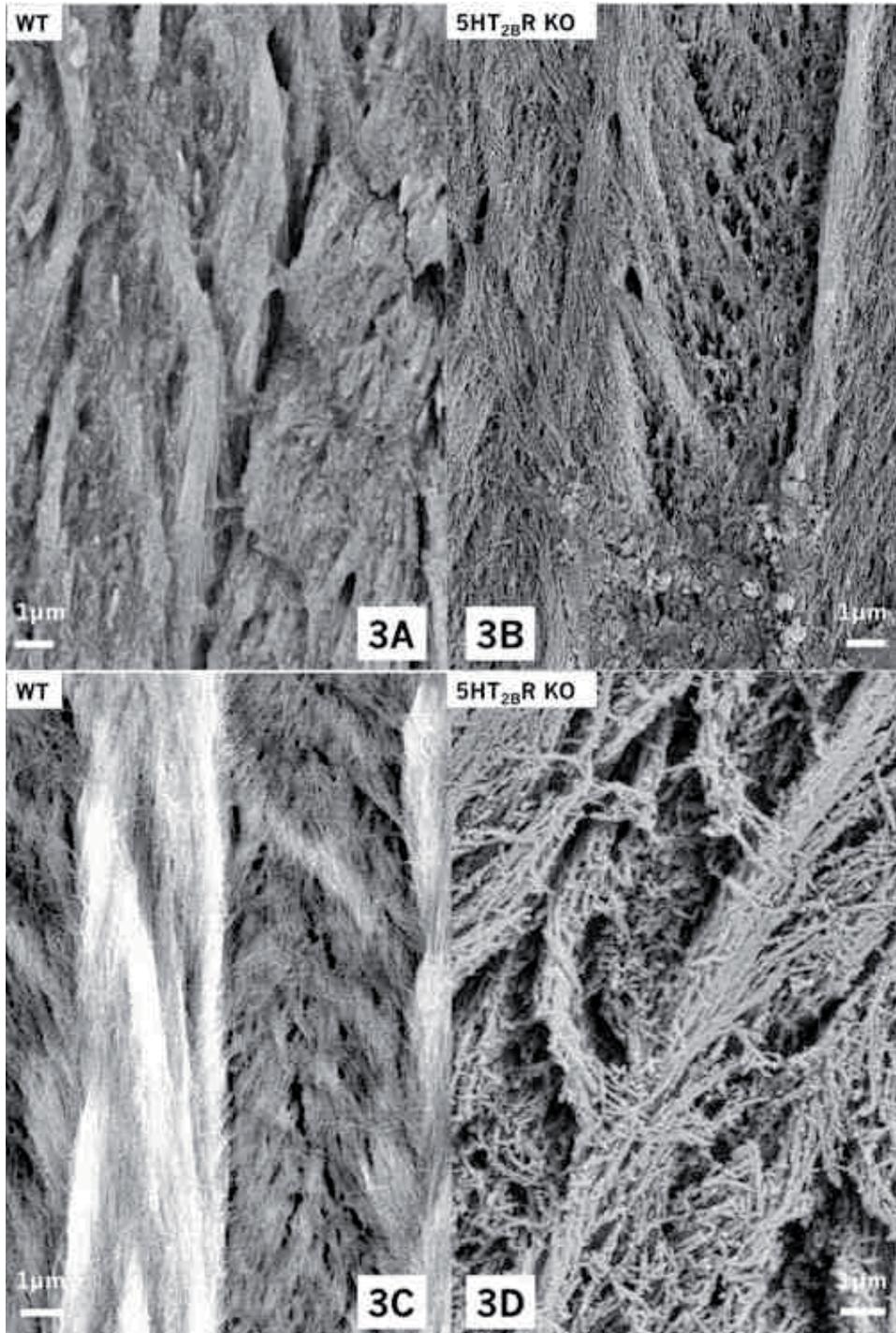
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



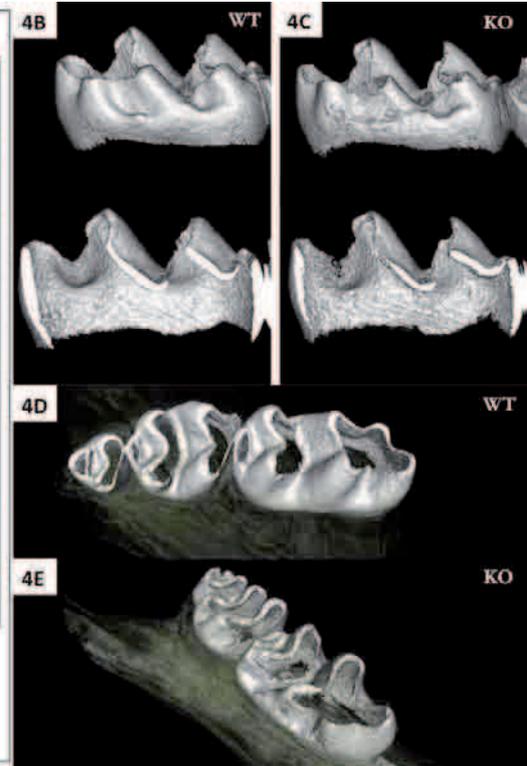
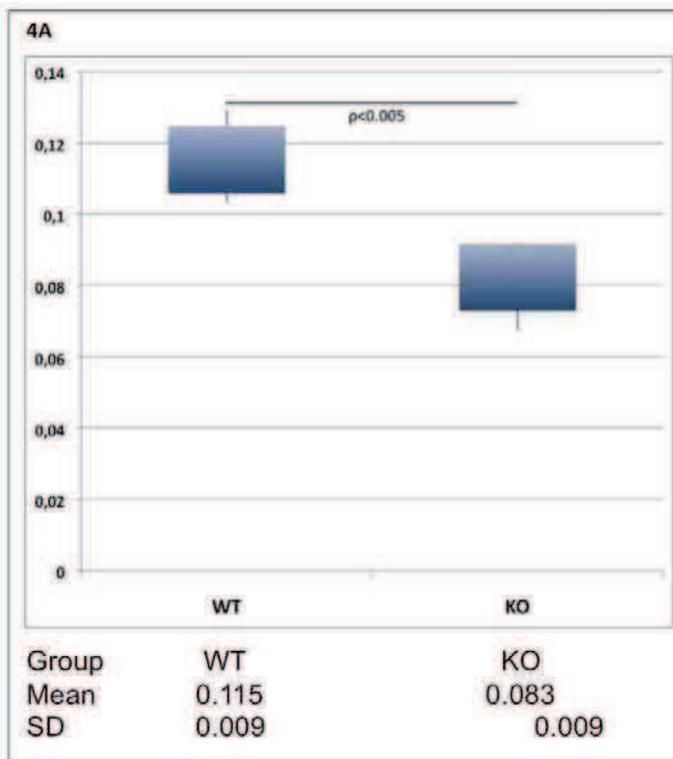
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

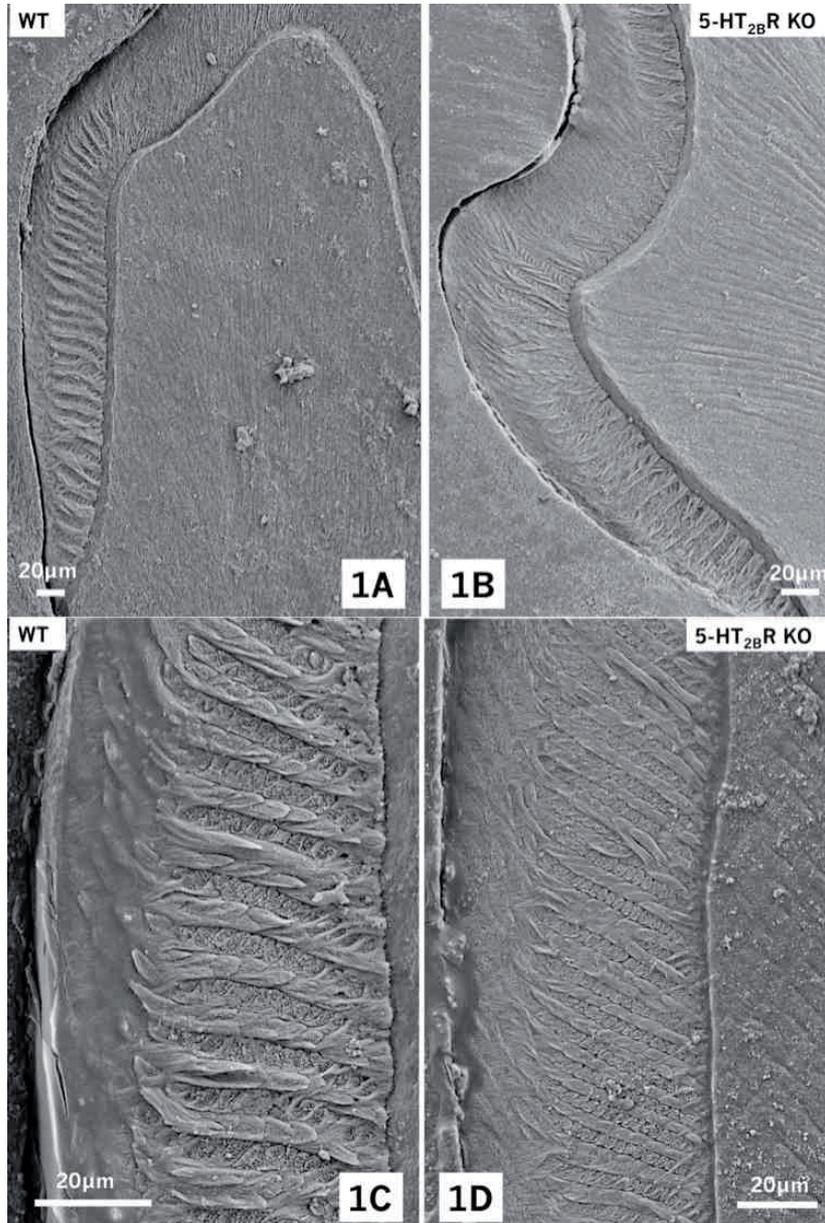


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Copy

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



8.3.2 Conclusion

Les résultats démontrent pour la première fois un rôle du récepteur 5-HT2B dans la formation de l'émail. Les souris KO présentent des altérations de structure 3D et de minéralisation de l'émail tant au niveau de l'incisive (MEB) que de la molaire (MEB et micro-CT).

Cette démarche a permis de corrélérer les techniques d'imagerie 3D (micro-CT) et l'analyse structurale de l'émail avec les techniques "lourdes" d'histologie. L'utilisation de l'imagerie pourra favoriser dans de futures études l'analyse des altérations de l'émail peu après la naissance (première semaine et 3 semaines) et leur évolution avec l'âge.

La visualisation 3D en "volume rendering" des données obtenues par micro-CT révèle des différences qualitatives de forme et d'épaisseur de l'émail entre les souris R2B-KO et les WT (Figure 8.11). L'émail des molaires apparaît plus irrégulier chez les souris R2B-KO (Figure 8.11 A et B). Les vues occlusales montrent une ouverture plus importante de la couronne formée par l'émail (Figure 8.11 C et D) traduisant une abrasion et une exposition de la dentine plus importantes chez les souris R2B-KO. Les coupes virtuelles illustrées sur les vues de côtés montrent une diminution de l'épaisseur de l'émail chez les souris R2B-KO (Figure 8.11 A et B en bas).

La mesure des volumes de l'émail confirme les résultats qualitatifs. Les souris R2B-KO ont en effet un volume d'émail de 30% ($p < 0.005$) inférieur à celui des WT.

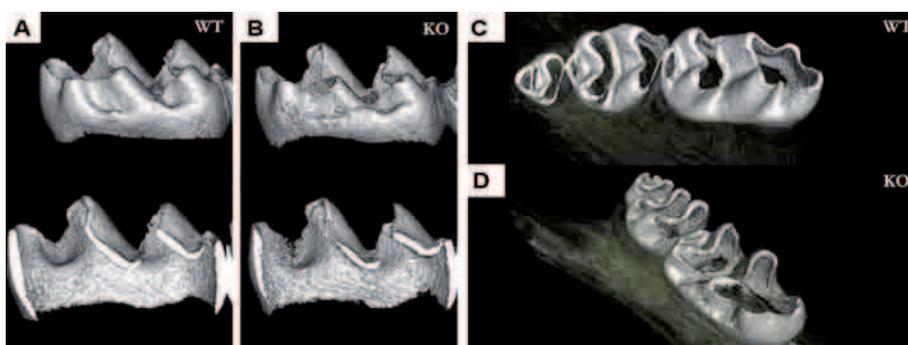


FIGURE 8.11 – Vue 3D en "volume rendering" de l'émaille de molaires de la mandibule

Les résultats obtenus en micro-CT ont été confirmés par l'analyse en microscopie électronique à balayage qui a montré des anomalies significatives de la micro-architecture de l'émail. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle dans la morphogénèse du tissu dentaire.

Chapitre **IX**

Analyse comparative à différentes échelles de différents systèmes de tomographie X

Collaborations :

- *Christophe Nich, B2OA, Faculté de Médecine Paris 7*
- *Catherine Vidal, Institut Pasteur et INSERM U 747, Paris*
- *Jean Langlois, B2OA, Faculté de Médecine Paris 7*
- *Morad Bensidhoum, B2OA, Faculté de Médecine Paris 7*
- *Hervé Petite, B2OA, Faculté de Médecine Paris 7*
- *Roger Lédée, Laboratoire PRISME, Orléans*
- *Christophe Léger, Laboratoire PRISME, Orléans*
- *Jean-François Paul, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson, Paris*

Sommaire

7.1	Introduction	128
7.2	Imagerie des tissus adipeux chez l'humain	128
7.3	Imagerie des tissus adipeux chez le petit animal	129
7.4	Analyses des images du tissu adipeux	129
7.5	Article : "Quantitative CT imaging for adipose tissue analysis in mouse model of obesity"	130
7.6	Discussion	139
7.6.1	Imagerie avec le scanner médical CT	139
7.6.2	Classification des voxels du tissu adipeux	139
7.6.3	Validation des outils basée sur les corrélations avec le poids de l'animal	140
7.7	Conclusion	141

9.1 Introduction

La composition corporelle d'un individu peut être décrite suivant différentes échelles. En fonction du point d'observation et de la méthode d'investigation utilisée, la composition du corps peut être décrite à l'échelle du corps entier, de l'organe, de la cellule, de la molécule puis de l'atome. Cette classification des tissus biologiques (Figure 9.1 (a)) est associée à des techniques d'investigation notamment par imagerie (Figure 9.1 (b)) [Ellis, 2000] [Mattsson and Thomas, 2006].

Table 2. (a) Description level for body composition (after Wang *et al* 1992, 2005b). (b) Measurement methods to determine the various components.

(a)				
Atomic	Molecular	Cellular	Tissue/organ	Whole body
N, Ca, P, S, K, Na, Cl, ...	Minerals (bone, soft tissue), CHO	Extracellular solids (ECS)	Other tissues (bone, ...)	Lower limbs
			Visceral organs	
H	Protein	Extracellular fluid (ECF)	Bone	Trunk
C	Lipid		Cells (Adipocytes)	
		Adipose tissue (AT)		Neck
O	Water			Head

(b)				
Atomic	Molecular	Cellular	Tissue/organ	Whole body
TBK, TBK and TBN	KxFFM, TBK/FFM,	3-methyl histidine,	CT,	'Skinfold',
	DEXA	creatinine	MRI	Ultrasound, BIA

BIA = bioelectrical impedance analysis; creatinine = a skeletal muscle metabolite; CT = computed tomography; FFM = fat-free mass; K = potassium; TBK = total body potassium; TBN = total body nitrogen; 3-methyl histidine = a skeletal muscle metabolite; MRI = magnetic resonance imaging; 'skinfold': see section 3.8.2.

FIGURE 9.1 – Classification multi-échelle des tissus du corps d'un individu (illustration modifiée à partir de [Mattsson and Thomas, 2006])

En respectant cette classification, on peut différencier les modalités d'imagerie moléculaire (molécule) et anatomique (pour le corps entier et les organes). Les deux échelles (corps entier et tissu) liées à l'imagerie anatomique sont cependant très vastes en terme de résolution d'investigation. Par exemple, l'étude de l'émail des molaires de la mandibule de souris nécessite une résolution de $5\mu m$ alors que la mesure de la longueur de l'animal nécessite une résolution de l'ordre de $1mm$.

Les problématiques qui utilisent l'imagerie du petit animal comme un outil d'investigation nécessitent bien souvent des informations à différentes échelles. Une technique d'imagerie capable d'apporter ce type d'information est qualifiée de multi-échelle. La tomographie par rayons X est une méthode multi-échelle puisque c'est la seule modalité d'imagerie 3D offrant une plage de résolution comprise entre $30nm$

et $2mm$. Pour offrir cette plage de résolution, plusieurs appareils avec chacun leur gamme de précision sont cependant nécessaires. Le micro-CT est plutôt dédié à l'échelle des tissus entre $1\mu m$ et 200μ et le CT entre $100\mu m$ et $2mm$.

Notre objectif a été d'évaluer les performances et les limites de différentes technologies de tomographie X, CT médical, micro-CT *in vivo* et *ex vivo* et synchrotron, pour l'imagerie du petit animal.

9.2 Démarche méthodologique

Cette étude a été réalisée avec trois objectifs distincts :

- la comparaison multi-échelle de plusieurs technologie d'imagerie par tomographie X
- le test des méthodes d'analyses des tissus adipeux et minéralisés en fonction du matériel d'imagerie
- l'étude multi-échelle et multi-site de l'impact dans le temps de l'ovariectomie sur les os longs et les os plats

Evaluation multi-échelle de l'imagerie par tomographie X Dans cette étude nous avons voulu comparer différentes échelles d'imagerie par tomographie X. Pour cela nous avons analysé les mêmes souris sur plusieurs appareils (CT et micro-CT) avec des résolutions différentes, en corps entier puis sur des échantillons extraits après dissection.

Notre idée était de tester l'imagerie avec la meilleure résolution puis de la dégrader en changeant les conditions expérimentales :

- échantillons de tissus minéralisés, *ex vivo* en micro-CT
- souris corps entier, tissus minéralisés, *ex vivo* en micro-CT
- souris corps entier, tissus adipeux, *ex vivo* en micro-CT
- souris corps entier, tissus minéralisés et adipeux, *ex vivo* en CT
- souris corps entier, tissus minéralisés et adipeux, *in vivo* avec anesthésie en CT
- souris corps entier, tissus minéralisés et adipeux, *in vivo* souris vigile en CT

En parallèle des acquisitions sur les souris, nous avons, à chaque acquisition, numérisé un objet de test (fantôme) dans l'objectif de caractériser des paramètres de performance de l'imagerie tels que le bruit relatif et le CNR (voir Chapitre 2).

Test des méthodes d'analyses d'image Les outils d'analyses des images tomographiques exposés dans les chapitres précédents ont été développées spécifiquement par rapport à une problématique biomédicale et aux caractéristiques de la modalité d'imagerie utilisée. Par exemple, les outils d'analyse des tissus adipeux ont été testés pour des images de CT qui peuvent être différentes des images micro-CT en terme de résolution, contraste, d'échelle de valeur de gris ou encore de calibration des niveaux de gris. Notre objectif a été d'utiliser les différents jeux de données de cette études multi-échelle pour tester les outils d'analyses du tissu adipeux sur plusieurs

appareils avec des mêmes animaux.

Pour l'analyse des tissus minéralisés, nous avons mis en évidence au cours des études décrites dans les chapitres précédents, que les outils qualitatifs tels que la visualisation en "volume rendering" offrent une description globale d'un échantillon, qui permet d'identifier et de mieux cibler les sites à analyser avec une échelle d'investigation plus précise. Dans ce sens, notre objectif a été d'étudier comment des différences entre animaux visibles avec un micro-CT se traduisent dans des images CT. Par exemple, nous avons voulu corrélérer l'appréciation qualitative de l'ostéopénie visibles sur les membres inférieures d'une souris en CT avec l'analyse qualitative de la micro architecture trabéculaire en micro-CT.

Etude multi-échelle des os plats après ovariectomie L'ovariectomie pratiquée chez la souris permet de simuler certains des effets de la ménopause. Les conséquences de la privation d'estrogènes sur le tissu osseux ont été essentiellement étudiées ex vivo par différentes méthodes : histologie, densitométrie, imagerie tomographique par microscanner (microCT). Une majorité de travaux portent sur les os longs (fémur, tibia, humérus) et les vertèbres. Quelques rares études laissent penser que la perte osseuse n'est pas équivalente entre les os longs et les os plats, tels les os du crâne. Par ailleurs, le déficit en estrogènes a d'autres conséquences sur l'organisme, dont une augmentation de la masse adipeuse.

Notre objectif a été d'étudier dans le temps les modifications morphologiques des tissus minéralisés et adipeux chez des souris ovariectomisées par imagerie tomographique couplée à des analyses qualitatives et quantitatives.

L'exploration phénotypique du corps entier de la souris en CT permettra l'analyse du décours temporel de la déminéralisation du squelette. Elle sera complétée par des analyses en micro-CT sur des os isolés, longs (tibia) et plats (calvaria).

Cette étude apportera des informations sur les périodes critiques d'ostéoporose après ovariectomie et sur les os les plus touchés. Les résultats permettront de sélectionner les échantillons à analyser ultérieurement par histologie.

L'imagerie tomographique par scanner médical permettra d'analyser qualitativement et quantitativement la distribution des tissus adipeux. Les résultats seront comparés à l'évaluation par densitométrie (PIXIMUS). Cette étude apportera des informations sur la répartition de la masse graisseuse à l'échelle du corps entier de la souris avec une précision et une rapidité d'examen sans équivalent avec les méthodes classiques.

9.3 Protocole expérimental

Dans cette étude, nous avons utilisé 42 souris réparties en trois groupes (Tableau 9.1). Dans chaque groupe la moitié des souris a été ovariectomisée (OVX) et l'autre moitié opérée mais sans ablation des ovaires (souris nommées "sham" ou WT). Les trois groupes diffèrent par le temps post-opératoire. Dans le groupe J60, les souris ont été élevées 60 jours après leur opération. Les délais correspondants aux

deux autres groupes sont de 45 et 21 jours.

	sham/WT	OVX
J60	7	7
J45	7	7
J21	7	7

TABLE 9.1 – Description des groupes de souris

Des souris déjà opérées ont toutes été reçues depuis un laboratoire (Charles River) suivant trois dates de livraison (Figure 9.2). Les 42 souris ont été sacrifiées, conditionnées dans des tubes en plastique et congelées à une même date avant d’être soumises à l’imagerie.



FIGURE 9.2 – Description des étapes de réception et d’élevage des différents groupes de souris

Pour réaliser les expérimentations nous avons commencé par analyser des souris corps entier *ex vivo* pour finir avec la plus petite échelle sur des pièces osseuses obtenues après dissection (Figure 9.3). L’ensemble des 42 souris corps entier et un fantôme de test ont été imagées sur deux CT (Siemens Flach CT 2 et Toshiba Aquilon 64). Six souris corps entier (1 WT et 1 OVX prélevées dans chaque groupe) ont été analysées en complément avec 2 micro-CT (Viscom 8060 et Skyscan 1172) et un appareil de DXA dédié au petit animal (PIXIMUS). Différentes pièces osseuses ont été prélevées par dissection (calvaria, mandibule, tibia) puis imagées sur un micro-CT haute résolution (Skyscan 1172). Enfin nous avons analysé deux mandibules sur la ligne de tomographie ID19 du synchrotron de l’ESRF.

9.3.1 Description du fantôme de test

Pour le contrôle qualité des appareils d’imagerie médicale, il existe des fantômes de calibration prêts à l’utilisation. Nous n’avons pas utiliser un tel objet pour nos expérimentations. Le fantôme utilisé a été fabriqué à partir de tube en plastique, de plexiglass et de PMMA. Le tube en plastique a servi de contenant, permettant de créer des zones avec des milieux homogènes. Six morceaux de tube ont été remplis

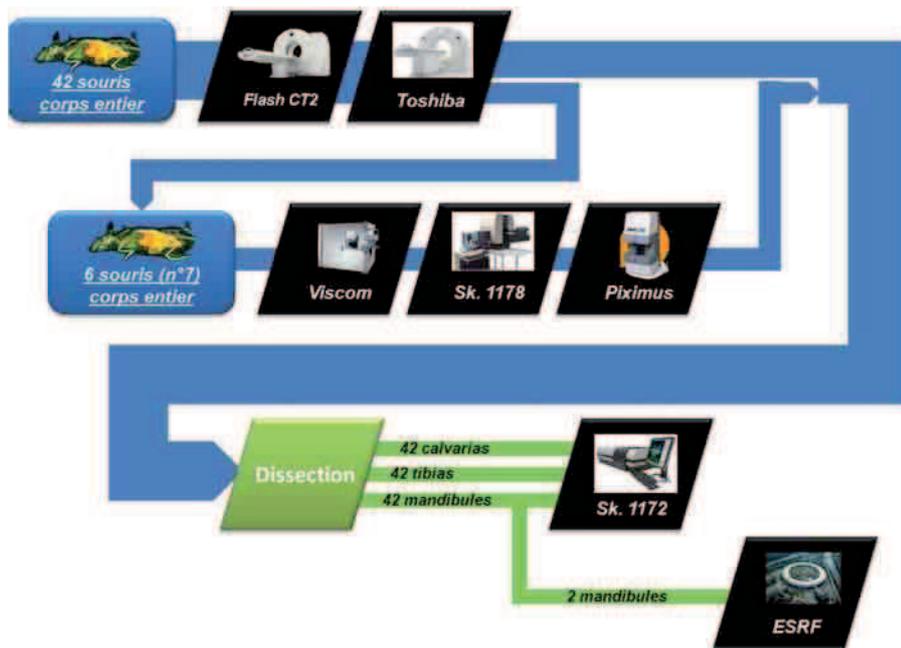


FIGURE 9.3 – Représentation des étapes du protocole d’imagerie

avec de l’air, de l’eau et de l’huile alimentaire (comme calibration des tissus adipeux). Les six tubes ainsi formés ont été placés avec un septième tube de PMMA (avec une densité permettant une calibration des tissus minéralisés) au sein d’un cylindre de plexiglass (Figure 9.2).

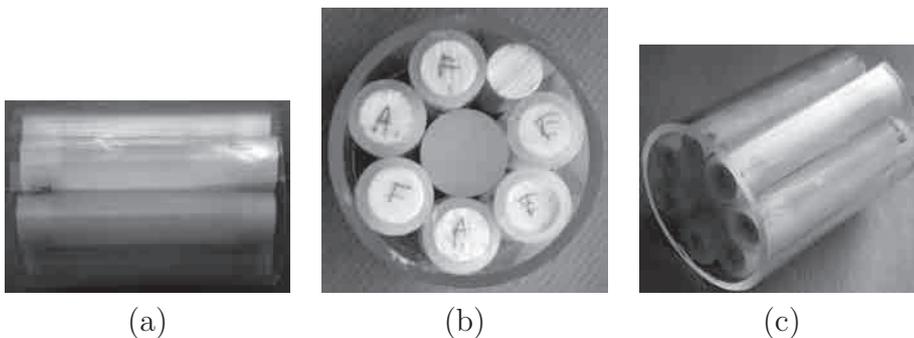


TABLE 9.2 – Illustrations du fantôme de calibration utilisés pour les expérimentations

Ce fantôme permet d’avoir des valeurs de références équivalentes à l’air, la graisse, l’eau et l’os.

9.3.2 Détails des acquisitions

9.3.2.1 Siemens Flash CT 2

Dans l’idée de trouver de paramètres d’acquisition optimaux pour l’imagerie *in vivo*, nous avons cherché à exploiter la rapidité d’acquisition de cet appareil, qui

est est d'après les données des différents constructeurs le scanner le plus rapide. Nos choix ont été basés sur les critères suivants :

- la vitesse d'acquisition
- l'irradiation
- la qualité d'image en terme de contraste et de bruit
- la résolution (nous avons choisi la meilleure taille de pixel accessible avec l'outil de reconstruction du scanner mais qui donne une image interpolée)

Nom de la séquence	tension (kVp)	courant (mAs)	taille du voxel	Nbre de coupes
100-KV-01-0-6-B70S	100	540	0.1x0.1x0.1	17424
SOURIS-S1-0-6-B70S	100	540	0.1x0.1x0.15	11616
INCR-01-0-6-B70S	80	540	0.1x0.1x0.1	17061
DE-0-6-D30S-80-140KV	80 et 140	400	0.1x0.1x0.3	1563

TABLE 9.3 – Description des paramètres d'acquisition sur le scanner Siemens Flash CT 2

Lors de ces acquisitions, les tubes contenant les souris ont été alignés les uns derrière les autres. Il a été possible de positionner l'ensemble des souris de deux groupes et le fantôme de test, c'est à dire 14 souris et le fantôme de test (Figure 9.4 et 9.5).



FIGURE 9.4 – Exemple de vue de profil d'une acquisition réalisée avec 14 souris et l'objet de test sur le scanner Flash CT 2

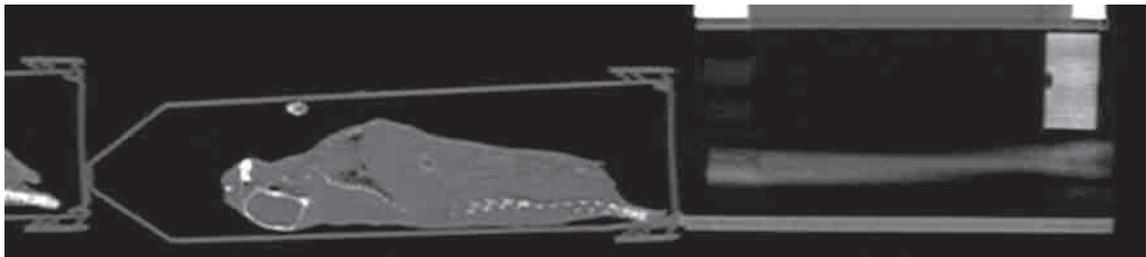


FIGURE 9.5 – Zoom sur la vue de profil d'une l'acquisition permettant de distinguer la souris à l'intérieur du tube et l'objet de test derrière ce tube

L'acquisition "DE-0-6-D30S-80-140KV" est un test d'imagerie en mode Dual-CT. Lors de cette acquisition les deux sources du scanner Flash CT 2 ont émis chacune un faisceau de caractéristique en énergie différent. Ces faisceaux ont été obtenus avec des tensions de 80kVp et de 100kVp. Cet essai avait pour but de tester l'intérêt du mode Dual-CT de ce scanner pour l'imagerie de la souris.

9.3.2.2 Toshiba CT Aquilon 64

Pour les acquisitions sur le scanner Toshiba Aquilon 64, nous avons cherché à minimiser l'irradiation. Nous n'avons donc pas utilisé les mêmes conditions expéri-

mentales que celles décrites au Chapitre 7. Les paramètres utilisés dans cette étude pour le scanner Toshiba ont été les suivants : 135 kVp pour la tension, 400 mAs pour le courant et une résolution de $0.1 \times 0.1 \times 0.3 \text{ mm}$ (environ 3000 coupes pour un groupe de 7 souris). Nous avons réalisé les acquisitions en groupant les souris par 7 (1 groupe entier par acquisition) (Figure 9.6).



FIGURE 9.6 – Exemple de vue de profil d'une acquisition réalisée avec 7 souris et l'objet de test sur le scanner Toshiba Aquilon 64

9.3.2.3 Skyscan 1178

Le micro-CT Skyscan 1178 est un appareil dédié à l'imagerie *in vivo* chez la souris ou le rat avec des résolutions de $80 \mu\text{m}$ ou de $100 \mu\text{m}$. Lors de nos tests, nous avons utilisé une tension de 65kV, un courant de 615mA, 3 projections radio moyennées par orientations tous les 0.7° pour l'imagerie du corps entier de la souris. Les acquisitions ont été réalisées une seule souris à la fois (Figure 9.7).

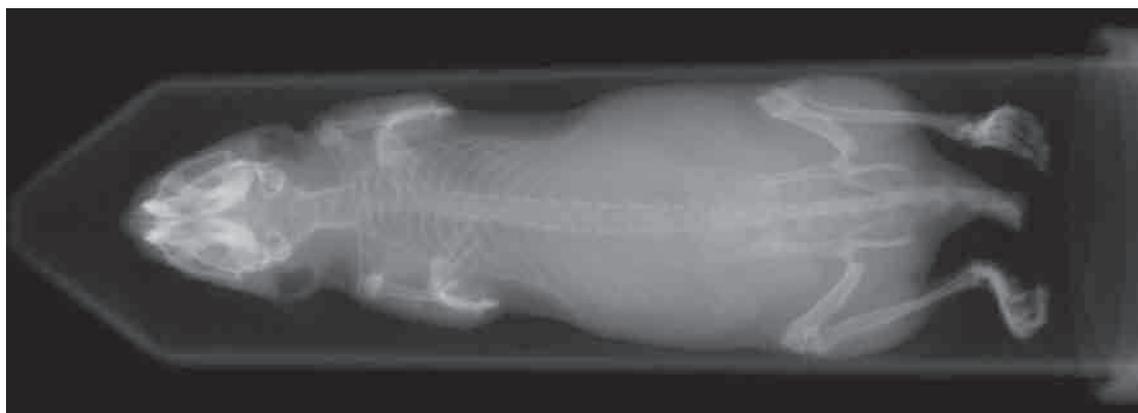


FIGURE 9.7 – Exemple de vue de profil d'une acquisition réalisée sur le micro-CT Skyscan 1178

9.3.2.4 Viscom 8060 NDT

Le micro-CT Viscom 8060 NDT est un appareil conçu pour des applications industrielles de contrôle non destructif. Sa source X permet d'atteindre des tensions et des courants beaucoup plus importants qu'un micro-CT dédié à l'imagerie du petit animal. Pour nos tests, nous avons choisi de tirer partie de cette source pour avoir une bonne qualité d'image. Les paramètres que nous avons utilisés sont les suivants : 80 kV pour la tension, $1250 \mu\text{A}$ pour le courant, 500 ms d'exposition pour chaque projection et une rotation de 360° avec un incrément de 1° . Comme pour les acquisitions sur le micro-CT Skyscan 1178, une seule souris à la fois a été imagée (Figure 9.8).

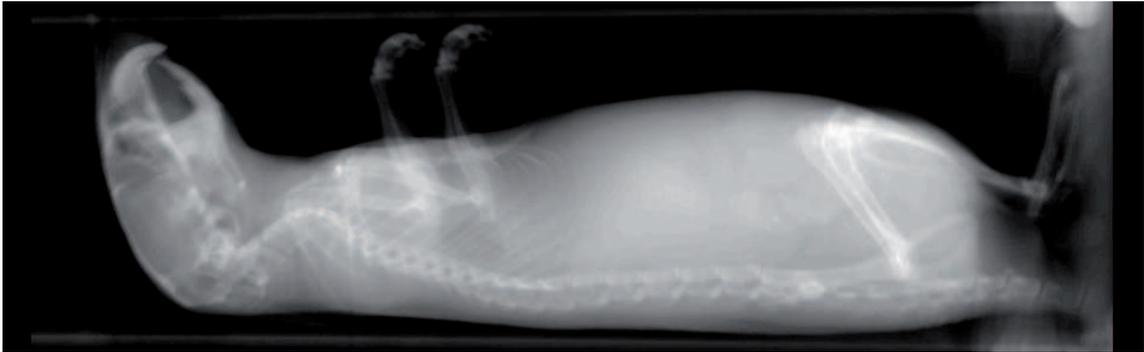


FIGURE 9.8 – Exemple de vue de profil d’une acquisition réalisée sur le micro-CT Viscom 8060

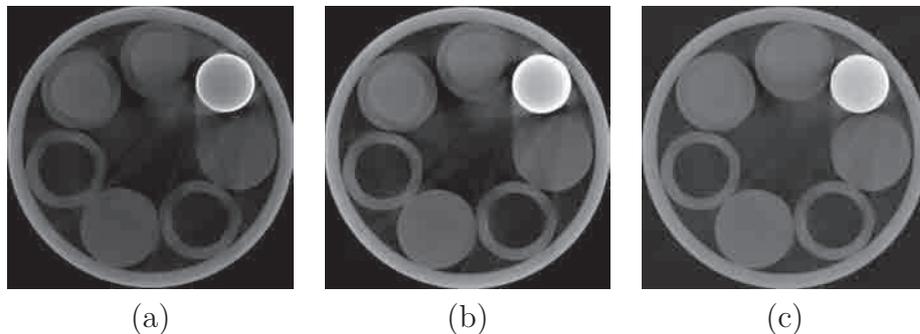


TABLE 9.4 – Illustration de coupes 2D extraites à partir de 3 acquisitions obtenues sur le fantôme de calibration : l’acquisition (a) a été réalisé avec une tension de $50kV$ et un courant de $2000\mu A$, et les acquisition (b) et (c) avec une tension de $80kV$ et un courant de $1250\mu A$. Un filtre de molybden (Mo) a été utilisé pour l’acquisition (c)

9.3.2.5 Skyscan 1172

Le micro-CT Skyscan 1172 a permis de réaliser des acquisitions ex vivo sur les échantillons d’os isolés. Parmi les différentes pièces osseuses préparées lors de la dissection (calvarias, mandibules, tibias), nous n’avons pas encore effectué toutes les acquisitions. Seules le groupe des calvarias a pu être analysé en totalité avec les paramètres d’acquisitions suivants : $80 kV$ et $100 \mu A$, $100 ms$ d’exposition et moyennage de 6 images pour chaque orientation tous les 0.5° et avec une résolution de $8 \mu m$. L’imagerie a été réalisée avec 3 calvarias positionnées verticalement pour chaque acquisition.

Nous avons prévu d’utiliser les paramètres d’acquisitions suivants pour l’imagerie des tibias : $60 kV$ et $100 \mu A$, $400 ms$ d’exposition et moyennage de 6 images pour chaque orientation tous les 0.7° et avec une résolution de $6.7\mu m$. Les paramètres d’acquisition pour les mandibules n’ont pas encore définis.

9.3.2.6 Synchrotron ESRF

Deux mandibules ont été analysées sur la ligne de micro-tomographie ID 19 du synchrotron ESRF avec l'aide de Paul Tafforeau (chercheur en paléontologie à l'ERSF et spécialiste de la tomographie synchrotron). Une des thématiques importantes de cette de l'équipe associée à cette ligne est l'analyse des tissus osseux. Les possibilités d'analyses de cette ligne sont : un faisceau monochromatique, la tomographie locale, l'holotomographie, la reconstruction de phase uni-distance avec la méthode de Paganin [Paganin et al., 2002].

Le faisceau monochromatique, permettant une analyse quantitative des densités minérales, est obtenu avec un monochromateur avec une structure multicouche en silicium. En fonction de l'inclinaison dans le faisceau X, il est possible de sélectionner par réflexion dans la multicouche une longueur d'onde et rendre ainsi monochromatique le faisceau. Cette filtration engendre une forte atténuation de l'intensité du faisceau et introduit des artefacts du aux défauts de la multicouche ("ring artefacts" et variations basses fréquences visible sur la distribution des niveaux de gris).

Une autre approche consiste à utiliser un faisceau non monochromatique mais avec une bande d'énergie étroite, ce faisceau est appelé "Pink Beam". Nous avons utilisé un faisceau de ce type dont les caractéristiques ont été ajustées par simulation du spectre en bout de ligne à l'aide du logiciel XOP (ESRF) par Paul Tafforeau. La simulation a permis de mettre en évidence une configuration avec un ensemble de différents filtres (cuivre, aluminium, molybden, ...). L'avantage de cette approche est d'obtenir un faisceau quasi monochromatique tout en conservant la qualité du faisceau en terme d'intensité et d'homogénéité.

Ce faisceau a été associé à une méthode de reconstruction de phase uni distance avec la méthode Paganin. Contrairement à l'holotomographie [Cloetens et al., 1999] qui nécessite la combinaison d'une image d'absorption et de 3 ou 4 images de contraste de phase, l'estimation de la phase induite par l'objet est calculée à partir d'une seule image de contraste de phase. A partir d'une seule acquisition, il est alors possible d'obtenir une image en absorption avec une reconstruction classique et une image de contraste de phase avec la méthode de Paganin.

Nous avons utilisé ces deux critères pour l'imagerie de la mandibule avec une résolution isotrope de $7.5\mu m$.

9.4 Etude comparative des différentes technologies d'imagerie

L'étude des différentes technologies d'imagerie a consisté dans un premier temps, pour chaque type d'acquisition en corps entier à l'évaluation de paramètres caractéristiques à partir des images du fantôme de test. Nous avons ensuite comparé l'imagerie ex vivo sur pièce isolée en micro-CT et en tomographie synchrotron.

9.4.1 Etude avec le fantôme de test

A partir des images obtenues avec le fantôme de test pour chacune de nos 4 acquisitions en corps entier, nous avons calculé le bruit relatif et le CNR (voir Chapitre 2). Les mesures permettant ces analyses ont été effectuées sur des coupes 2D extraites du volume décrivant le fantôme de test. Pour chaque acquisition, les valeurs indiquées dans les tableaux suivant correspondent à la moyenne de la mesure effectuée sur 5 coupes 2D réparties au sein du volume 3D.

9.4.1.1 Analyse du bruit relatif

Les valeurs de bruit relatif mesurées pour chacune des 4 acquisitions en corps entier sont indiquées dans le Tableau 9.5. Ces valeurs ont été obtenues pour des régions du fantôme de test correspondant à la graisse, à l'eau (représentatif des tissus mous : muscles, foie, reins, ...) et à l'os.

Bruit	CT Siemens	CT Toshiba	Skyscan1178	Micro-CT Viscom
Graisse	3.7%	3.8%	14.8%	10.2%
Eau	3.2%	2.8%	13.1%	10.8%
Os	1.4%	1.1%	5.9%	7.3%

TABLE 9.5 – Valeurs de Bruit relatif mesurées à l'aide du fantôme de calibration

Ces résultats indiquent que le niveau de bruit est plus important pour les micro-CT que pour l'imagerie CT. Pour chaque acquisition, le niveau de bruit semble équivalent entre les régions de la graisse et de l'eau. On note cependant une légère tendance pour l'acquisition sur le CT Toshiba, avec une valeur de bruit plus faible pour l'eau que pour la graisse.

9.4.1.2 Analyse du contraste

Le paramètre de CNR permet l'appréciation du contraste entre deux types de tissus tout en prenant en compte leur niveau de bruit. Nous avons mesuré le CNR pour l'évaluation du contraste entre l'air et l'eau, entre la graisse et l'eau, entre l'os et l'eau (Tableau 9.6).

L'analyse du contraste entre la graisse et l'eau doit permettre d'apprécier la capacité du système à distinguer les tissus adipeux et les musculaires. Ce paramètre est

Tissus	CT Siemens	CT Toshiba	Skyscan1178	Micro-CT Viscom
Air/Eau	24.9	18.9	7.6	8.6
Graisse/Eau	3.3	2.8	1.8	1.6
Os/Eau	41.7	46.1	12.1	7.3

TABLE 9.6 – Valeurs de CNR mesurées à l'aide du fantôme de calibration

donc pertinent dans le cadre de l'étude de modèles animaux de l'obésité nécessitant, comme au Chapitre 7, l'analyse des tissus adipeux.

D'après ces résultats, le scanner Flash CT 2 Siemens semble présenter le meilleur compromis entre contraste et bruit pour l'analyse des tissus adipeux. Le scanner Toshiba présente une valeur de CNR meilleure que les micro-CT mais plus faible que le scanner Flash CT 2. On retrouve cette même tendance pour les deux autres types de contraste mesurés.

On peut noter que les appareils présentent des caractéristiques de CNR très différentes, surtout entre micro-CT et CT.

Que ce soit pour le bruit relatif ou pour le CNR, le micro-CT semble présenter des performances moins favorables que le CT. Ces résultats doivent cependant prendre en considération la résolution de ces imageurs. En effet, bien que la taille des voxels soit approximativement la même pour les 4 imageries, il existe des différences en terme de résolution spatiale. La taille de voxel de $100 \mu m$ obtenue avec les scanner CT est une résolution interpolée. Par exemple pour la dimension en "Z" le long de l'animal, le "pitch" entre deux détecteurs est de $300 \mu m$, toute valeur plus fine dans cette direction est donc obtenue par interpolation pendant la séquence d'acquisition en hélice du scanner.

9.4.2 Imagerie *ex vivo* sur la mandibule

Nous avons choisi de comparer l'imagerie *ex vivo* sur pièce isolée en utilisant la mandibule de souris. Des images de mandibule ont été obtenues sur le micro-CT Viscom 8060 et sur la ligne ID 19 du synchrotron de l'ESRF. Cette analyse comparative basée sur les images 3D de ces acquisitions a été qualitative. Nous avons utilisé le "volume rendering" en ajustant les fonctions pour obtenir pour chaque acquisition le rendu le plus similaire possible. Un exemple de rendu 3D en "volume rendering" est illustré sur la Figure 9.9.

La visualisation en "volume rendering" a été utilisé pour faire ressortir les différences de densité au sein de la dent. Bien que l'orientation de la coupe 3D ne soit pas parfaitement identique entre les deux images, il est possible de les comparer. On peut noter que l'image issue du synchrotron permet de distinguer clairement l'émail de la dentine mais également la dentine du ciment situé à la point de racines. Sur l'image en micro-CT on distingue une différence entre l'émail et la dentine mais pas entre la dentine et le ciment. Cet exemple illustre bien la différence de qualité entre

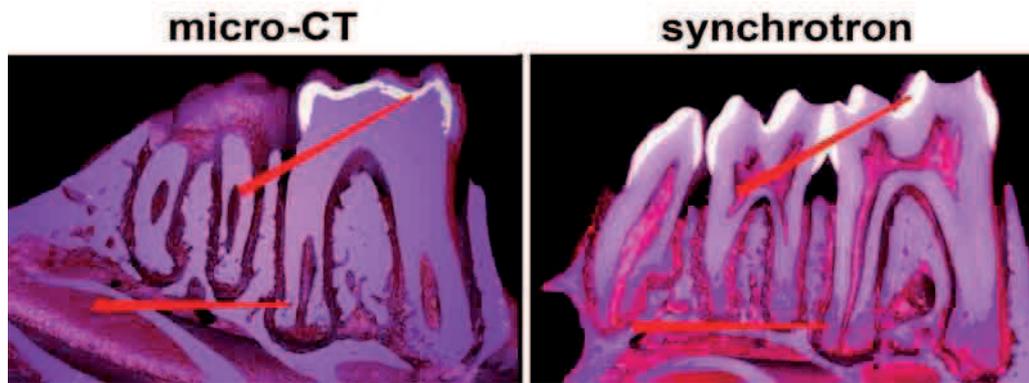


FIGURE 9.9 – Comparaison entre micro-CT et tomographie synchrotron avec une image 3D de mandibule

l'acquisition micro-CT et celle en synchrotron.

En analysant plus en détail l'image micro-CT, on peut également voir que la bordure de l'émail présente un gradient de densité, on peut distinguer un léger film à la surface de l'émail. Cet artefact, non visible dans l'image synchrotron, peut être expliqué par la polychromaticité du faisceau utilisé en micro-CT.

Les images illustrées dans les figures suivantes ont été obtenues uniquement avec le synchrotron. Elles permettent d'établir une référence en terme d'imagerie 3D X de la mandibule.

Sur la Figure 9.10, la visualisation 3D a été obtenue en conservant à l'affichage les tissus peu denses. On peut voir par exemple des restes de tissus mous qui n'ont pas été enlevés lors de la dissection (en haut à gauche de l'image). L'orientation de la coupe permet de voir la zone de formation de l'incisive et même d'apprécier comment se forme ce tissu minéralisé dentaire à croissance continue.

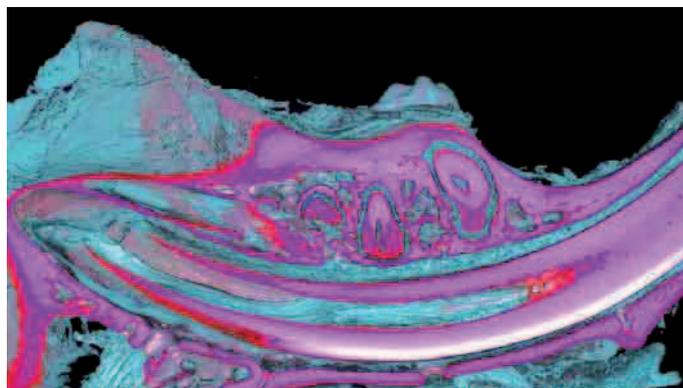


FIGURE 9.10 – coupe 3D de la mandibule avec visualisation des tissus mous et minéralisés permettant de visualiser la zone de formation de l'incisive

La Figure 9.11 montre deux coupes 3D de la mandibule, une passant par l'axe des racines des molaires, et l'autre séparant en deux l'incisive. Sur l'image A, la coupe au niveau de l'os basale (os principal de la mandibule avec une coupe située autour de l'incisive) laisse entrevoir des ostéoplastes (petits points) et des canaux sanguins ou nerveux.

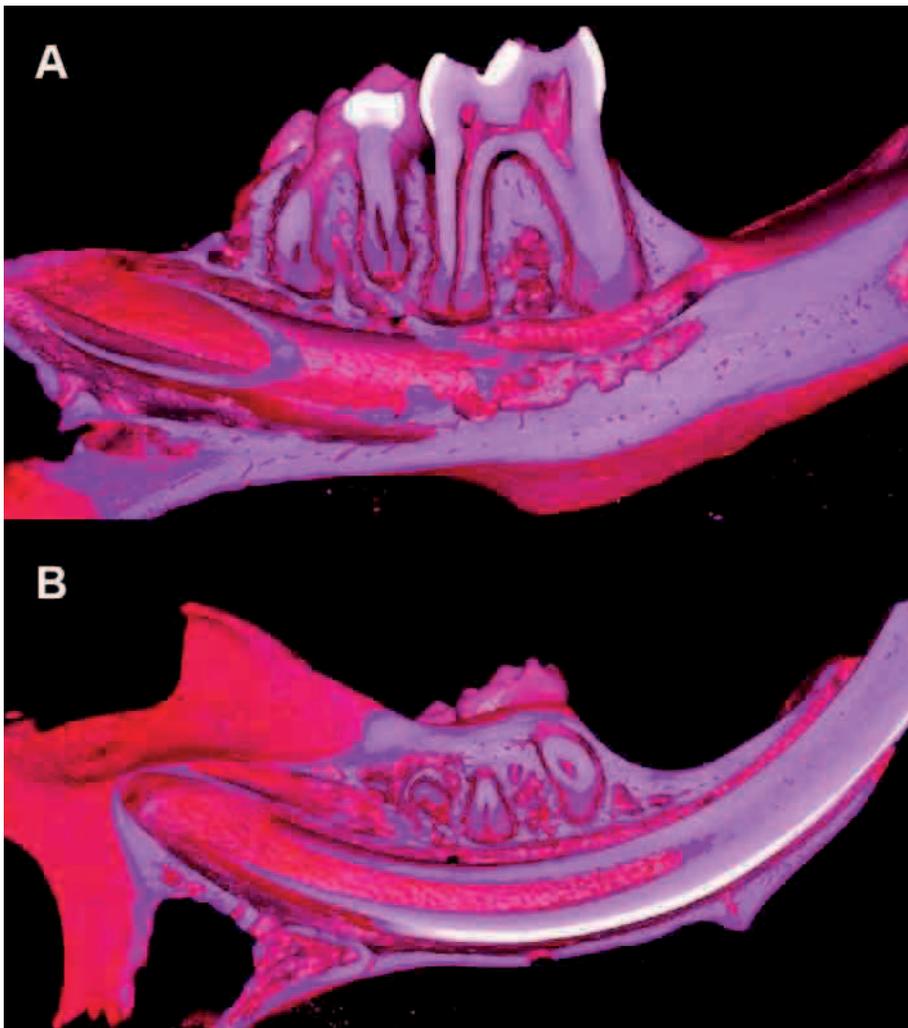


FIGURE 9.11 – Vues 3D de la mandibule en coupe dans l'axe des racines racines (A) et au niveau du cément (B)

Les coupes obtenues sur la Figure 9.12 permettent d'apprécier l'intérieur du canal pulpaire des 3 molaires de la mandibule.

La Figure 9.13 est une succession de coupe 3D perpendiculaires à l'axe des racines des molaires. A mesure que les coupes s'approchent de la pointe de la racine vers le cément on peut voir comment évolue l'interface entre la racine et l'os alvéolaire qui l'entoure. Au niveau du cément on distingue une surface "picotée" laissant imaginer les liaisons entre les différents tissus (vasculaires, ...).

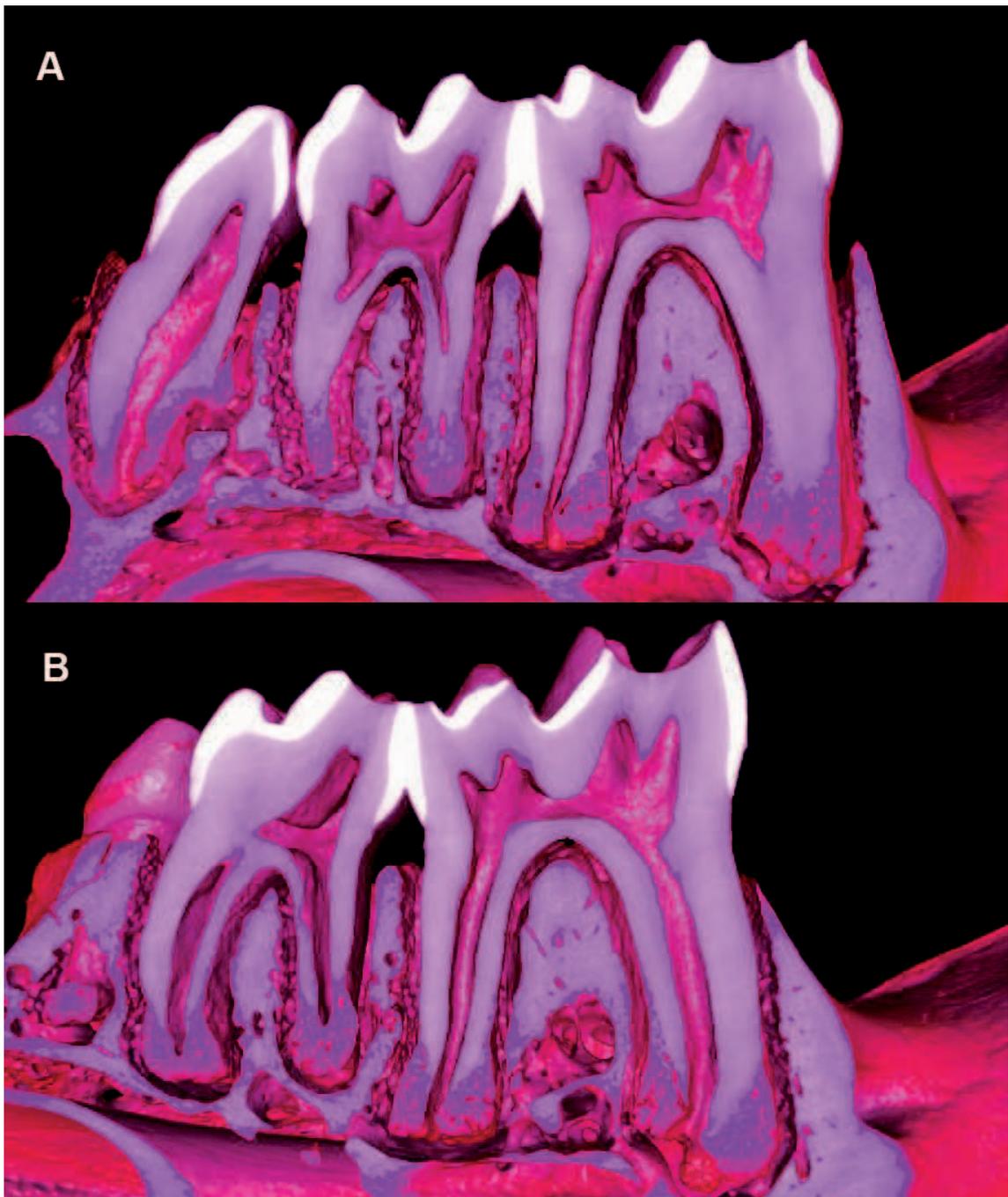


FIGURE 9.12 – Vue 3D en coupe du bloc molaire de la mandibule permettant de distinguer clairement l'émail, la dentine, la canal pulpaire, le ciment et l'os alvéolaire

En isolant les deux premières molaires, le rendu 3D peut être focalisé sur l'anatomie de la dent. La Figure 9.14 illustre différents rendus permettant d'analyser qualitativement la forme de l'endodonte (canal pulpaire), la répartition de l'émail, de la dentine et du ciment.

Les vues 3D de la Figure 9.15 présentent des coupes des deux premières molaires perpendiculairement à l'axe des racines. Elles permettent de distinguer la

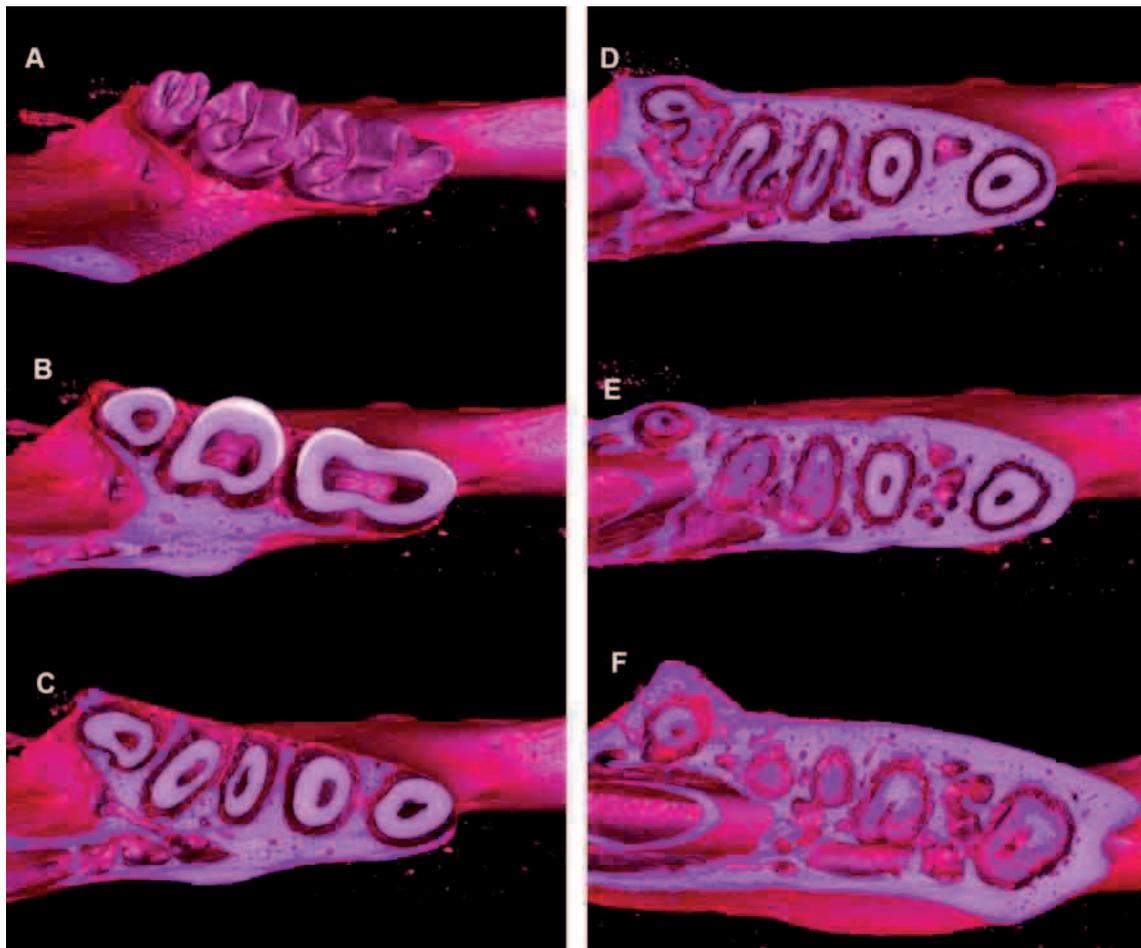


FIGURE 9.13 – Vues 3D de la mandibule avec des coupes successives depuis les pointes des cuspides jusqu'à la base des racines

grande homogénéité du tissu dentinaire et la porosité de la zone du ciment.

Ces images obtenues à partir du synchrotron sont tout à fait comparables à des images obtenues en histologie avec la microscopie électronique à balayage. La grande qualité de l'acquisition permet d'avoir avec une imagerie à $7.5 \mu m$ une imagerie de la mandibule. L'apport de l'information de phase permet de renforcer les interfaces et rendre ainsi visibles des structures telles que les ostéoplastes. La visualisation de ces fines structures n'est pas possible avec le micro-CT. De plus la Figure 9.9 montre que l'imagerie micro-CT ne permet pas de distinguer de faibles différence de minéralisation comme le permet le synchrotron.

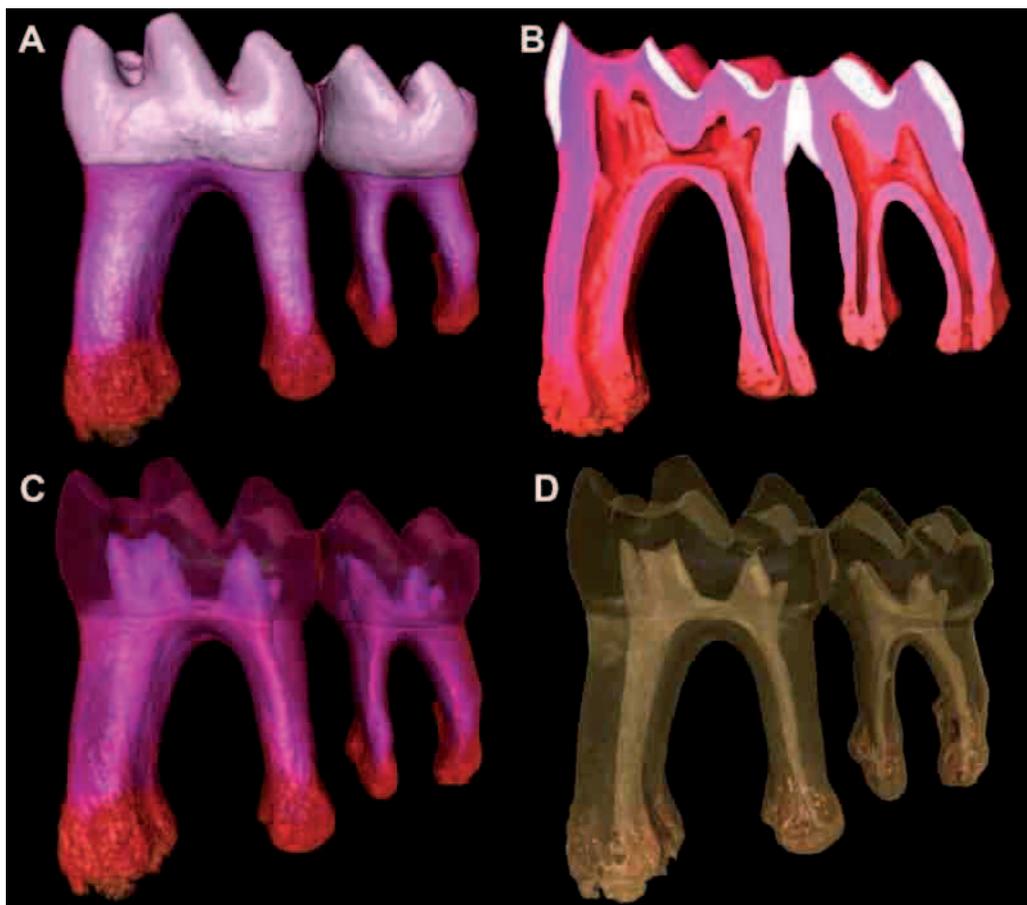


FIGURE 9.14 – Vues 3D des deux premières molaires de la mandibule avec des rendu différents permettant de distinguer l'anatomie de la molaire

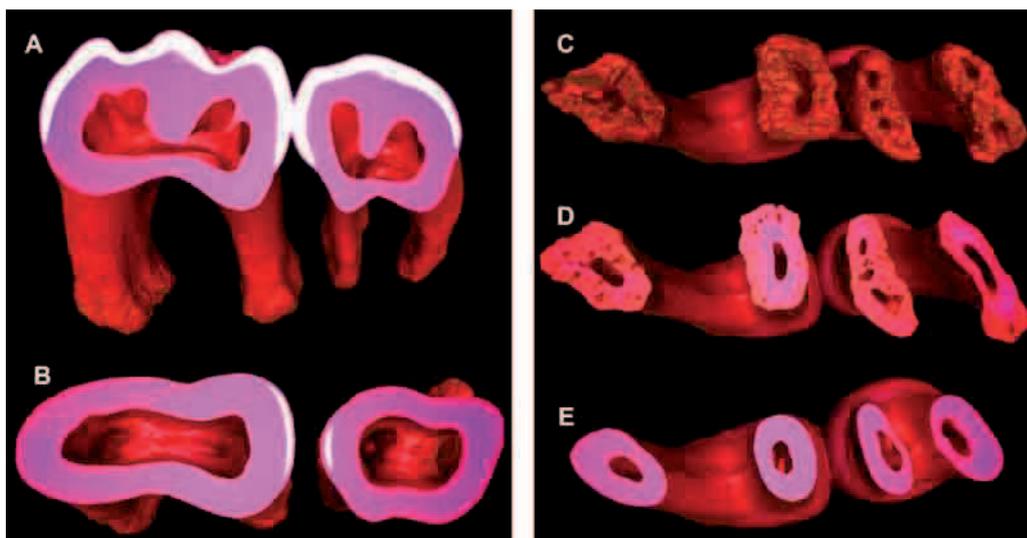


FIGURE 9.15 – Vues 3D des deux premières molaires avec des coupes successives depuis les pointes des cuspidés jusqu'à la base des racines

9.5 Test des outils d'analyse d'image

9.5.1 Comparaison entre les techniques d'imagerie en corps entier

Les souris $n^{\circ}7$ de chaque groupe ont été analysés en imagerie corps entier en CT et en micro-CT. La Figure 9.16 permet de comparer ces 4 acquisitions.

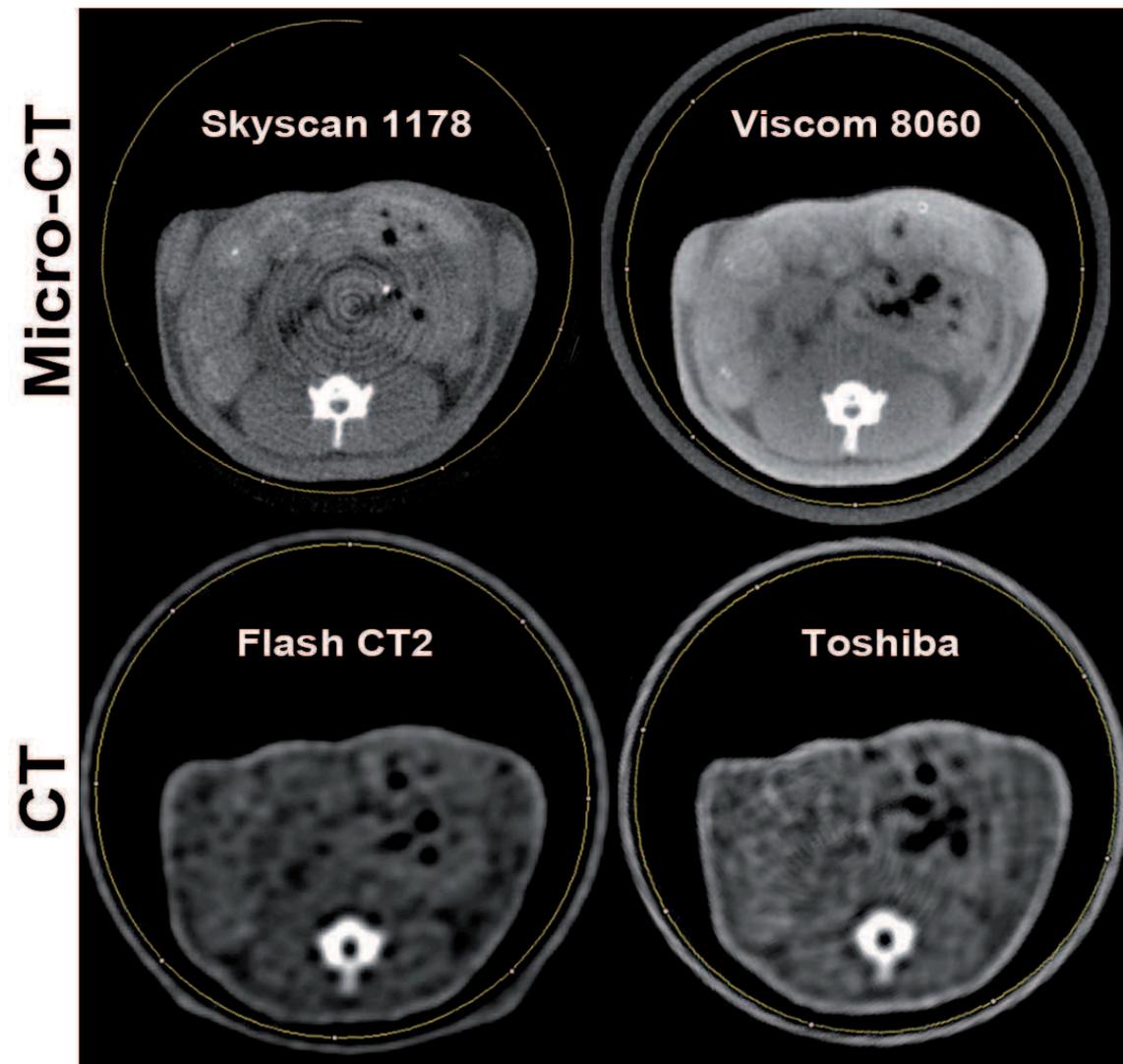


FIGURE 9.16 – Illustration de la comparaison de 4 tomographies avec la visualisation d'une coupe 2D extraite entre les vertèbres L5 et S1 de la souris $n^{\circ}7$ du groupe J60-WT

Comme l'a montré l'analyse du fantôme de test, les images en micro-CT semblent plus bruitées. On distingue de plus des "ring artefacts" sur l'image du Skyscan 1178. Cependant, les images CT montrent clairement moins de détails au sein de l'abdomen. Ces images présentent sûrement un meilleur CNR mais disposent d'une résolution spatiale inférieure au micro-CT.

9.6 Perspectives

Cette étude n'a pas pu être terminée et de nombreux travaux complémentaires doivent être effectués afin de répondre aux trois objectifs proposés :

- concernant le test des outils d'analyse d'images développées notamment pour l'analyse des tissus adipeux, nous devons tester les outils sur les données de souris imagées en corps entier sur les quatre scanners (2x CT et 2x micro-CT)
- nous devons tester si le déficit en minéralisation visible avec le volume rendering est reproductible entre CT Toshiba et CT Flash
- il serait intéressant de tester si le déficit en minéralisation visible avec le volume rendering est bien corrélé avec l'analyse de la structure osseuse avec une plus faible résolution. Cette étape nécessite cependant des acquisitions de données supplémentaires
- afin d'apporter des éléments de résultats sur la problématique biomédicale liée à l'analyse multi-échelle des os après l'ovariectomie, nous devons terminer les acquisitions sur les tibias de souris en micro-CT *ex vivo*

Irradiation induite lors d'un acte d'imagerie en tomographie X

Collaborations :

- Yves-Michel Frapart, CNRS UMR 8601, Université Paris 5
- Fabienne Peyrot, CNRS UMR 8601, Université Paris 5
- Catherine Vidal, Institut Pasteur et INSERM U 747, Paris
- Roger Lédée, Laboratoire PRISME, Orléans
- Christophe Léger, Laboratoire PRISME, Orléans

Sommaire

8.1	Introduction	144
8.2	Etude A : analyse du phénotype des souris R2B-KO à l'échelle du corps entier	144
8.2.1	Protocole expérimental	144
8.2.2	Etude des tissus minéralisés	144
8.2.3	Etude des tissus adipeux	146
8.2.4	Etude des voies respiratoires	148
8.2.5	Conclusion	149
8.3	Etude B : analyse du phénotype du tissu dentaire chez les souris R2B-KO	150
8.3.1	Article : "Enamel alterations in serotonin 2B receptor knockout mice"	151
8.3.2	Conclusion	174

10.1 Introduction

Chez l'humain, l'exposition des patients à des rayonnement ionisants est considéré avec une grande attention. L'enjeu principal de l'imagerie CT n'est plus l'amélioration de la rapidité des scanners ou de la qualité des images mais la réduction de la dose délivrée au patient lors de l'acte d'imagerie. En routine clinique on choisit d'appliquer le principe de précaution ALARA ("As Low As Responsible Achievable"). En effet l'irradiation induit des risques pathologiques très complexes à prévoir, c'est pourquoi on préconise une exposition minimale du patient.

En recherche biomédicale, l'utilisation de l'imagerie par tomographie X chez la souris soulève des questions quant aux effets des rayonnements. L'effet des radiations reçues lors d'un acte d'imagerie ne doit pas interférer avec l'étude en cours. Par exemple en cancérologie, l'imagerie ne doit pas induire l'équivalent d'un traitement de radiothérapie. A défaut de pouvoir étudier directement les effets radiobiologiques, il est indispensable de pouvoir évaluer la dose délivrée à la souris et à chacun de ses organes. Cependant, il existe relativement peu d'études portant sur l'évaluation de la dose en micro-CT.

La dose est donc un critère important pour l'évaluation et la comparaison des tomographes. C'est dans ce contexte que nous avons réalisé une étude expérimentale de dosimétrie avec une méthode standard puis avec une méthode originale par RPE encore jamais utilisée chez le petit animal.

10.2 Radiobiologie : effets biologiques des rayonnements

Les rayonnements ionisants peuvent causer des dommages dans les tissus biologiques. Leur action est soit directe, les cellules sont endommagées directement par le rayonnement, soit indirecte, les tissus sont endommagés par les radicaux libres générés par les interactions ionisantes.

Les dommages cellulaires peuvent être assimilés et réparés dans une certaine mesure par le corps de l'individu. Pour l'homme comme pour le petit animal, il existe un seuil à partir duquel les effets de l'irradiation sont irréversibles, on parle d'effets déterministes. Ces dommages, dont l'ampleur dépend de la quantité de rayonnement reçue, peuvent induire dans un court délai une modification de la formule sanguine, une perte de cheveux (ou de poils), une nécrose des tissus ou encore une cataracte.

Par opposition aux effets déterministes, les effets stochastiques sont des effets à long terme. La probabilité de contracter une maladie est liée à la quantité de rayonnement reçue des années auparavant. Des leucémies ou des cancers sont des maladies susceptibles d'apparaître plusieurs années après une irradiation. Bien que plusieurs modèles de ces effets existent, il n'existe encore aucun consensus quant aux conséquences de l'exposition à de faibles irradiations.

La quantité d'énergie déposée par unité de masse par le rayonnement ionisant est une dose d'irradiation absorbée. L'unité de dose est le gray (Gy) qui équivaut à

la quantité de rayonnement requise pour qu'une énergie de 1 Joule (J) soit absorbée dans 1 kilogramme de matière :

$$1Gy = 1J/Kg \quad (10.1)$$

A titre d'exemple, lorsque 1 Kg d'eau est irradiée avec 1 Gy, l'eau absorbe 1 joule et sa température augmente de 0.00024 °C.

La dose absorbée permet de définir la quantité physique d'énergie déposée par le rayonnement dans la matière mais n'en reflète pas les effets. Le type de rayonnement (X, γ , particules, ...), le spectre en énergie, la nature des tissus irradiés (poumon, os, cerveau, thyroïde, ...) sont parmi les facteurs qu'il faut prendre en compte afin de définir les dommages éventuels.

Un facteur de pondération w_r est défini pour corriger la valeur de dose absorbée D afin de prendre en compte la nature du rayonnement. La dose ainsi corrigée est une dose équivalente H qui est exprimée en Sieverts (Sv) :

$$H = D.w_r \quad (10.2)$$

Le facteur de pondération w_r est de 1 pour les rayons X ou γ , mais il peut prendre une valeur de 20 pour les rayonnements α . Les valeurs de ce coefficient suivent la tendance suivante :

$$w_\gamma < w_\beta < w_p < w_{neutrons} < w_\alpha < w_{ionslourds} \quad (10.3)$$

La nature des tissus est prise en compte au travers de la dose efficace (E) exprimée également en sieverts. La dose efficace correspond à la dose équivalente corrigée par un facteur de pondération (w_t) qui reflète la sensibilité des tissus au rayonnement :

$$E = H.w_t \quad (10.4)$$

Si lors d'une même irradiation, plusieurs organes sont visés, la dose efficace correspond à la somme des doses efficaces pour ces différents organes. L'équation 10.5 donne l'exemple d'une irradiation du cerveau et de la thyroïde.

$$E = H_{cerveau}.w_{cerveau} + H_{thyroïde}.w_{thyroïde} \quad (10.5)$$

Selon la commission internationale de protection radiologique (CIPR), les coefficients de pondération pour les différents organes du corps humain sont les suivants [Valentin, 2007] :

Plusieurs sources d'exposition à des faibles doses peuvent être décrites dans notre environnement. Il existe dans la nature des sources de rayonnement naturelles, telles que le rayonnement cosmique ou celui émis par le Radon que l'on trouve dans les régions Bretagne et Auvergne. Les actes de radiologies qui utilisent des rayonnements X sont des sources artificielles de faibles doses. Trois modèles sont utilisés afin de prédire les effets de ces faibles doses (Figure 10.1).

Tissu ou organe	w_t d'après la CIPR 2007
Gonades	0.08
Moelle osseuse rouge	0.12
Côlon	0.12
Poumon	0.12
Estomac	0.12
Sein	0.12
Foie	0.04
Oesophage	0.04
Thyroïde	0.04
Peau	0.01
Surface des os	0.01
Glandes salivaires	0.01
Cerveau	0.01

TABLE 10.1 – Coefficients de pondération préconisés par la CIPR en 2007 pour les différents organes du corps humain

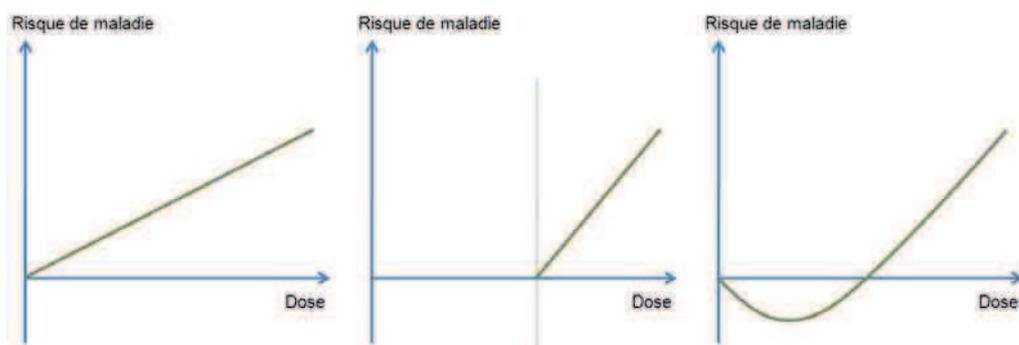


FIGURE 10.1 – Modèle prédictif de pathologies liées à une irradiation

Parmi ces trois modèles, aucun n'est reconnu comme modèle de référence. Le premier indique un effet négatif dès les plus basses irradiations, le second indique un effet seuil en dessous duquel aucun effet n'est constaté et enfin le troisième indique un effet bénéfique de l'irradiation en dessous d'une certaine valeur.

En l'absence de consensus, le premier modèle est privilégié par principe de précaution (principe "As Low As Reasonably Achievable" : ALARA).

10.3 Méthodes d'évaluation de la dose

10.3.1 Evaluation de la dose par simulation

Des méthodes de simulation permettent de modéliser la trajectoire et l'interaction des particules dans la matière. Elles permettent ainsi de calculer la dose. C'est par une approche statistique que les lois régissant les interactions entre les électrons et les photons avec la matière peuvent être modélisées. Les méthodes sta-

tistiques de Monte Carlo, permettant entre autres de décrire des processus naturels, biologiques ou bien physiques, sont à la base de code de calcul pour la simulation de dose. Parmi les codes de calcul développés, on retrouve :

- EGS (Electron Gamma Shower) permet la simulation de dose pour des hautes énergies de particules. Ce code dans sa version 4 est aujourd'hui la référence pour les calculs de dose en radiothérapie.
- MCNP (Monte-Carlo Neutron Photon) permet la simulation des trajectoires des particules neutres (photons et neutrons), des électrons (positifs et négatifs) et de certaines particules lourdes chargées [Breisemeister, 2000].
- PENELOPE simule les cascades électron-photon pour un domaine d'énergie allant de 1 KeV (100 eV pour les électrons et positrons) à quelques centaines de MeV dans des matériaux de base dont le numéro atomique est compris entre 1 (hydrogène) et 98 (californium).
- GEANT (GEometry ANd Tracking) a été développé par la communauté de physique des hautes énergies au CERN(Centre Européen pour la Recherche Nucléaire) depuis plus de 25 ans. Sa version la plus récente GEANT4 est très générique. Elle permet de simuler une très large gamme de modèles physiques, pour de nombreuses particules et de nombreuses énergies.
- le projet GATE

Le projet GATE a été initié en 2001 par une communauté de scientifique français dans l'objectif de développer une plateforme dédiée aux simulations Monte Carlo en médecine nucléaire. Le code GATE dans sa version V6 est un code spécifique basée sur GEANT4 qui supporte la simulation numérique pour la tomographie par émission (PET et SPECT), la tomographie par transmission (CT)et la radiothérapie [Jan et al., 2011].

GATE, soutenu aujourd'hui par une large communauté internationale, est devenu un outil incontournable pour le développement des matériels d'imagerie médicale, l'optimisation des protocoles d'acquisitions et le développement et l'évaluation des méthodes de reconstruction tomographique. Il est également utilisé pour le calcul de dose par simulation [Visvikis et al., 2006] [Ferrer et al., 2007] [Taschereau and Chatziioannou, 2007] [Thiam et al., 2008] qui peut être basée sur des géométries simples, sur des fantômes (modèles simplifiés du corps) ou sur des données réelles.

La simulation basée sur les données réelles consiste à introduire en entrée du code de calcul des données volumiques acquises en tomographie X. Les valeurs d'atténuation sont converties et prises en compte dans la simulation pour chaque voxel. Le module tHis, développé initialement au Creatis et intégré dans GATE V6, se base sur les valeurs Hounsfield (HU) pour définir les propriétés des matériaux simulés. L'avantage de cette méthode est d'être spécifique au patient.

10.3.2 Méthodes de mesure de la dose

La chambre d'ionisation Le principe de la chambre d'ionisation est de détecter les électrons générées dans un milieu soumis à un rayonnement ionisant. Le milieu contenu dans la chambre est gazeux pour la plupart des ces détecteurs. Sous l'effet d'un champ électrique, les électrons et les ions induits par l'irradiation ne peuvent se recombiner et diffusent vers les électrodes. Ces charges induisent des courants

qui sont détectés et convertis en signal électrique (Figure 10.2). Dans un cas idéal, l'intensité de ce courant est proportionnelle au nombre de particules ayant interagies dans le milieu gazeux. Ce type de détecteur présente une bonne linéarité de mesure de dose.

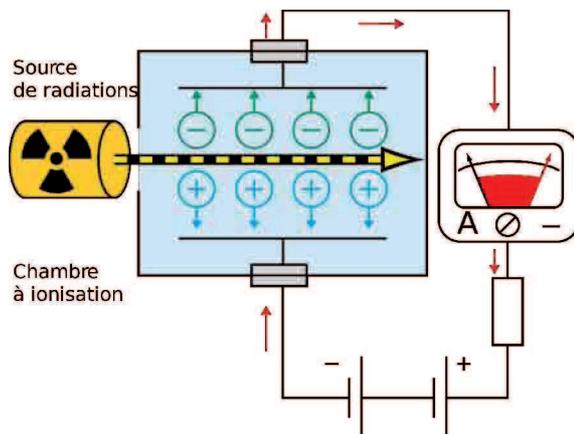


FIGURE 10.2 – Schéma d'une chambre d'ionisation

Le film radiologique Le film radiologique est constitué de grains de bromure d'argent ($AgBr$) qui sont fixés en atomes d'argent sous l'effet d'un rayonnement ionisant. Comme pour un film photographique, il doit ensuite subir un développement physico-chimique. Cette étape permet de révéler un noircissement du film qui reflète la dose absorbée. Afin d'obtenir une valeur quantitative de la dose, la densité optique du noircissement est mesurée à l'aide d'un photodensitomètre.

Le film radiologique est fréquemment utilisé pour l'homme, en particulier pour la mesure de dose en radiothérapie. Néanmoins, ils ne sont pas équivalents à un tissu et leur réponse à la dose n'est pas linéaire (courbe en "S"). La densité optique dépend de l'énergie des photons, ce qui provoque une sur-réponse aux basses énergies. Il a également été rapporté une variation de la densité optique en fonction du débit de dose [Djouguela et al., 2005][Martens et al., 2002].

Le film radiochromique Le film radiochromique ne nécessite pas de développement. Il est constitué de couches actives qui induisent un changement de couleur du film sous l'effet du rayonnement ionisant. La dose est alors directement évaluée par la mesure de la transmission lumineuse à l'aide d'un photodensitomètre.

La plage d'utilisation de ces films est linéaire entre 0.5 Gy et 2055 Gy, et contrairement au film radiologique, ils sont équivalents à un tissu. Cependant ils sont sensibles à la température pendant et après l'irradiation et montrent une augmentation de la densité optique avec le temps. La mesure de dose doit être effectuée rapidement après l'irradiation [Klassen et al., 1997][Bazioglou and Kalef-Ezra, 2001].

Les dosimètres thermoluminescents (TLD) Le dosimètre, souvent constitué de fluorure de lithium (LiF), émet un rayonnement lumineux lorsque il est chauffé.

La mesure de la dose est effectuée par mesure de la lumière émise qui est proportionnelle à la dose absorbée.

Comme pour les films, plusieurs étapes sont nécessaires pour la mesure de dose : étape d'enregistrement de la dose dans le champ d'irradiation puis étape de lecture de la dose absorbée par le dosimètre. De plus, l'étape de lecture implique de préchauffer puis de chauffer et enfin de vider l'échantillon et ne permet pas de mesures à dose *a posteriori*.

Le LiF présente l'avantage d'avoir un numéro atomique proche de celui des tissus. La plage de linéarité pour la mesure de dose est entre 10^{-5} et 10^3 Gy avec une reproductibilité jusqu'à 2 %.

Dosimètre à luminescence optiquement stimulée (OSL) Le principe de fonctionnement de ce dosimètre est similaire à celui du TLD sauf que la luminescence nécessaire à la lecture de la dose est stimulée optiquement. Contrairement au TLD la facilité de contrôle de la source d'excitation permet de lire et de conserver une grande partie de l'information au sein du matériau. L'OSL autorise donc la relecture du dosimètre.

Ces dosimètres sont très répandues : chaque mois plus de 1300000 personnes portent ces dosimètres dans le monde.

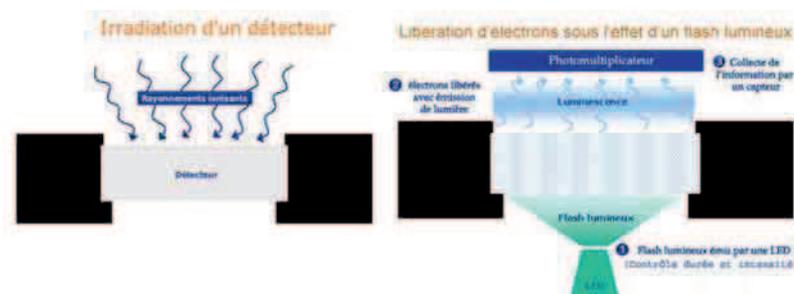


FIGURE 10.3 – Principe de fonctionnement du dosimètre de type OSL

La diode silicium Une diode silicium contient un substrat de type p avec des trous majoritaires et un substrat de type n avec des électrons majoritaires. Lors de l'irradiation les paires électrons/trous sont générées et collectées, ce qui induit un courant électrique.

La diode silicium est le composant essentiel des dosimètres opérationnels, très utilisés en dosimétrie médicale. Ils permettent une lecture quasi immédiate de la dose. Mais ils sont cependant peu sensibles aux rayonnements de faibles énergies (inférieure à 50 KeV).

Les MOSFETs Le MOSFET (Metal-Oxide Semiconductor Field Effect Transistor) est un transistor à effet champ. Comme tous les transistors, le courant qui le traverse peut être modulé par le signal appliqué à son électrode centrale nommée grille. Sous l'effet d'un rayonnement ionisant les charges induites sont piégées dans

la grille ce qui entraîne une modification de la tension de seuil du transistor qui est proportionnelle à la dose absorbée.

La réponse à la dose est linéaire entre 20 mGy et 4 Gy [Halvorsen, 2005]. Il existe des dosimètres à base de MOSFET dont la lecture est possible à distance (dosimètre sans fils).

10.4 Imagerie du petit animal et dosimétrie

Différentes méthodes de dosimétrie ont été utilisées pour évaluer la dose délivrée lors d'un acte d'imagerie de type micro-CT .

Des mesures directes du débit de dose dans le champ d'irradiation ont été effectuées avec une sonde à chambre à ionisation [Goertzen et al., 2002] [Cavanaugh et al., 2004] [Klinck et al., 2008] ou avec des dosimètres de type MOSFET [Badea et al., 2008]. Dans les deux cas la mesure est effectuée dans le champ d'irradiation à l'intérieur d'un fantôme représentant le corps de la souris dans les conditions d'un acte d'imagerie. Ce type de mesure permet une évaluation du débit de dose dans la zone à imager mais pas directement de la dose reçue par l'animal.

Un autre type de mesure à l'aide de "Thermo Luminescent Dosimeter" (TLD) permet une mesure de la dose dans des régions d'intérêts. Les TLD sont placés *ex vivo* dans des zones d'intérêt dans le corps de l'animal avant le scan, puis sont retirés afin de procéder à la mesure [Obenaus and Smith, 2004] [Carlson et al., 2007] [Figuroa et al., 2008]. Cette méthode est réalisée *ex vivo* et nécessite un protocole de calibration complexe et une sélection des TLD en fonction de leur précision.

Pour le petit animal, les méthodes d'évaluation par calculs et par simulation ont également été employées pour la dosimétrie d'un acte d'imagerie [Zhou and Boone, 2008]. Ces méthodes de calculs sont basées sur des codes calcul de type Monte Carlo [Boone et al., 2004]. Elles permettent une simulation basée soit sur un fantôme simplifié de la souris [Taschereau et al., 2006] soit sur l'image 3D obtenue par imagerie CT ("Voxel Based Simulation") [Stabin et al., 2006] [Bitar et al., 2007] [Taschereau and Chatziioannou,

10.5 Dosimétrie expérimentale avec chambre d'ionisation lors d'un examen de micro-CT

Nous avons voulu quantifier l'irradiation que subit un échantillon lors d'un examen d'imagerie 3D en micro-CT. Des mesures de dose ont été réalisées avec une chambre d'ionisation afin d'évaluer la dose reçue par un échantillon lors d'un scan 3D utilisant le micro-CT Viscom 8060. Cette étude a pu être réalisée dans le cadre d'une étude de faisabilité visant à utiliser l'imagerie tomographique à rayons X du fœtus de rat dans les études de toxicologie/tératologie (Figure 10.4).

Pour valider l'intérêt du micro-CT par rapport aux techniques de références utilisées en tératologie (transparisation, étude en microscopie avec alizarine ...), les critères d'évaluation ont été basés sur la qualité des images 3D, la capacité à détecter

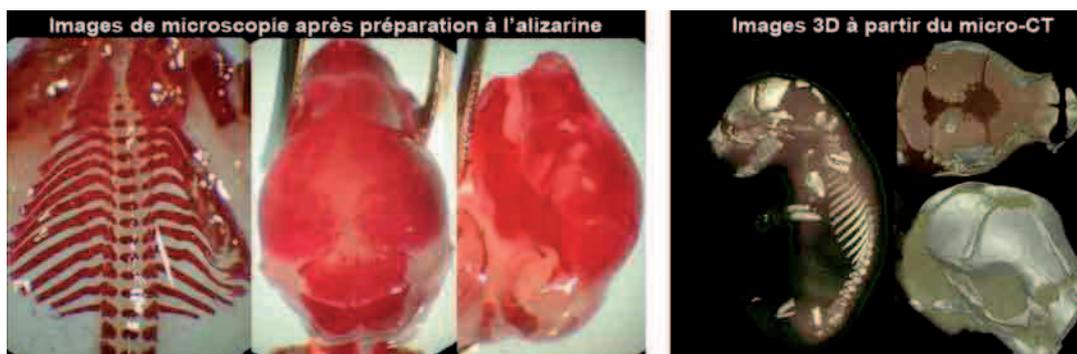


FIGURE 10.4 – Illustration de la problématique visant à remplacer les méthodes optiques par le micro-CT dans les études de tératologies. Images obtenues en microscopie avec préparation à l'alizarine (à gauche) et images 3D obtenues après numérisation sur le micro-CT Viscom 8060 (à droite) sur des foetus de rat

les structures en cours de minéralisation, sur le temps d'acquisition et de traitement des données mais aussi sur la dose absorbée par l'échantillon pendant l'imagerie. C'est dans cette optique que nous avons effectué des mesures de dose dans le faisceau d'irradiation dans les conditions utilisées pour l'imagerie 3D.

10.5.1 Protocole expérimental

10.5.1.1 La chambre d'ionisation

Nous avons utilisé une sonde à chambre d'ionisation qui permet d'obtenir deux informations : une mesure continue de la valeur de débit de dose et une mesure de la dose absorbée (intégration de la mesure de débit de dose sur la durée d'une acquisition). La forme de cette sonde est de type crayon (Figure 10.5).



FIGURE 10.5 – Chambre à ionisation de type crayon pour la mesure d'un débit de dose

10.5.1.2 Irradiations avec le micro-CT VISCOM 8060

Les mesures de dose ont été réalisées pour des acquisitions 3D sur le micro-CT VISCOM 8060 avec les paramètres mis en évidence pour l'imagerie des foetus. Afin d'obtenir la meilleure résolution, la position de l'objet au sein de l'ensemble source/détecteur a été choisie en ajustant au mieux la taille de l'échantillon sur le champ de vue. La diminution de la distance entre l'objet et la source permet

d'augmenter la magnification (et la résolution) mais implique une dose délivrée plus élevée puisque la dose varie en fonction du carré de la distance source/objet.

Un des objectifs lors des tests d'imagerie était de mettre en évidence des paramètres d'acquisition pouvant être mis en pratique sur d'autres appareils. Des tests, d'abord réalisés pour l'imagerie d'un fœtus, ont permis d'isoler certains paramètres d'acquisitions comme le courant, le temps d'intégration, le nombre d'images moyennées par pas de rotation ou encore l'angle total de rotation. La liste des acquisitions réalisées pour les tests de mesure de dose et les paramètres correspondants sont indiquées dans le Tableau 10.2.

Acquisition	Tension (kV)	Courant (μA)	Temps d'in- tégra- tion	Pas de rota- tion	180/360	Nombre de frames	Durée
Sonde 1	60	450	2000ms	0.5°	180°	1 frame	1455sec
Sonde 2	50	450	2000ms	1°	180°	1 frame	726sec
Sonde 3	60	450	2000ms	1°	180°	1 frame	726sec
Sonde 4	40	450	2000ms	1°	18°0	1 frame	726sec
Sonde 5	30	450	2000ms	1°	180°	1 frame	726sec

TABLE 10.2 – Paramètres des acquisitions réalisées avec le micro-CT VISCOM 8060

10.5.2 Résultats des mesures de dose

Les résultats de dosimétrie obtenus avec la chambre d'ionisation montrent une augmentation la dose absorbée et du débit de dose en fonction de la tension d'accélération de la source X (Figure 10.6).

Les relevés réalisés lors de cette expérimentation correspondent à des valeurs de dose assez élevées. Par exemple, à 60 kV la dose de l'examen 3D correspond à la moitié de la dose $LD_{50/50}$ (dose évaluée à 5Gy pour laquelle 50% des souris meurent après 50 jours). La mesure la plus basse (pour 30 kV) est légèrement inférieure à 1Gy.

Les paramètres choisis pour cette expérimentation sont pertinents au regard de la qualité de l'image mais semblent induire en retour une irradiation trop élevée. Dans le cadre d'une étude longitudinale, ces paramètres ne pourraient pas être utilisés pour l'imagerie *in vivo*.

10.6 Autre méthode : dosimétrie par RPE

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une technique de mesure physique par spectroscopie permettant l'analyse des systèmes paramagnétiques, c'est à dire ayant au moins un électron non apparié. Ces systèmes correspondent à des

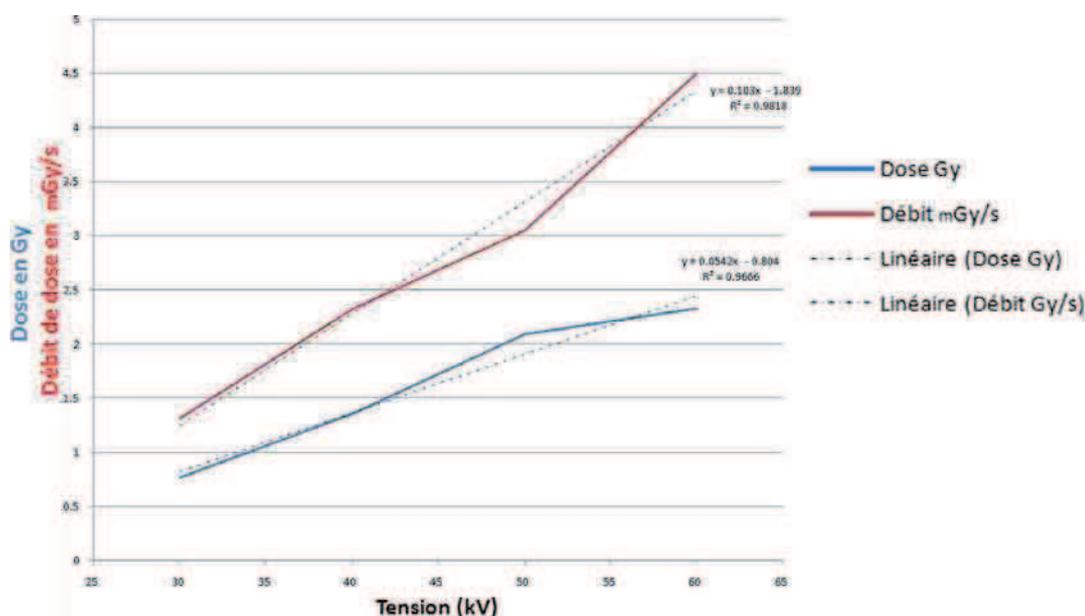


FIGURE 10.6 – Résultats des mesures de dose avec variation de la tension entre 30 et 60 kV

métaux de transition, des sels ou encore des radicaux libres. Parmi les applications importantes de la RPE, on trouve : l'analyse des métaux de transition, la datation archéologique, la dosimétrie et l'analyse des radicaux oxygénés dans des tissus biologiques vivants (in vitro et in vivo).

10.6.1 Principe de la RPE

La RPE est une technique proche de la résonance magnétique nucléaire (RMN). La RMN repose sur l'étude des spins des protons tandis que la RPE concerne l'analyse des spins des électrons.

L'électron a un mouvement de rotation sur lui-même caractérisé par le nombre quantique de spin S . En général les électrons forment dans les atomes des paires de spins opposés de telle sorte que le moment magnétique total soit nul. Dans le cas le plus simple et le plus général, les électrons non appariés ont un spin de $\frac{1}{2}$. Selon l'effet Zeeman, les électrons soumis à un champ magnétique peuvent prendre les valeurs propres de spin $+\frac{1}{2}$ ou $-\frac{1}{2}$ correspondant aux deux orientations possibles du spin dans un champ magnétique : parallèle ou anti-parallèle (Figure 10.7). A ces deux orientations correspondent deux valeurs de niveaux d'énergie : le niveau avec le spin $-\frac{1}{2}$ a une énergie plus basse que celui du spin $+\frac{1}{2}$.

Une transition entre ces deux niveaux d'énergie est possible si la condition de résonance suivante est respectée :

$$\hbar\nu = g\mu_b B, \quad (10.6)$$

avec ν la fréquence de résonance, \hbar la constante de Planck, g le "facteur g " qui est

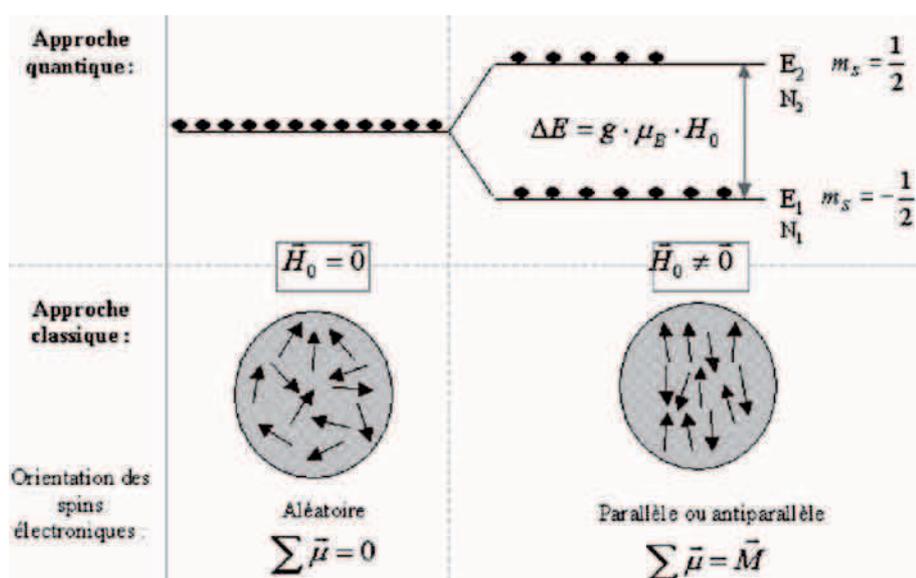


FIGURE 10.7 – Organisation des niveaux d'énergie pour un spin électronique $s = \frac{1}{2}$ en présence d'un champ magnétique

approximativement égal à 2 pour un spin $\frac{1}{2}$ et μ_b le magnétron de Bohr. Il faut remarquer que dans cette formule la relation entre le champ magnétique B et la fréquence de résonance est linéaire.

Le principe de la RPE consiste à induire puis analyser une transition entre ces deux niveaux d'énergie. Cette transition est provoquée par l'absorption d'une onde hyperfréquence (micro-onde). Les fréquences utilisées et les bandes correspondantes sont illustrées dans le tableau 10.3.

Bande	Champ magnétique	Fréquence (GHz)
L	43 mT	1.2
S	114 mT	3.2
X	336 mT	9.4
K	892 mT	25
Q	1.249 T	35

TABLE 10.3 – fréquences de la micro-onde utilisées en RPE pour forcer une transition

La détection de l'absorption de cette micro-onde donne l'information de la quantité de spin. La dérivée de cette absorbance est le signal RPE (Figure 10.8).

Chaque espèce radicalaire a une signature RPE spécifique, qui dépend de sa nature mais également de son environnement. Le signal RPE est caractérisé par sa largeur pic à pic δH , l'amplitude pic à pic A et la valeur de la fréquence de résonance H_r (Figure 10.9).

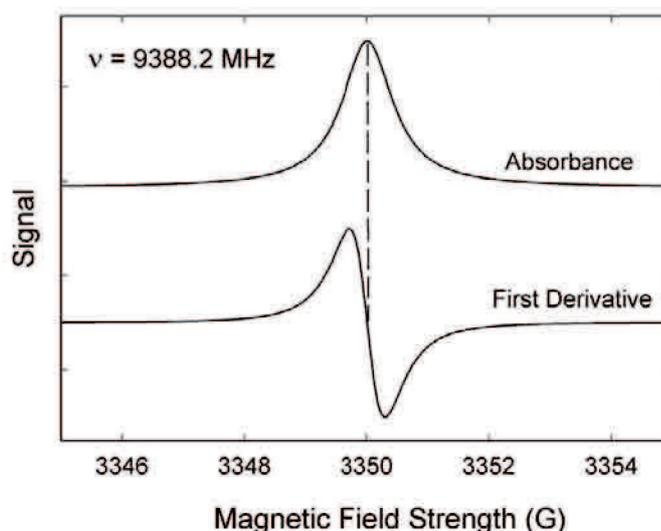


FIGURE 10.8 – Signal de l'absorbance et sa dérivée qui constitue le spectre RPE

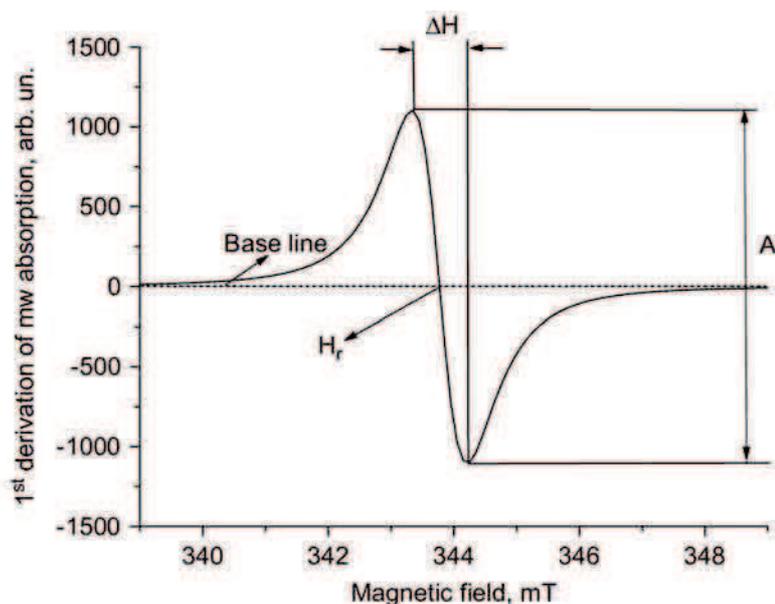


FIGURE 10.9 – Caractéristiques d'un spectre RPE

L'amplitude A est proportionnelle à la quantité de spins dans la zone d'analyse. Elle permet donc d'avoir une mesure quantitative très précise du nombre de radicaux libres.

A titre de comparaison avec la RMN, le moment magnétique de l'électron est 658 fois plus fort que celui d'un proton. En conséquence, la puissance du champ magnétique externe nécessaire à la séparation des états de spins en deux énergies est 658 fois plus faible que pour les protons. Pour une fréquence de micro-onde de 200 MHz, le champ magnétique nécessaire en RMN serait de 4.7T alors qu'en RPE il suffit d'un champ magnétique de 7 mT. De plus, les temps de relaxation T_1 et T_2 , qui varient entre 1.0 et 0.1 sec pour la RMN, sont compris entre $5 \mu s$ et $10 ns$ pour la RPE.

10.6.2 Dosimétrie RPE dans les tissus biologiques

La dosimétrie par RPE est basée sur l'analyse des radicaux libres de très longues durée de vies, créés par un rayonnement ionisant dans la matrice des dents, des os, de la kératine des ongles et dans les cheveux. Lors des interactions avec la matière, les rayonnements ionisants induisent la création d'espèces chimiques avec des électrons non-appariés. Ces espèces chimiques qui sont des radicaux libres sont générés en quantité proportionnelle à la dose d'irradiation. Dans les systèmes aqueux, ces radicaux réagissent immédiatement avec le milieu environnant et disparaissent. Cependant il est également possible qu'ils soient rendus stables indéfiniment si ils sont générés dans certains tissus biologiques appropriés : c'est le cas de l'hydroxyapatite qui est le composant minéral des dents et des os. Lors de l'irradiation, les impuretés carbonate présentent au sein de la structure cristalline d'hydroxyapatite sont converties en radical CO_2^- qui reste figé au sein de la matrice indéfiniment [Lund et al., 2002] [Orsega and Corvaja, 1977] [Ovenall and Whiffen, 1961] [Supe et al., 1986]. Ce phénomène, identifié dans les dents et l'os depuis plus de 50 ans [Gordy et al., 1955] [Swartz et al., 1965], a été utilisé avec succès pour la mesure de dose rétrospective.

Cette méthode a d'abord été mise en oeuvre sur des pièces isolées telles que des os ou des dents. La dent est un site privilégié car les électrons non-appariés présents dans l'émail (composée à plus de 95% d'hydroxyapatite) y présentent une grande stabilité. Outre le fait d'offrir le signal RPE le plus intense, l'émail est le tissu biologique qui a la meilleure réponse de la dose absorbée : loi linéaire entre 10 mGy et 10 kGy (Figure 10.10). L'émail constitue donc la meilleure sonde de mesure biologique existante.

Dans les nombreuses études qui portent sur l'évaluation de la dose chez des patients après des accidents nucléaires, les doses mesurées peuvent atteindre quelques dizaines de Gy. Dans ces études, la sensibilité moyenne de mesure de la dosimétrie par RPE est de 0.5 Gy. En utilisant l'émail comme sonde de mesure, ??? ont rapportés une sensibilité de 0.1 Gy. Avec le développement récent d'appareils RPE plus basses fréquences pour la mesure in vivo, des études ont pu être menées sur des patients et non plus sur des échantillons isolés [Schwarz et al., 2010]. Ce protocole permet une mesure directement dans la bouche des patients mais présente une sensibilité plus faible.

Dans l'ensemble des travaux de dosimétrie par RPE menés jusqu'à présent, les doses étudiées ont deux caractéristiques :

- elles représentant des valeurs d'irradiation très intenses (plusieurs Gy)
- elles sont induites par plusieurs types de rayonnements ionisants simultanés : rayons X, gamma, neutrons ou encore de particules

	Matériau	Linéarité en dose (Gy)	Fading (20°C)	Référence
Matériaux biologiques	Email dentaire	0.01-10000	-	Ikeya, 1993
	Dentine	0.05-8	-	Haskell et al., 1995
		0.1-1000		
	Os	0.5-30	-	Carracelli and Terrie, 1986 Panepucci et al., 1972
		2-200		
Ongle	10-150 1.8-100	Important	Dalgarno and McClymont, 1989 Calas, 2005	
Cheveu	2.9-25	Important	Calas, 2005	
Matériaux issus de l'environnement	Coton	3-10 ³	Important	Kamenopoulou, 1988
	Laine, lin	Peu radiosensible		
	Cuir	10-150	Important	Dalgarno and McClymont, 1989
	Bois d'allumette	10-150	Important	Dalgarno and McClymont, 1989
	Carte de crédit	10-150	Important	Dalgarno and McClymont, 1989
	Saccharose	0.5-80000	-	Yordanov et al., 2002
Coquille d'oeuf	3-10000	-	Engin and Demirtas, 2004	

FIGURE 10.10 – Propriétés dosimétriques des matériaux lus par RPE [Herve, 2006]

10.7 Etude expérimental : évaluation par RPE de l'irradiation induite en tomographie X

La dosimétrie par spectroscopie RPE est reconnue comme une méthode de référence chez l'homme. Chez le petit animal, des applications de la RPE en spectroscopie et également en imagerie ont été mises en évidence [He et al., 2002] [Hirayama et al., 2005] [Matsumoto et al., 2008]. Cependant, la dosimétrie par RPE n'a encore jamais été appliquée chez le petit animal.

Les récentes avancées des appareils RPE, notamment en terme de sensibilité et de gradient pour l'imagerie, permettent aujourd'hui d'envisager la dosimétrie par RPE chez le petit animal.

Notre objectif a été d'évaluer la faisabilité de la dosimétrie par RPE pour des doses relativement faibles correspondant à un examen d'imagerie X chez le petit animal.

10.7.1 Protocole expérimental

Lors de nos tests, les échantillons ont été soit des souris congelées entières soit des pièces osseuses prélevées avec leur tissu environnant (muscle, tendon,).

Nous avons utilisé le micro-CT Viscom 8060 pour délivrer une irradiation sur ces échantillons. Les échantillons placées dans le micro-CT ont été soumis au faisceau de rayons X émis par la source X dans les mêmes conditions qu'un acte d'imagerie. Pour la préparation des échantillons pour l'analyse par RPE, les pièces osseuses ont

été isolées par dissection et nettoyées afin de supprimer les tissus mous susceptibles de contenir de l'eau et d'introduire un signal parasite.

Pour l'analyse par RPE nous avons utilisé le spectromètre en bande X de la plateforme RPE de l'UFR Biomédicale des Saints-Pères (Paris).

La plateforme RPE à l'UFR Biomédicale des Saints-Pères, Paris Le laboratoire de Chimie et de Biologie Pharmacologiques et Toxicologiques, Unité Mixte de Recherche (UMR) 8601 CNRS et Université Paris Descartes, a lancé en 2006 un projet pour l'utilisation de la RPE pour le vivant, y compris en mode imagerie. L'équipe dirigée par Yves Michel Frapart s'est doté de 2 appareils RPE :

- un appareil d'imagerie du petit animal *in vivo* : le Bruker Elexsys E540 est dédié à l'imagerie RPE *in vivo* sur la souris avec une résolution de $100\ \mu\text{m}$. C'est le premier appareil en France permettant de faire de l'imagerie RPE 3D+ en bande L. L'imageur est doté d'un gradient de champ de $4\ \text{mT/cm}$ et d'une cavité 23 mm ou 36 mm, ou de boucles de surface
- un appareil de microscopie par RPE : le spectromètre Bruker Elexsys E500 (Figure 10.11) permet l'imagerie *ex vivo* à une échelle de $10\text{-}20\ \mu\text{m}$. Il comprend un système en bande X avec un gradient de champ de $22\ \text{mT/cm}$ et une cavité de type TM. C'est cet appareil qui a été utilisé lors de nos expérimentations



FIGURE 10.11 – Bruker Elexsys E540 avec un spectromètre en bande X

10.7.2 Test 1 : évaluation de la réponse du signal RPE induit par une irradiation

La dosimétrie RPE n'ayant jamais été décrite chez le petit animal, notre première investigation a été l'évaluation de la faisabilité de la mesure d'un signal RPE de l'irradiation. Pour cela nous nous sommes basé sur des travaux de dosimétrie par RPE avec l'émail de dents humaines. La Figure 10.12 illustre le spectre RPE obtenu avec un spectromètre en bande L sur de l'émail humaine.

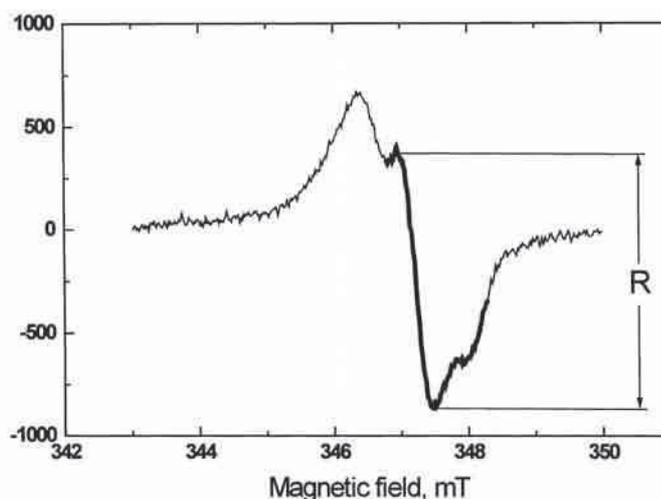


FIGURE 10.12 – Exemple de spectre RPE de l'émail d'une dent ayant subi une irradiation [Romanyukha et al., 1999]

Pour ce test, nous avons cherché à reproduire cette forme de spectre caractéristique du signal induit par un rayonnement ionisant. Pour cela, nous avons privilégié les conditions les plus favorables en choisissant la mandibule comme site d'étude puisqu'elle contient une grande proportion d'émail.

La partie supérieure du corps d'une souris congelée a été soumise à un rayonnement X lors d'acquisitions avec le micro-CT VISCOM 8060. Afin d'éviter tout signal parasite induit par l'eau, seules les mandibules (os et dents) ont été conservées après dissection pour l'analyse.

Le spectromètre en bande X Bruker Elexsys E540 a été utilisé pour l'analyse de la mandibule, il offre une meilleure sensibilité qui est plus adaptée à la très petite taille de nos échantillons. La Figure 10.13 illustre le spectre du signal de la mandibule irradiée.

On remarque que ce spectre présente une forme très similaire au spectre caractéristique de l'émail (Figure 10.12). La quantité de matière plus faible (à cause de la taille de la dent humaine comparée à la dent de souris) est palliée par la sensibilité accrue de l'appareil en bande X

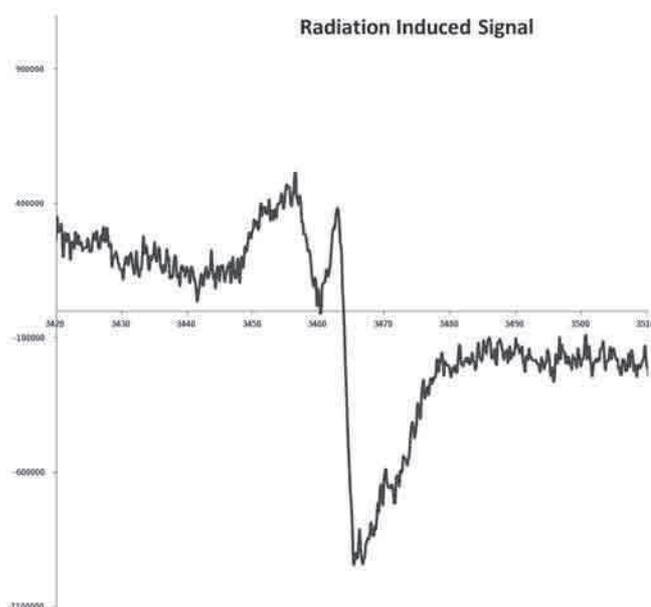


FIGURE 10.13 – Spectre RPE obtenu sur une mandibule de souris ayant subi l'irradiation d'un acte d'imagerie en micro-CT

10.7.3 Test 2 : évolution du signal avec la dose sur la mandibule

Afin de confirmer les résultats du test précédent, qui semblent indiquer qu'un signal induit par l'irradiation aux rayons X est détectable en RPE bande X, nous avons utilisé des mandibules ayant été soumises à des irradiations différentes.

Les deux héli-mandibules ont été prélevées sur une souris. La mandibule de gauche a été soumise à une irradiation sur le micro-CT Viscom 8060 lors d'une acquisition de 15min et celle de droite pendant 60min. L'irradiation de la mandibule de gauche a été 4 fois plus courte, la dose reçue par cette mandibule est donc en théorie 4 fois plus faible [Ford et al., 2003]. Les deux mandibules ont ensuite été analysées par RPE en bande X avec le protocole mis en évidence lors du premier test. La Figure 10.14 illustre la superposition du signal de ces deux mandibules.

La hauteur pic à pic du signal donne une mesure quantitative du signal RPE. Ce signal, qui est donné par le nombre de trous électroniques (défauts créés par la radiation ionisante), montre clairement une augmentation de son intensité en fonction de la dose théorique. La mesure de cette intensité révèle un facteur 2 entre le signal des deux mandibules.

10.7.4 Test 3 : évolution du signal avec la dose sur le fémur

Nous avons choisi pour nos premiers tests le site de la mandibule car elle contient une grande partie d'émail. Ce site était donc le plus favorable puisque

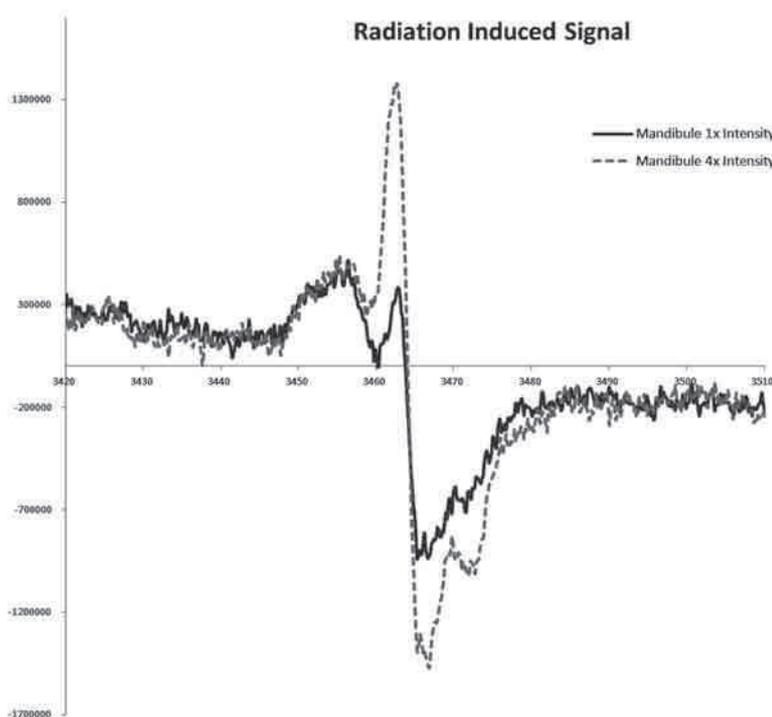


FIGURE 10.14 – Superposition des spectres RPE de deux mandibules ayant reçues des irradiations différentes

l'émail doit en théorie offrir le meilleur signal RPE. Nous avons voulu tester la sensibilité sur un autre site osseux mais qui ne contient pas d'émail et qui est donc moins favorable pour la dosimétrie.

Un protocole expérimental identique à celui du test précédent à été utilisé sur des fémurs. La Figure 10.15 illustre les deux signaux RPE induits par l'irradiation de deux fémurs avec des doses différentes.

On distingue sur ces spectres la forme caractéristique du signal induit par une irradiation comme sur la Figure 10.13. On remarque cependant que l'intensité du signal est plus faible que pour la mandibule alors que les irradiations ont été identiques (l'irradiation 1x a été réalisée avec exactement les mêmes conditions pour le fémurs et la mandibule). Ce signal est d'autant moins mis en évidence que de nombreux signaux parasites sont visibles.

Ces résultats montrent que le fémur permet une lecture plus complexe de la dose d'irradiation, ce qui confirme que mandibule et en particulier l'émail est un site privilégié pour la dosimétrie.

10.7.5 Test 4 : imagerie de la dose

L'équipe de Yves Frappart travaille étroitement avec le constructeur des appareils de RPE (Bruker) pour le développement et l'amélioration des caractéristiques des spectromètres. Par exemple, les gradients de l'appareil en bande X sont des prototypes permettant un fonctionnement en mode imagerie avec une haute sensibilité.

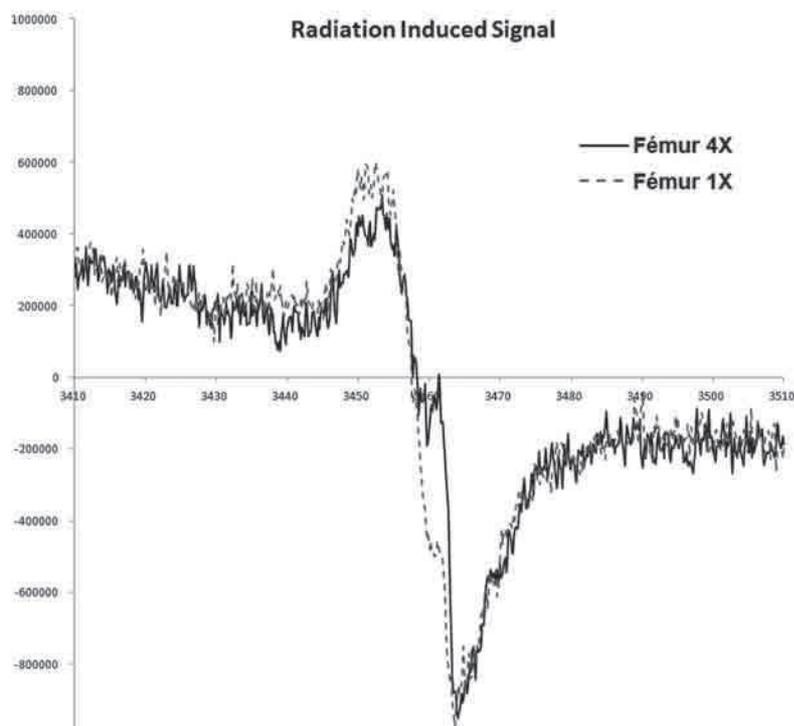


FIGURE 10.15 – Superposition des spectres RPE de deux fémurs ayant reçues une irradiation simple (1x) et une irradiation quatre fois plus longue (4X)

Nous avons utilisé ces gradients 2D pour établir une cartographie du signal de l'irradiation au sein de la cavité. Pour cette acquisition, une mandibule a été positionnée perpendiculairement à l'axe de rotation du champs de gradients, dans l'objectif d'obtenir une image de projection du profil de la mandibule. La Figure 10.16 illustre l'image du signal induit par l'irradiation et reconstruit en 2D.

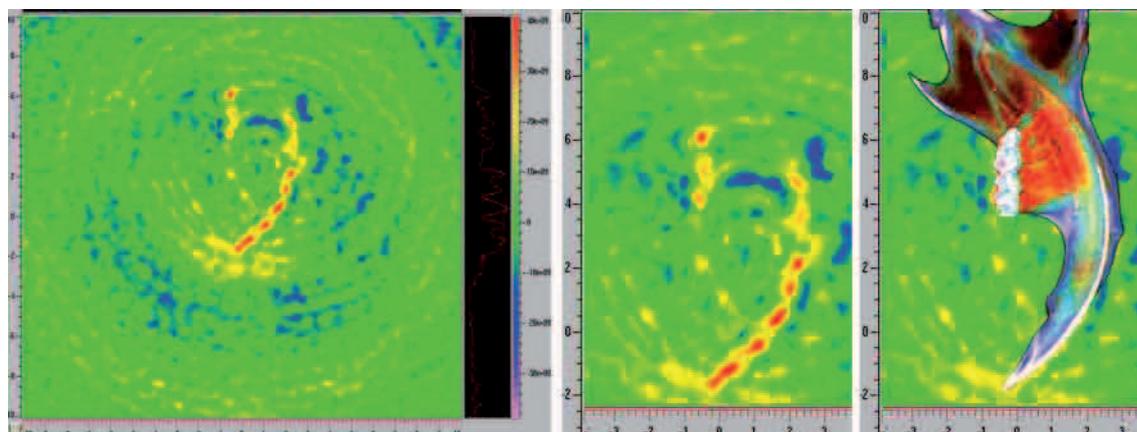


FIGURE 10.16 – Image RPEi 2D de la distribution spatiale du signal induit par l'irradiation (à gauche) et superposition avec une image de mandibule obtenue en micro-CT (à droite)

Sur l'image brute, on peut remarquer que le niveau de bruit est important. On distingue cependant quelques zones avec des valeurs très élevées de l'intensité du signal (en rouge). Nous avons superposé cette image avec une vue de profil de la mandibule obtenue à partir du micro-CT. Cette superposition suggère que l'intensité maximale du signal se situe au niveau de l'émail des molaires et de l'incisive.

10.7.6 Conclusion sur la dosimétrie par RPE

Notre approche a permis de donner des résultats préliminaires pour la dosimétrie par RPE chez le petit animal.

Nous avons mis en évidence un protocole qui a permis l'identification du signal RPE induit par un rayonnement ionisant sur l'émail de la mandibule.

Comme chez l'humain, nos résultats confirment que l'émail est un tissu biologique de choix pour la dosimétrie, offrant une réponse avec un signal d'une forte intensité au regard de celui d'autres tissus minéralisés comme le fémur.

L'analyse par spectrométrie RPE est une analyse quantitative de la dose. L'étude comparative avec les deux mandibules montre que l'intensité du signal RPE varie en fonction de la quantité de radiations. Les valeurs mesurées ne montrent cependant pas le même ratio entre la dose et l'intensité du signal. La dose théoriquement quatre fois plus importante correspond à une augmentation de seulement un facteur deux de l'intensité du signal RPE. Ce résultat devra être confirmé lors d'une étude complémentaire avec une calibration précise de la dose.

Enfin, le test d'imagerie RPE a permis pour la première fois de créer une image de la distribution de l'irradiation reçue sur un échantillon biologique.

10.8 Conclusion

Les méthodes de dosimétrie classiques permettent d'évaluer la dose par des méthodes d'interactions avec le rayonnement ionisant ou par simulation. Elles donnent une information quantitative sur le rayonnement ionisant mais ne restent néanmoins qu'une appréciation indirecte de l'effet du rayonnement sur les tissus biologiques.

La dosimétrie par RPE permet une autre approche des questions radiobiologiques puisque la mesure de dose est directement "lue" dans les tissus ayant reçus l'irradiation. C'est donc le tissu biologique qui constitue la sonde de mesure comme dans notre approche avec l'émail de la mandibule. Ce qui constitue un avantage par rapport aux TLD dont la densité n'est pas la même que les tissus et qui emmagasine alors une dose différente de celle des tissus dans lequel il est placé.

De plus, cette technique offre la possibilité de cartographier la distribution du signal. C'est la seule méthode permettant de mesurer la distribution spatiale de la dose.

Notre approche a été innovante sur différents plans :

- l'utilisation de la RPE en dosimétrie chez le petit animal
- l'utilisation de la RPE pour la dosimétrie d'un acte d'imagerie
- l'imagerie de la dose

Conclusion générale

Dans ce travail de thèse nous nous sommes intéressés à l'imagerie par tomographie à rayons X et à l'analyse des images 3D pour des applications *in vivo* et *ex vivo* chez le petit animal. Les contributions de ces travaux concernent :

- le développement d'outils d'analyses spécifiques pour l'imagerie X 3D des tissus minéralisés et adipeux
- l'application des méthodologies développées à des problématiques de recherche biomédicale
- Utilisation d'une méthode originale par RPE pour la dosimétrie d'un acte d'imagerie X chez le petit animal

Développement d'outils spécifiques pour l'analyse des tissus minéralisés et adipeux L'analyse des données 3D a d'abord été qualitative avec des outils de visualisation basés sur le "volume rendering". Nous avons montré que cette approche, qui offre une vue globale de l'échantillon analysé, permet l'analyse comparative de la répartition des densités. Pour la mandibule, les défauts spécifiques de minéralisation liés à des pathologies osseuses et dentaires sont mis en évidence. Pour la calvaria, cette vue globale a permis de cibler les analyses par micro-CT et par histologie en révélant les zones d'intérêts. En appliquant cet outil à l'échelle du corps entier, nous avons montré son intérêt pour la caractérisation phénotypique de pathologies osseuses touchant le squelette.

L'imagerie de la mandibule par micro-CT couplée aux outils de visualisation 3D permet d'obtenir des coupes virtuelles de l'os alvéolaire et des dents dont l'analyse des anomalies tissulaires est comparable avec la microscopie électronique à balayage.

La segmentation en 3D de la chambre pulpaire présente l'intérêt d'obtenir une information quantitative sur le processus de fabrication de la dentine. Cette approche a été également appliquée avec succès à l'extraction du volume de l'émail des molaires de la mandibule.

Ces outils d'analyse, à la fois rapides, précis et non invasifs, apportent des informations complémentaires aux méthodes classiques longues et invasives (histologie, microscopie, analyses biochimiques,...).

Nous sommes intéressé au développement des outils permettant la quantification et la répartition des amas de graisse dans le corps de la souris. La modélisation de la courbe Hounsfield avec des mixtures gaussiennes a permis la classification des

voxels correspondant aux tissus adipeux et la détermination automatique des régions d'analyse.

La séparation de la graisse viscérale et sous-cutanée a été effectuée avec une méthode de segmentation 2D+1 en initialisant un contour manuel sur une coupe de référence et en le propageant aux coupes contiguës. En utilisant comme référence la corrélation entre les volumes de graisse et le poids total de l'animal, la validation de ces outils a permis de mettre en évidence une meilleure robustesse de la méthode par rapport aux méthodes classiques avec seuils fixes.

Applications des méthodologies développées à des problématiques de recherche biomédicale Chez des souris invalidées pour le gène de la fibromoduline, la visualisation en "volume rendering" a permis de montrer la répartition différentielle de la minéralisation de la mandibule en 3 secteurs distincts et d'identifier la partie postérieure de la mandibule et l'os alvéolaire comme les cibles osseuses principales de la déficience en fibromoduline.

La mesure du volume pulpaire a permis de montrer pour la première fois une dentinogénèse imparfaite chez ces souris.

Chez des souris invalidées pour le récepteur 2B de la sérotonine, l'imagerie CT à l'échelle du corps entier a permis de révéler des anomalies phénotypiques qui n'était pas a priori attendues chez les souris KO, plus particulièrement dans le métabolisme du tissu adipeux. L'analyse *in vivo* de ces souris a confirmé les observations réalisées sur des os isolés montrant une ostéopénie. L'étude *ex vivo* par imagerie micro-CT et par microscopie électronique à balayage démontre pour la première fois un rôle du récepteur 2B dans la formation de l'émail.

L'ensemble des résultats révèle un rôle ubiquitaire de ce récepteur dans le développement des tissus minéralisés et adipeux.

Pour l'étude du modèle murin d'ostéolyse aux particules de polyéthylène, l'imagerie X couplée aux outils d'analyses 3D a permis l'analyse qualitative et quantitative de la morphologie des tissus minéralisés de la calvaria, os plat qui n'est habituellement pas analysé. Nos résultats d'imagerie associés à ceux d'histologie et de biochimie a permis de mettre en évidence certains des mécanismes mis en jeu dans l'ostéolyse induite par les particules de PE dans les prothèses de hanche.

Utilisation d'une méthode originale par RPE pour la dosimétrie d'un acte d'imagerie X chez le petit animal Les méthodes de dosimétrie classiques permettent d'évaluer la dose par des méthodes d'interactions avec le rayonnement ionisant ou par simulation. Elles donnent une information quantitative sur le rayonnement ionisant mais ne restent néanmoins qu'une appréciation indirecte de l'effet du rayonnement sur les tissus biologiques.

Nos résultats ont permis de valider la faisabilité de cette technique pour la dosimétrie d'un acte d'imagerie chez le petit animal, application qui n'avait encore jamais été réalisée. De plus, c'est la seule méthode permettant de mesurer la distribution spatiale de la dose, en mesurant directement les effets d'un rayonnement ionisant sur les tissus. Notre approche est également innovante pour mesurer la dose induite lors d'un acte d'imagerie, potentiellement utile en clinique humaine.

En conclusion, l'utilisation de la tomographie X se révèle être une méthode de choix pour l'analyse phénotypique de l'animal de laboratoire. Il est ainsi possible de faire un suivi dans le temps des animaux et d'éviter leur sacrifice, en accord avec les directives de la Commission Européenne sur le bien-être de l'animal. Les outils d'imagerie 3D que nous avons développés représentent un nouvel apport pour la dissection virtuelle de l'animal de laboratoire, permettant l'exploration de nombreux tissus et organes et rivalisant avec les méthodes d'histologie et de microscopie électronique. L'application de ces méthodes d'imagerie pour la recherche fondamentale et pré-clinique ouvre la perspective d'une alternative nouvelle dans l'expérimentation animale.

Bibliographie

- [Al-Attar et al., 2006] Al-Attar, S. A., Pollex, R. L., Robinson, J. F., Miskie, B. A., Walcarius, R., Rutt, B. K., and Hegele, R. A. (2006). Semi-automated segmentation and quantification of adipose tissue in calf and thigh by mri : a preliminary study in patients with monogenic metabolic syndrome. *BMC Med Imaging*, 6 :11.
- [Alanentalo et al., 2010] Alanentalo, T., Harnblad, A., Mayans, S., Karin Nilsson, A., Sharpe, J., Larefalk, A., Ahlgren, U., and Holmberg, D. (2010). Quantification and three-dimensional imaging of the insulinitis-induced destruction of i-cells in murine type 1 diabetes. *Diabetes*, 59(7) :1756–1764.
- [Alanentalo et al., 2008] Alanentalo, T., Loren, C. E., Larefalk, A., Sharpe, J., Holmberg, D., and Ahlgren, U. (2008). High-resolution three-dimensional imaging of islet-infiltrate interactions based on optical projection tomography assessments of the intact adult mouse pancreas. *Journal of biomedical optics*, 13(5).
- [Ameys and Young, 2002] Ameys, L. and Young, M. (2002). Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans : novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, ehlers-danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology*, 12(9) :107R.
- [Anderson et al., 2010] Anderson, C., Rychak, J., Backer, M., Backer, J., Ley, K., and Klibanov, A. (2010). scvegf microbubble ultrasound contrast agents : a novel probe for ultrasound molecular imaging of tumor angiogenesis. *Investigative radiology*, 45(10) :579.
- [Badea et al., 2008] Badea, C. T., Wetzel, A. W., Mistry, N., Pomerantz, S., Nave, D., and Johnson, G. A. (2008). Left ventricle volume measurements in cardiac micro-ct : The impact of radiation dose and contrast agent. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 32(3) :239 – 250.
- [Barrett et al., 1976] Barrett, H., Gordon, S., and Hershel, R. (1976). Statistical limitations in transaxial tomography. *Computers in Biology and Medicine*, 6(4) :307–323.
- [Barrett and Keat, 2004] Barrett, J. F. and Keat, N. (2004). Artifacts in ct : Recognition and avoidance1. *Radiographics*, 24(6) :1679–1691.
- [Bastard et al., 2011] Bastard, C., Bosisio, M., Chabert, M., Kalopissis, A., Mahrouf-Yorgov, M., Gilgenkrantz, H., Mueller, S., and Sandrin, L. (2011). Transient micro-elastography : A novel non-invasive approach to measure liver stiffness in mice. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 17(8) :968.

- [Bays and Dujovne, 2002] Bays, H. and Dujovne, C. (2002). Anti-obesity drug development. *Expert opinion on investigational drugs*, 11(9) :1189–1204.
- [Bazioglou and Kalef-Ezra, 2001] Bazioglou, M. and Kalef-Ezra, J. (2001). Dosimetry with radiochromic films : a document scanner technique, neutron response, applications. *Appl Radiat Isot*, 55(3) :339–345.
- [Benveniste and Blackband, 2002] Benveniste, H. and Blackband, S. (2002). Mr microscopy and high resolution small animal mri : applications in neuroscience research. *Progress in Neurobiology*, 67(5) :393 – 420.
- [Bitar et al., 2007] Bitar, A., Lisbona, A., Thedrez, P., Maurel, C. S., Forestier, D. L., Barbet, J., and Bardies, M. (2007). A voxel-based mouse for internal dose calculations using monte carlo simulations (mcnp). *Physics in Medicine and Biology*, 52(4) :1013.
- [Blinn, 1982] Blinn, J. (1982). Light reflection functions for simulation of clouds and dusty surfaces. *ACM SIGGRAPH Computer Graphics*, 16(3) :21–29.
- [Bock et al., 2007] Bock, R., Hoppe, S., Scherl, H., and Hornegger, J. (2007). Beam hardening correction with an iterative scheme using an exact backward projector and a polychromatic forward projector. In *Bildverarbeitung fur die Medizin 2007*, Informatik aktuell, pages 46–50. Springer Berlin Heidelberg.
- [Boone, 2001] Boone, J. (2001). Determination of the presampled mtf in computed tomography. *Medical Physics*, 28 :356.
- [Boone et al., 2004] Boone, J., Velazquez, O., and Cherry, S. (2004). Small-animal x-ray dose from micro-ct. *Mol Imaging*, 3(3) :149–58.
- [Boyd and Lipton, 1983] Boyd, D. and Lipton, M. (1983). Cardiac computed tomography. *Proceedings of the IEEE*, 71(3) :298–307.
- [Boyd et al., 2006] Boyd, S., Moser, S., Kuhn, M., Klinck, R., Krauze, P., Müller, R., and Gasser, J. (2006). Evaluation of three-dimensional image registration methodologies for <i>in vivo</i> micro-computed tomography. *Annals of Biomedical Engineering*, 34 :1587–1599. 10.1007/s10439-006-9168-7.
- [Breismeister, 2000] Breismeister, J. (2000). Mcnp (4c) a general monte carlo n-particle transport code, report : La-13709-m. *Los Alamos National Laboratory, Ed.*
- [Brennan et al., 2005] Brennan, D. D., Whelan, P. F., Robinson, K., Ghita, O., O’Brien, J. M., Sadleir, R., and Eustace, S. J. (2005). Rapid automated measurement of body fat distribution from whole-body mri. *AJR Am J Roentgenol*, 185(2) :418–423.
- [Caban and Rheingans, 2008] Caban, J. and Rheingans, P. (2008). Texture-based transfer functions for direct volume rendering. *IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics*, pages 1364–1371.
- [Cao et al., 2009] Cao, G., Calderon-Colon, X., Wang, P., Burk, L., Lee, Y., Rajaram, R., Sultana, S., Lalush, D., Lu, J., and Zhou, O. (2009). A dynamic micro-ct scanner with a stationary mouse bed using a compact carbon nanotube field emission x-ray tube. In *Proceedings of SPIE*, volume 7258, page 72585Q.

- [Carlson et al., 2007] Carlson, S. K., Classic, K. L., Bender, C. E., and Russell, S. J. (2007). Small animal absorbed radiation dose from serial micro-computed tomography imaging. *Mol Imaging Biol*, 9(2) :78–82.
- [Cavanaugh et al., 2004] Cavanaugh, D., Johnson, E., Price, R., Kurie, J., Travis, E., and Cody, D. (2004). In vivo respiratory-gated micro-ct imaging in small-animal oncology models. *Molecular Imaging*, 3(1) :55–62.
- [Chatziioannou et al., 1999] Chatziioannou, A., Cherry, S., Shao, Y., Silverman, R., Meadors, K., Farquhar, T., Pedarsani, M., and Phelps, M. (1999). Performance evaluation of micropet : a high-resolution lutetium oxyorthosilicate pet scanner for animal imaging. *Journal of Nuclear Medicine*, 40(7) :1164.
- [Chen et al., 2010] Chen, Y., Wierwille, J., Roney, C., Yuan, S., Chen, C.-W., Xu, B., Griffiths, G., and Summers, R. (2010). Co-registered optical coherence tomography (oct) and fluorescence molecular imaging for gastrointestinal cancer detection. In *Biomedical Optics*, page BSuF3. Optical Society of America.
- [Cloetens et al., 1999] Cloetens, P., Ludwig, W., Baruchel, J., Dyck, D. V., Landuyt, J. V., Guigay, J. P., and Schlenker, M. (1999). Holotomography : Quantitative phase tomography with micrometer resolution using hard synchrotron radiation x rays. *Applied Physics Letters*, 75(19) :2912–2914.
- [Colas and Sharpe, 2009] Colas, J. and Sharpe, J. (2009). Live optical projection tomography. *Organogenesis*, 5(4) :129.
- [Collet et al., 2008] Collet, C., Schiltz, C., Geoffroy, V., Maroteaux, L., Launay, J., and de Vernejoul, M. (2008). The serotonin 5-ht2b receptor controls bone mass via osteoblast recruitment and proliferation. *The FASEB Journal*, 22(2) :418.
- [Contag and Ross, 2002] Contag, C. and Ross, B. (2002). It’s not just about anatomy : in vivo bioluminescence imaging as an eyepiece into biology. *Journal of magnetic resonance imaging*, 16(4) :378–387.
- [Corot, 2004] Corot, C. (2004). L’imagerie en tant qu’outil d’évaluation en toxicologie préclinique. In *Congrès de la Société Française de Toxicologie*. Société Française de Toxicologie.
- [Croteau et al., 2003] Croteau, E., Bénard, F., Cadorette, J., Gauthier, M., Aliaga, A., et al. (2003). Quantitative gated pet for the assessment of left ventricular function in small animals. *Journal of Nuclear Medicine*, 44(10) :1655.
- [De Man et al., 2000] De Man, B., Nuyts, J., Dupont, P., Marchal, G., and Suetens, P. (2000). Reduction of metal streak artifacts in x-ray computed tomography using a transmission maximum a posteriori algorithm. *Nuclear Science, IEEE Transactions on*, 47(3) :977–981.
- [Dedrick et al., 1993] Dedrick, D., Goldstein, S., Brandt, K., O’Connor, B., Goulet, R., and Albrecht, M. (1993). A longitudinal study of subchondral plate and trabecular bone in cruciate-deficient dogs with osteoarthritis followed up for 54 months.
- [Del Guerra et al., 2008] Del Guerra, A., Belcari, N., Llacer, G. L., Marcatili, S., Moehrs, S., and Panetta, D. (2008). Advanced radiation measurement techniques in diagnostic radiology and molecular imaging. *Radiation Protection Dosimetry*, 131(1) :136–142.

- [Deliolanis et al., 2007] Deliolanis, N., Lasser, T., Hyde, D., Soubret, A., Ripoll, J., Ntziachristos, V., Lesaffre, M., Jean, F., Ramaz, F., Boccarda, A., et al. (2007). Free-space fluorescence molecular tomography utilizing 360° geometry projections. *Optics Letters*, 32(4) :382.
- [Demerath et al., 2008] Demerath, E., Reed, D., Rogers, N., Sun, S., Lee, M., Choh, A., Couch, W., Czerwinski, S., Chumlea, W., Siervogel, R., et al. (2008). Visceral adiposity and its anatomical distribution as predictors of the metabolic syndrome and cardiometabolic risk factor levels. *The American journal of clinical nutrition*, 88(5) :1263.
- [der Linden et al., 2009] der Linden, A. V., Meir, V. V., Boumans, T., Poirier, C., and Balthazart, J. (2009). Mri in small brains displaying extensive plasticity. *Trends in Neurosciences*, 32(5) :257 – 266.
- [Despres et al., 2008] Despres, J., Lemieux, I., Bergeron, J., Pibarot, P., Mathieu, P., Larose, E., Rodes-Cabau, J., Bertrand, O., and Poirier, P. (2008). Abdominal obesity and the metabolic syndrome : contribution to global cardiometabolic risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(6) :1039–1049.
- [Djouguela et al., 2005] Djouguela, A., Kollhoff, R., Rubach, A., Harder, D., and Poppe, B. (2005). The schwartzschild effect of the dosimetry film kodak edr 2. *Phys Med Biol*, 50(21) :N317–N321.
- [Dobrucki and Sinusas, 2005] Dobrucki, L. and Sinusas, A. (2005). Molecular imaging. a new approach to nuclear cardiology. *The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN)[and] the International Association of Radiopharmacology (IAR),[and] Section of the Society of Radiopharmaceutical Chemistry and Biology*, 49(1) :106.
- [Du et al., 2005] Du, H., Dardzinski, B. J., O'Brien, K. J., and Donnelly, L. F. (2005). Mri of fat distribution in a mouse model of lysosomal acid lipase deficiency. *AJR Am J Roentgenol*, 184(2) :658–662.
- [Ellis, 2000] Ellis, K. J. (2000). Human body composition : In vivo methods. *Physiological Reviews*, 80(2) :649–680.
- [Ellis et al., 2007] Ellis, K. J., Grund, B., Visnegarwala, F., Thackeray, L., Miller, C. G., Chesson, C. E., El-Sadr, W., and Carr, A. (2007). Visceral and subcutaneous adiposity measurements in adults : Influence of measurement site[ast]. *Obesity*, 15(6) :1441–1447.
- [Engel and Ertl, 2002] Engel, K. and Ertl, T. (2002). Interactive high-quality volume rendering with flexible consumer graphics hardware.
- [Engelke et al., 1993] Engelke, K., Graeff, W., Meiss, L., Hahn, M., and Delling, G. (1993). High spatial resolution imaging of bone mineral using computed microtomography : Comparison with microradiography and undecalcified histologic sections. *Investigative radiology*, 28(4) :341.
- [Feldkamp et al., 1984] Feldkamp, L. A., Davis, L. C., and Kress, J. W. (1984). Practical cone-beam algorithm. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1(6) :612–619.

- [Fercher, 1990] Fercher, A. (1990). Ophthalmic interferometry. In *Proceedings of the International Conference on Optics in Life Sciences, Garmisch-Partenkirchen, Germany*, pages 12–16.
- [Ferrara et al., 2007] Ferrara, K., Pollard, R., and Borden, M. (2007). Ultrasound microbubble contrast agents : fundamentals and application to gene and drug delivery. *Annual review of biomedical engineering*, 9 :415.
- [Ferrer et al., 2007] Ferrer, L., Chouin, N., Bitar, A., Lisbona, A., and Bardiès, M. (2007). Implementing dosimetry in gate : dose-point kernel validation with geant4 4.8.1. *Cancer Biother Radiopharm*, 22(1) :125–129.
- [Figueroa et al., 2008] Figueroa, S. D., Winkelmann, C. T., Miller, W. H., Volkert, W. A., and Hoffman, T. J. (2008). Tld assessment of mouse dosimetry during microct imaging. *Medical Physics*, 35(9) :3866–3874.
- [Font et al., 1998] Font, B., Eichenberger, D., Goldschmidt, D., Boutillon, M., and Hulmes, D. (1998). Structural requirements for fibromodulin binding to collagen and the control of type i collagen fibrillogenesis. *European Journal of Biochemistry*, 254(3) :580–587.
- [Ford et al., 2003] Ford, N. L., Thornton, M. M., and Holdsworth, D. W. (2003). Fundamental image quality limits for microcomputed tomography in small animals. *Medical Physics*, 30(11) :2869–2877.
- [Francis et al., 2000] Francis, K., Joh, D., Bellinger-Kawahara, C., Hawkinson, M., Purchio, T., and Contag, P. (2000). Monitoring bioluminescent staphylococcus aureus infections in living mice using a novel luxabcde construct. *Infection and immunity*, 68(6) :3594.
- [Fujita et al., 1992] Fujita, H., Tsai, D., Itoh, T., Morishita, J., Ueda, K., and Ohtsuka, A. (1992). A simple method for determining the modulation transfer function in digital radiography. *Medical Imaging, IEEE Transactions on*, 11(1) :34–39.
- [Furukawa et al., 2010] Furukawa, K., Katabami, T., Nakajima, Y., Sato, T., Kato, H., Koganei, R., Asai, S., Matsui, T., Sata, Y., Kawata, T., Kondo, A., Ohta, A., and Tanaka, Y. (2010). Evaluation of whole-abdominal fat volume by 700-slice ct scanning and comparison with the umbilical fat area anthropometric indices. *Obesity Research & Clinical Practice*, 4(2) :e111 – e117.
- [Gamelin et al., 2009] Gamelin, J., Maurudis, A., Aguirre, A., Huang, F., Guo, P., Wang, L. V., and Zhu, Q. (2009). A real-time photoacoustic tomography system for small animals. *Opt. Express*, 17(13) :10489–10498.
- [Garnero, 1981] Garnero, L. (1981). *Problèmes statistiques et localisation en imagerie tridimensionnelle. Application à l'imagerie médicale*. PhD thesis, Université Paris Sud.
- [Gaspar et al., 2003] Gaspar, P., Cases, O., and Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin : news from mouse molecular genetics. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(12) :1002–1012.
- [Genove et al., 2005] Genove, G., DeMarco, U., Xu, H., Goins, W., and Ahrens, E. (2005). A new transgene reporter for in vivo magnetic resonance imaging. *Nature medicine*, 11(4) :450–454.

- [Goertzen et al., 2002] Goertzen, A., Meadors, A., Silverman, R., and Cherry, S. (2002). Simultaneous molecular and anatomical imaging of the mouse in vivo. *Physics in Medicine and Biology*, 47 :4315.
- [Goldberg et al., 2008] Goldberg, M., Ono, M., Septier, D., Bonnefoix, M., Kilts, T., Bi, Y., Embree, M., Ameye, L., and Young, M. (2008). Fibromodulin-deficient mice reveal dual functions for fibromodulin in regulating dental tissue and alveolar bone formation. *Cells Tissues Organs*, 189(1-4) :198–202.
- [Goldberg et al., 2006] Goldberg, M., Septier, D., Oldberg, Å., Young, M., and Ameye, L. (2006). Fibromodulin-deficient mice display impaired collagen fibrillogenesis in predentin as well as altered dentin mineralization and enamel formation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 54(5) :525.
- [Gordy et al., 1955] Gordy, W., Ard, W., and Shields, H. (1955). Microwave spectroscopy of biological substances. i. paramagnetic resonance in x-irradiated amino acids and proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 41(11) :983.
- [Graves et al., 2004] Graves, E., Weissleder, R., and Ntziachristos, V. (2004). Fluorescence molecular imaging of small animal tumor models. *Current Molecular Medicine*, 4(4) :419–430.
- [Guibaud et al., 2005] Guibaud, N., Duchamp, O., Just, N., and Gene, P. (2005). Rôle de l'imagerie non invasive du petit animal dans le développement des médicaments anticancéreux. *Bulletin du Cancer*, Volume 92, Numéro 1 :45–57.
- [Halford, 2006] Halford, J. (2006). Obesity drugs in clinical development. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 7(4) :312–318.
- [Halvorsen, 2005] Halvorsen, P. (2005). Dosimetric evaluation of a new design mosfet in vivo dosimeter. *Medical physics*, 32 :110.
- [Hammersberg and Mangard, 1998] Hammersberg, P. and Mangard, M. (1998). Correction for beam hardening artefacts in computerised tomography. *Journal of X-ray Science and Technology*, 8(1) :75.
- [Hauwel et al., 2010] Hauwel, M., Bettinger, T., and Allémann, E. (2010). Use of microbubbles as ultrasound contrast agents for molecular imaging. *Ultrasound Contrast Agents*, pages 13–23.
- [He et al., 2002] He, G., Samouilov, A., Kuppusamy, P., and Zweier, J. L. (2002). in vivo imaging of free radicals : Applications from mouse to man. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 234-235 :359–367. 10.1023/A :1015994629341.
- [He et al., 1996] He, T., Hong, L., Kaufman, A., and Pfister, H. (1996). Generation of transfer functions with stochastic search techniques.
- [Herve, 2006] Herve, M.-L. (2006). *Dosimétrie d'accident en champ mixte (neutrons, photons) utilisant la spectrométrie par résonance paramagnétique électronique (RPE)*. PhD thesis, UNIVERSITE PARIS XI.
- [Hildebrand and Rügsegger, 1997] Hildebrand, T. and Rügsegger, P. (1997). A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *Journal of microscopy*, 185(1) :67–75.

- [Hildebrandt et al., 2002] Hildebrandt, A. L., Kelly-Sullivan, D. M., and Black, S. C. (2002). Validation of a high-resolution x-ray computed tomography system to measure murine adipose tissue depot mass in situ and longitudinally. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 47(2) :99–106.
- [Hirayama et al., 2005] Hirayama, A., Nagase, S., Ueda, A., Oteki, T., Takada, K., Obara, M., Inoue, M., Yoh, K., Hirayama, K., and Koyama, A. (2005). In vivo imaging of oxidative stress in ischemia-reperfusion renal injury using electron paramagnetic resonance. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 288(3) :F597.
- [Hounsfield, 1973] Hounsfield, G. (1973). Computerized transverse axial scanning (tomography) : Part 1. description of system. *British Journal of Radiology*, 46(552) :1016.
- [Hutchens and Luker, 2007] Hutchens, M. and Luker, G. (2007). Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases. *Cellular Microbiology*, 9(10) :2315–2322.
- [Ibanez et al., 2005] Ibanez, L., Schroeder, W., Ng, L., Cates, J., et al. (2005). The itk software guide. *Kitware Inc.*
- [Ito, 2005] Ito, M. (2005). Assessment of bone quality using micro-computed tomography (micro-ct) and synchrotron micro-ct. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 23 :115–121. 10.1007/BF03026335.
- [Ito et al., 1998] Ito, M., Nakamura, T., Matsumoto, T., Tsurusaki, K., and Hayashi, K. (1998). Analysis of trabecular microarchitecture of human iliac bone using microcomputed tomography in patients with hip arthrosis with or without vertebral fracture. *Bone*, 23(2) :163–169.
- [Jan et al., 2011] Jan, S., Benoit, D., Becheva, E., Carlier, T., Cassol, F., Descourt, P., Frisson, T., Grevillot, L., Guigues, L., Maigne, L., Morel, C., Perrot, Y., Rehfeld, N., Sarrut, D., Schaart, D. R., Stute, S., Pietrzyk, U., Visvikis, D., Zahra, N., and Buvat, I. (2011). Gate v6 : a major enhancement of the gate simulation platform enabling modelling of ct and radiotherapy. *Physics in Medicine and Biology*, 56(4) :881.
- [Jeavons et al., 1999] Jeavons, A., Chandler, R., and Dettmar, C. (1999). A 3d hidac-pet camera with sub-millimetre resolution for imaging small animals. *Nuclear Science, IEEE Transactions on*, 46(3) :468–473.
- [Jenkins et al., 2006] Jenkins, M., Rothenberg, F., Roy, D., Nikolski, V., Hu, Z., Watanabe, M., Wilson, D., Efimov, I., and Rollins, A. (2006). 4d embryonic cardiography using gated optical coherence tomography. *Opt. Express*, 14(2) :736–748.
- [Jin et al., 2003] Jin, Y., Imielinska, C., Laine, A., Udupa, J., Shen, W., and Heymsfield, S. (2003). Segmentation and evaluation of adipose tissue from whole body mri scans. In Ellis, R. and Peters, T., editors, *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention - MICCAI 2003*, volume 2878 of *Lecture Notes in Computer Science*, pages 635–642. Springer Berlin / Heidelberg. 10.1007/978-3-540-39899.

- [Johns et al., 1993] Johns, R., Steude, J., Castanier, L., and Roberts, P. (1993). Nondestructive measurements of fracture aperture in crystalline rock cores using x ray computed tomography. *Journal of Geophysical Research*, 98(B2) :1889–1900.
- [Johnson et al., 1998] Johnson, R., Hu, H., Haworth, S., Cho, P., Dawson, C., and Linehan, J. (1998). Feldkamp and circle-and-line cone-beam reconstruction for 3d micro-ct of vascular networks. *Physics in Medicine and Biology*, 43 :929.
- [Judex et al., 2010] Judex, S., Luu, Y., Ozcivici, E., Adler, B., Lublinsky, S., and Rubin, C. (2010). Quantification of adiposity in small rodents using micro-ct. *Methods*, 50(1) :14 – 19. Small animal micro-CT imaging.
- [Judy, 1976] Judy, P. (1976). The line spread function and modulation transfer function of a computed tomographic scanner. *Medical Physics*, 3 :233.
- [Kak and SLANEY, 1987] Kak, A. and SLANEY, M. (1987). Slaney, principles of computerized tomographic imaging.
- [Kalender, 2006] Kalender, W. A. (2006). X-ray computed tomography. *Physics in Medicine and Biology*, 51(13) :R29.
- [Kalender et al., 1990] Kalender, W. A., Vock, P., Polacin, A., and Soucek, M. (1990). Spiral-ct : a new technique for volumetric scans. basic principles and methodology. *Rontgenpraxis*, 43(9) :323–330.
- [Kapadia et al., 1998] Kapadia, R., Stroup, G., Badger, A., Koller, B., Levin, J., Coatney, R., Dodds, R., Liang, X., Lark, M., and Gowen, M. (1998). Applications of micro-ct and mr microscopy to study pre-clinical models of osteoporosis and osteoarthritis. *Technol Health Care*, 6(5-6) :361–372.
- [Kindlmann and Durkin, 1998] Kindlmann, G. and Durkin, J. (1998). Semi-automatic generation of transfer functions for direct volume rendering. In *Proceedings of the 1998 IEEE symposium on Volume visualization*, pages 79–86. ACM.
- [Kindlmann et al., 2003] Kindlmann, G., Whitaker, R., Tasdizen, T., and Moller, T. (2003). Curvature-based transfer functions for direct volume rendering : Methods and applications. In *Proceedings of the 14th IEEE Visualization 2003 (VIS'03)*, VIS '03, pages 67–, Washington, DC, USA. IEEE Computer Society.
- [Kirkby et al., 2011] Kirkby, N. S., Low, L., Seckl, J. R., Walker, B. R., Webb, D. J., and Hadoke, P. W. F. (2011). Quantitative 3-dimensional imaging of murine neointimal and atherosclerotic lesions by optical projection tomography. *PLoS ONE*, 6(2) :e16906.
- [Klassen et al., 1997] Klassen, N. V., van der Zwan, L., and Cygler, J. (1997). Gafchromic md-55 : investigated as a precision dosimeter. *Med Phys*, 24(12) :1924–1934.
- [Klinck et al., 2008] Klinck, R. J., Campbell, G. M., and Boyd, S. K. (2008). Radiation effects on bone architecture in mice and rats resulting from in vivo micro-computed tomography scanning. *Medical Engineering & Physics*, 30(7) :888 – 895.
- [Kniss et al., 2002] Kniss, J., Kindlmann, G., and Hansen, C. (2002). Multidimensional transfer functions for interactive volume rendering. *Visualization and Computer Graphics, IEEE Transactions on*, 8(3) :270 – 285.

- [Kniss et al., 2003] Kniss, J., Premoze, S., Hansen, C., Shirley, P., and McPherson, A. (2003). A model for volume lighting and modeling. *IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics*, pages 150–162.
- [Kuhn et al., 1990] Kuhn, J., Goldstein, S., Feldkamp, L., Goulet, R., and Jesion, G. (1990). Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure. *Journal of orthopaedic research*, 8(6) :833–842.
- [Kullberg et al., 2007] Kullberg, J., Ahlström, H., Johansson, L., and Frimmel, H. (2007). Automated and reproducible segmentation of visceral and subcutaneous adipose tissue from abdominal mri. *Int J Obes (Lond)*, 31(12) :1806–1817.
- [Kuo et al., 2007] Kuo, L., Kitlinska, J., Tilan, J., Li, L., Baker, S., Johnson, M., Lee, E., Burnett, M., Fricke, S., Kvetnansky, R., et al. (2007). Neuropeptide y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nature medicine*, 13(7) :803–811.
- [Kyriakou et al., 2010] Kyriakou, Y., Meyer, E., Prell, D., and Kachelrieß, M. (2010). Empirical beam hardening correction (ebhc) for ct. *Medical physics*, 37 :5179.
- [Lacerda-Pinheiro et al., 2008] Lacerda-Pinheiro, S., Marchadier, A., Donās, P., Septier, D., Benhamou, L., Kellermann, O., Goldberg, M., and Poliard, A. (2008). An in vivo model for short-term evaluation of the implantation effects of biomolecules or stem cells in the dental pulp. *Open Dent J*, 2 :67–72.
- [Lacroute and Levoy, 1994] Lacroute, P. and Levoy, M. (1994). Fast volume rendering using a shear-warp factorization of the viewing transformation. In *Proceedings of the 21st annual conference on Computer graphics and interactive techniques*, pages 451–458. ACM.
- [Lang et al., 2008] Lang, T., Koyama, A., Li, C., Li, J., Lu, Y., Saeed, I., Gazze, E., Keyak, J., Harris, T., and Cheng, X. (2008). Pelvic body composition measurements by quantitative computed tomography : association with recent hip fracture. *Bone*, 42(4) :798–805.
- [Lasser and Ntziachristos, 2007] Lasser, T. and Ntziachristos, V. (2007). Optimization of 360° projection fluorescence molecular tomography. *Medical Image Analysis*, 11(4) :389 – 399.
- [Lauder and Zimmerman, 1988] Lauder, J. and Zimmerman, E. (1988). Sites of serotonin uptake in epithelia of the developing mouse palate, oral cavity, and face : possible role in morphogenesis. *Journal of craniofacial genetics and developmental biology*, 8(3) :265.
- [Lecomte et al., 1996] Lecomte, R., Cadorette, J., Rodrigue, S., Lapointe, D., Rouleau, D., Bentourkia, M., Yao, R., and Msaki, P. (1996). Initial results from the sherbrooke avalanche photodiode positron tomograph. *Nuclear Science, IEEE Transactions on*, 43(3) :1952–1957.
- [Levoy, 1988] Levoy, M. (1988). Display of surfaces from volume data. *Computer Graphics and Applications, IEEE*, 8(3) :29–37.
- [Levoy, 1990] Levoy, M. (1990). Efficient ray tracing of volume data. *ACM Transactions on Graphics (TOG)*, 9(3) :245–261.

- [Li et al., 2008] Li, X., Youngren, J. F., Hyun, B., Sakkas, G. K., Mulligan, K., Majumdar, S., Masharani, U. B., Schambelan, M., and Goldfine, I. D. (2008). Technical evaluation of in vivo abdominal fat and imcl quantification using mri and mrsi at 3 t. *Magn Reson Imaging*, 26(2) :188–197.
- [Lorensen and Cline, 1987] Lorensen, W. and Cline, H. (1987). Marching cubes : A high resolution 3d surface construction algorithm. *ACM Siggraph Computer Graphics*, 21(4) :163–169.
- [Louie et al., 2000] Louie, A., Huber, M., Ahrens, E., Rothbacher, U., Moats, R., Jacobs, R., Fraser, S., and Meade, T. (2000). In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging. *Nature Biotechnology*, 18(3) :321–325.
- [Lublinsky et al., 2009] Lublinsky, S., Luu, Y., Rubin, C., and Judex, S. (2009). Automated separation of visceral and subcutaneous adiposity in in vivo micro-computed tomographies of mice. *J Digit Imaging*.
- [Lublinsky et al., 2007] Lublinsky, S., Ozcivici, E., and Judex, S. (2007). An automated algorithm to detect the trabecular-cortical bone interface in micro-computed tomographic images. *Calcif Tissue Int*, 81(4) :285–293.
- [Lund et al., 2002] Lund, A., Olsson, S., Bonora, M., Lund, E., and Gustafsson, H. (2002). New materials for esr dosimetry. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 58(6) :1301–1311.
- [Luo et al., 2006] Luo, W., Marks, D., Ralston, T., and Boppart, S. (2006). Three-dimensional optical coherence tomography of the embryonic murine cardiovascular system. *Journal of biomedical optics*, 11 :021014.
- [Luu et al., 2008] Luu, Y. K., Lublinsky, S., Ozcivici, E., Capilla, E., Pessin, J. E., Rubin, C. T., and Judex, S. (2008). In vivo quantification of subcutaneous and visceral adiposity by micro-computed tomography in a small animal model. *Med Eng Phys*.
- [Mace et al., 2010] Mace, E., Cohen, I., Martin, A., Montaldo, G., Fink, M., Tavittian, B., and Tanter, M. (2010). In vivo brain elasticity mapping in small animals using ultrasound and its application to cerebral ischemia. In *Biomedical Imaging : From Nano to Macro, 2010 IEEE International Symposium on*, pages 245 –248.
- [Magnusson et al., 1992] Magnusson, M., Danielsson, P., and Edholm, P. (1992). Artefacts and remedies in direct fourier tomographic reconstruction. In *Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference, 1992., Conference Record of the 1992 IEEE*, pages 1138–1140. IEEE.
- [Martens et al., 2002] Martens, C., Claeys, I., Wagter, C. D., and Neve, W. D. (2002). The value of radiographic film for the characterization of intensity-modulated beams. *Phys Med Biol*, 47(13) :2221–2234.
- [Matheson et al., 2005] Matheson, S., Larjava, H., and H
"akkinen, L. (2005). Distinctive localization and function for lumican, fibromodulin and decorin to regulate collagen fibril organization in periodontal tissues. *Journal of periodontal research*, 40(4) :312–324.
- [Matsumoto et al., 2008] Matsumoto, S., Hyodo, F., Subramanian, S., Devasahayam, N., Munasinghe, J., Hyodo, E., Gadisetti, C., Cook, J., Mitchell, J., and

- Krishna, M. (2008). Low-field paramagnetic resonance imaging of tumor oxygenation and glycolytic activity in mice. *The Journal of clinical investigation*, 118(5) :1965.
- [Mattsson and Thomas, 2006] Mattsson, S. and Thomas, B. J. (2006). Development of methods for body composition studies. *Phys Med Biol*, 51(13) :R203–R228.
- [Meganck et al., 2009] Meganck, J. A., Kozloff, K. M., Thornton, M. M., Broski, S. M., and Goldstein, S. A. (2009). Beam hardening artifacts in micro-computed tomography scanning can be reduced by x-ray beam filtration and the resulting images can be used to accurately measure bmd. *Bone*, 45(6) :1104–1116.
- [Milan et al., 2005] Milan, A., Sugars, R., Embery, G., and Waddington, R. (2005). Modulation of collagen fibrillogenesis by dentinal proteoglycans. *Calcified tissue international*, 76(2) :127–135.
- [Mueggler et al., 2010] Mueggler, T., Razoux, F., Russig, H., Buehler, A., Franklin, T., Baltés, C., Mansuy, I., and Rudin, M. (2010). Mapping of cbv changes in 5-ht1a terminal fields by functional mri in the mouse brain. *European Neuropsychopharmacology*.
- [Muller et al., 1998] Muller, R., Van Campenhout, H., Van Damme, B., Van der Perre, G., Dequeker, J., Hildebrand, T., and Ruegsegger, P. (1998). Morphometric analysis of human bone biopsies : a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone*, 23(1) :59–66.
- [Natterer, 1985] Natterer, F. (1985). Fourier reconstruction in tomography. *Numerische Mathematik*, 47 :343–353. 10.1007/BF01389583.
- [Nisoli and Carruba, 2000] Nisoli, E. and Carruba, M. (2000). An assessment of the safety and efficacy of sibutramine, an anti-obesity drug with a novel mechanism of action. *obesity reviews*, 1(2) :127–139.
- [Ntziachristos et al., 2005] Ntziachristos, V., Ripoll, J., Wang, L., and Weissleder, R. (2005). Looking and listening to light : the evolution of whole-body photonic imaging. *Nature Biotechnology*, 23(3) :313–320.
- [Ntziachristos et al., 2002] Ntziachristos, V., Tung, C., Bremer, C., and Weissleder, R. (2002). Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo. *Nature medicine*, 8(7) :757–761.
- [Obenaus and Smith, 2004] Obenaus, A. and Smith, A. (2004). Radiation dose in rodent tissues during micro-ct imaging. *Journal of X-Ray Science and Technology*, 12 :241–249.
- [Orsega and Corvaja, 1977] Orsega, E. and Corvaja, C. (1977). Electron spin resonance of gamma-irradiated single crystals of calcium formate. *Journal of Molecular Structure*, 40 :211–214.
- [Ovenall and Whiffen, 1961] Ovenall, D. and Whiffen, D. (1961). Electron spin resonance and structure of the co-2 radical ion. *Molecular Physics*, 4(2) :135–144.
- [Paganin et al., 2002] Paganin, D., Mayo, S. C., Gureyev, T. E., Miller, P. R., and Wilkins, S. W. (2002). Simultaneous phase and amplitude extraction from a single defocused image of a homogeneous object. *Journal of Microscopy*, 206(1) :33–40.

- [Paulus et al., 1999] Paulus, M., Sari-Sarraf, H., Gleason, S., Bobrek, M., Hicks, J., Johnson, D., Behel, J., Thompson, L., and Allen, W. (1999). A new x-ray computed tomography system for laboratory mouse imaging. *Nuclear Science, IEEE Transactions on*, 46(3) :558–564.
- [Paulus et al., 2000] Paulus, M. J., Gleason, S. S., Kennel, S. J., Hunsicker, P. R., and Johnson, D. K. (2000). High resolution x-ray computed tomography : an emerging tool for small animal cancer research. *Neoplasia*, 2(1-2) :62–70.
- [Peschmann et al., 1985] Peschmann, K., Napel, S., Couch, J., Rand, R., Alei, R., Ackelsberg, S., Gould, R., and Boyd, D. (1985). High-speed computed tomography : systems and performance. *Applied optics*, 24(23) :4052–4060.
- [Pesnel, 2010] Pesnel, S. (2010). *Développement de modalités d'imagerie in vivo pour l'oncologie expérimentale*. PhD thesis, Université d'Orléans.
- [Peyrin et al., 1998] Peyrin, F., Salome, M., Cloetens, P., Laval-Jeantet, A., Ritman, E., Ruegsegger, P., et al. (1998). Micro-ct examinations of trabecular bone samples at different resolutions : 14, 7 and 2 micron level. *Technol Health Care*, 6(5-6) :391–401.
- [Peyton et al., 1992] Peyton, R., Haeffner, B., Anderson, S., and Gantzer, C. (1992). Applying x-ray ct to measure macropore diameters in undisturbed soil cores. *Geoderma*, 53 :329–340.
- [Phong, 1975] Phong, B. (1975). Illumination for computer generated pictures. *Communications of the ACM*, 18(6) :317.
- [Positano et al., 2009] Positano, V., Christiansen, T., Santarelli, M. F., Ringgaard, S., Landini, L., and Gastaldelli, A. (2009). Accurate segmentation of subcutaneous and intermuscular adipose tissue from mr images of the thigh. *J Magn Reson Imaging*, 29(3) :677–684.
- [Positano et al., 2004] Positano, V., Gastaldelli, A., Sironi, A. M., Santarelli, M. F., Lombardi, M., and Landini, L. (2004). An accurate and robust method for unsupervised assessment of abdominal fat by mri. *J Magn Reson Imaging*, 20(4) :684–689.
- [Pou et al., 2009] Pou, K., Massaro, J., Hoffmann, U., Lieb, K., Vasan, R., O'Donnell, C., and Fox, C. (2009). Patterns of abdominal fat distribution. *Diabetes care*, 32(3) :481.
- [Radon, 1917] Radon, J. (1917).
"Über die bestimmung von funktionen durch ihre integralwerte l
"angs gewisser mannigfaltigkeiten. *Berichte S
"achsische Akademie der Wissenschaften*, 69 :262–267.
- [Ray et al., 2008] Ray, S., Paulmurugan, R., Patel, M., Ahn, B., Wu, L., Carey, M., and Gambhir, S. (2008). Noninvasive imaging of therapeutic gene expression using a bidirectional transcriptional amplification strategy. *Molecular Therapy*, 16(11) :1848–1856.
- [Rice et al., 2001] Rice, B. W., Cable, M. D., and Nelson, M. B. (2001). In vivo imaging of light-emitting probes. *Journal of Biomedical Optics*, 6 :432.

- [Rieckher et al., 2011] Rieckher, M., Birk, U. J., Meyer, H., Ripoll, J., and Tavernarakis, N. (2011). Microscopic optical projection tomography in vivo. *PLoS ONE*, 6(4) :e18963.
- [Riederer et al., 1978] Riederer, S., Pelc, N., and Chesler, D. (1978). The noise power spectrum in computed x-ray tomography. *Physics in Medicine and Biology*, 23 :446.
- [Roettger et al., 2003] Roettger, S., Guthe, S., Weiskopf, D., Ertl, T., and Strasser, W. (2003). Smart hardware-accelerated volume rendering. In *Proceedings of the symposium on Data visualisation 2003*, pages 231–238. Eurographics Association.
- [Romanyukha et al., 1999] Romanyukha, A., Hayes, R., Haskell, E., and Kenner, G. (1999). Geographic variations in the epr spectrum of tooth enamel. *Radiation protection dosimetry*, 84(1-4) :445.
- [Rontgen, 1895] Rontgen, W. (1895). Ueber eine neue art von strahlen :(vorlaufige mittheilung). ? ? ? ? ? ? ? ? ? ? ? ? ?
- [Ruegsegger et al., 1996] Ruegsegger, P., Koller, B., and Muller, R. (1996). A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcified tissue international*, 58(1) :24–29.
- [Ruggeri et al., 2009] Ruggeri, M., Jiao, S., Major, J. C., Cebulla, C., Rosenfeld, P., Gregori, G., Tsechpenakis, G., Wang, J., Murray, T., and Porciatti, V. (2009). Ultra high-resolution optical coherence tomography for ocular imaging of small animals. In Springer, editor, *25th Southern Biomedical Engineering Conference 2009, Miami, Florida, USA*, volume 24 of *IFMBE Proceedings*, pages 11–12. Springer Berlin Heidelberg.
- [Salem and Bloom, 2010] Salem, V. and Bloom, S. (2010). Approaches to the pharmacological treatment of obesity. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 3(1) :73–88.
- [Sanganahalli et al., 2008] Sanganahalli, B., Herman, P., and Hyder, F. (2008). Frequency-dependent tactile responses in rat brain measured by functional mri. *NMR in Biomedicine*, 21(4) :410–416.
- [Sato et al., 2000] Sato, Y., Westin, C., Bhalerao, A., Nakajima, S., Shiraga, N., Tamura, S., and Kikinis, R. (2000). Tissue classification based on 3d local intensity structures for volume rendering. *Visualization and Computer Graphics, IEEE Transactions on*, 6(2) :160 –180.
- [Schambach et al., 2010] Schambach, S. J., Bag, S., Schilling, L., Groden, C., and Brockmann, M. A. (2010). Application of micro-ct in small animal imaging. *Methods*, 50(1) :2–13.
- [Schelbert et al., 2003] Schelbert, H., Inubushi, M., and Ross, R. (2003). Pet imaging in small animals. *Journal of nuclear cardiology*, 10(5) :513–520.
- [Schroeder and Lorenson, 1996] Schroeder, W. and Lorenson, B. (1996). *Visualization Toolkit : An Object-Oriented Approach to 3-D Graphics*. Prentice Hall PTR.
- [Schwarz et al., 2010] Schwarz, M., Engelhorn, T., Eyupoglu, I. Y., Br nner, H., Struffert, T., Kalender, W., and D rfler, A. (2010). In vivo imaging of msct and micro-ct : a comparison. *Rofo*, 182(4) :322–326.

- [Seguin et al., 1985] Seguin, F., Burstein, P., Bjorkholm, P., Homburger, F., and Adams, R. (1985). X-ray computed tomography with 50- μ m resolution. *Applied optics*, 24(23) :4117–4123.
- [Sereda et al., 2006] Sereda, P., Bartroli, A., Serlie, I., and Gerritsen, F. (2006). Visualization of boundaries in volumetric data sets using lh histograms. *Visualization and Computer Graphics, IEEE Transactions on*, 12(2) :208–218.
- [Sharpe, 2004] Sharpe, J. (2004). Optical projection tomography. *Annu Rev Biomed Eng*, 6 :209–228.
- [Sharpe et al., 2002] Sharpe, J., Ahlgren, U., Perry, P., Hill, B., Ross, A., Hecksher-Sørensen, J., Baldock, R., and Davidson, D. (2002). Optical projection tomography as a tool for 3d microscopy and gene expression studies. *Science*, 296(5567) :541–545.
- [Snyder et al., 1987] Snyder, D., Miller, M., Thomas, L., and Politte, D. (1987). Noise and edge artifacts in maximum-likelihood reconstructions for emission tomography. *Medical Imaging, IEEE Transactions on*, 6(3) :228–238.
- [Song et al., 2007] Song, X., Wang, D., Chen, N., Bai, J., and Wang, H. (2007). Reconstruction for free-space fluorescence tomography using a novel hybrid adaptive finite element algorithm. *Optics express*, 15(26) :18300–18317.
- [Srinivasan et al., 2011] Srinivasan, P., Shenton, M., and Bouix, S. (2011). Em segmentation : Automatic tissue class intensity initialization using k-means.
- [Srinivasan et al., 2010] Srinivasan, V. J., Sakadžić, S., Gorczynska, I., Ruvinskaya, S., Wu, W., Fujimoto, J. G., and Boas, D. A. (2010). Quantitative cerebral blood flow with optical coherence tomography. *Opt. Express*, 18(3) :2477–2494.
- [Stabin et al., 2006] Stabin, M. G., Peterson, T. E., Holburn, G. E., and Emmons, M. A. (2006). Voxel-based mouse and rat models for internal dose calculations. *J Nucl Med*, 47(4) :655–659.
- [Stenner et al., 2010] Stenner, P., Schmidt, B., Allmendinger, T., Flohr, T., and Kachelrie, M. (2010). Dynamic iterative beam hardening correction (dibhc) in myocardial perfusion imaging using contrast-enhanced computed tomography. *Investigative radiology*, 45(6) :314.
- [Sumner et al., 2002] Sumner, A., Farmer, N., Tulloch-Reid, M., Sebring, N., Yanovski, J., Reynolds, J., Boston, R., and Premkumar, A. (2002). Sex differences in visceral adipose tissue volume among african americans. *The American journal of clinical nutrition*, 76(5) :975.
- [Supe et al., 1986] Supe, A., Zubarev, V., and Bugaenko, L. (1986). Radiation-chemical yields of co 2-radical in the γ -irradiated formates of the alkali-and alkali-earth metals. *Latvijas psr Zinatnu Akad. Vestis*, 4 :433–438.
- [Sussman et al., 2010] Sussman, D. L., Yao, J., and Summers, R. M. (2010). Automated fat measurement and segmentation with intensity inhomogeneity correction. volume 7623, page 76233X. SPIE.
- [Swartz et al., 1965] Swartz, H., Molenda, R., and Lofberg, R. (1965). Long-lived radiation-induced electron spin resonances in an aqueous biological system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 21(1) :61–65.

- [Tanter et al., 2009] Tanter, M., Gennisson, J., Pernot, M., Montaldo, G., and Fink, M. (2009). Elastographie ultrasonore : hier, aujourd’hui, demain. *Journal de Radiologie*, 90(10) :1460 –.
- [Tanter et al., 2010] Tanter, M., Pernot, M., Montaldo, G., Gennisson, J.-L., Bavu, E., Mace, E., Nguyen, T.-M., Couade, M., and Fink, M. (2010). Real time quantitative elastography using supersonic shear wave imaging. In *Biomedical Imaging : From Nano to Macro, 2010 IEEE International Symposium on*, pages 276 –279.
- [Taschereau and Chatziioannou, 2007] Taschereau, R. and Chatziioannou, A. F. (2007). Monte carlo simulations of absorbed dose in a mouse phantom from 18-fluorine compounds. *Med Phys*, 34(3) :1026–1036.
- [Taschereau and Chatziioannou, 2008] Taschereau, R. and Chatziioannou, A. F. (2008). Compressed voxels for high-resolution phantom simulations in gate. *Mol Imaging Biol*, 10(1) :40–47.
- [Taschereau et al., 2006] Taschereau, R., Chow, P. L., and Chatziioannou, A. F. (2006). Monte carlo simulations of dose from microct imaging procedures in a realistic mouse phantom. *Med Phys*, 33(1) :216–224.
- [Taschereau et al., 2010] Taschereau, R., Silverman, R. W., and Chatziioannou, A. F. (2010). Dual-energy attenuation coefficient decomposition with differential filtration and application to a microct scanner. *Phys Med Biol*, 55(4) :1141–1155.
- [Thiam et al., 2008] Thiam, C. O., Breton, V., Donnarieix, D., Habib, B., and Maigne, L. (2008). Validation of a dose deposited by low-energy photons using gate/geant4. *Phys Med Biol*, 53(11) :3039–3055.
- [Tsutsumi et al., 2008] Tsutsumi, R., Hock, C., Bechtold, C. D., Proulx, S. T., Bukata, S. V., Ito, H., A. Awad, H., Nakamura, T., O’Keefe, R. J., and Schwarz, E. M. (2008). Differential effects of biologic versus bisphosphonate inhibition of wear debris-induced osteolysis assessed by longitudinal micro-ct. *Journal of Orthopaedic Research*, 26(10) :1340–1346.
- [Valentin, 2007] Valentin, J. (2007). *The 2007 recommendations of the international commission on radiological protection*. Elsevier. ISBN 978-0-7020-3048-2.
- [Valton, 2007] Valton, S. (2007). *Reconstruction tomographique 3D en géométrie conique à trajectoire circulaire pour des prototypes d’imageur bimodal pour le petit animal*. PhD thesis, Institut National des Sciences Appliquées.
- [Valva Ochos et al., 1997] Valva Ochos, A., Ploux, L., Mastrippolito, R., Charon, Y., Laniece, P., Pinot, L., and Valentin, L. (1997). An original emission tomograph for in vivo brain imaging of small animals. *Nuclear Science, IEEE Transactions on*, 44(4) :1533–1537.
- [Van Gelder and Kim, 1996] Van Gelder, A. and Kim, K. (1996). Direct volume rendering with shading via three-dimensional textures.
- [Visvikis et al., 2006] Visvikis, D., Bardies, M., Chiavassa, S., Danford, C., Kirov, A., Lamare, F., Maigne, L., Staelens, S., and Taschereau, R. (2006). Use of the gate monte carlo package for dosimetry applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors*

- and Associated Equipment*, 569(2) :335 – 340. Proceedings of the 3rd International Conference on Imaging Technologies in Biomedical Sciences - Innovation in Nuclear and Radiological Imaging : from Basic Research to Clinical Application.
- [Voigt, 2009] Voigt, J. (2009). Ultrasound molecular imaging. *Methods*, 48(2) :92–97.
- [von Knoch et al., 2004] von Knoch, M., Jewison, D., Sibonga, J., Sprecher, C., Morrey, B., Loer, F., Berry, D., and Scully, S. (2004). The effectiveness of polyethylene versus titanium particles in inducing osteolysis in vivo. *Journal of orthopaedic research*, 22(2) :237–243.
- [Wang et al., 2007] Wang, D., Song, X., and Bai, J. (2007). Adaptive-mesh-based algorithm for fluorescence molecular tomography using an analytical solution. *Opt. Express*, 15(15) :9722–9730.
- [Wang, 2008] Wang, L. V. (2008). Prospects of photoacoustic tomography. *Medical Physics*, 35(12) :5758–5767.
- [Weissleder et al., 2000] Weissleder, R., Moore, A., Mahmood, U., Bhorade, R., Benveniste, H., Chiocca, E., and Basilion, J. (2000). In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression. *Nature medicine*, 6(3) :351–354.
- [Weng et al., 2010] Weng, J., Chuang, K., Goloshevsky, A., Dodd, S., and Sharer, K. (2010). Mapping plasticity in the forepaw digit barrel subfield of rat brains using functional mri. *Neuroimage*.
- [Westover, 1990] Westover, L. (1990). Footprint evaluation for volume rendering. *ACM Siggraph Computer Graphics*, 24(4) :367–376.
- [Winkler et al., 2010] Winkler, A. M., Rice, P. F. S., Drezek, R. A., and Barton, J. K. (2010). Quantitative tool for rapid disease mapping using optical coherence tomography images of azoxymethane-treated mouse colon. *Journal of Biomedical Optics*, 15(4).
- [Xia et al., 2011] Xia, J., Guo, Z., Aguirre, A., Zhu, Q., and Wang, L. V. (2011). Small-animal whole-body imaging using a photoacoustic full ring array system. In *SPIE Photons Plus Ultrasound : Imaging and Sensing*, volume 7899, page 789911. SPIE.
- [Zhang et al., 2010] Zhang, L., Xu, X., Hu, C., Sun, L., Yen, J., Cannata, J., and Shung, K. (2010). A high-frequency, high frame rate duplex ultrasound linear array imaging system for small animal imaging. *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on*, 57(7) :1548 –1557.
- [Zhao et al., 2009] Zhao, D., Jiang, L., Hahn, E. W., and Mason, R. P. (2009). Comparison of 1h blood oxygen level dependent (bold) and 19f mri to investigate tumor oxygenation. *Magnetic Resonance in Medicine*, 62(2) :357–364.
- [Zhou and Boone, 2008] Zhou, H. and Boone, J. M. (2008). Monte carlo evaluation of ctdi[sub [infinity]] in infinitely long cylinders of water, polyethylene and pmma with diameters from 10 mm to 500 mm. *Medical Physics*, 35(6) :2424–2431.
- [Zou et al., 2010] Zou, Y., Bai, D., Wang, S., and Kang, Y. (2010). A new two-dimensional transfer functions for volume rendering. In *Image and Signal Processing (CISP), 2010 3rd International Congress on*, volume 8, pages 3733 –3736.

Bibliographie de l'auteur

Articles de journaux avec comité de lecture

1. Chappard, Peyrin F, Bensalah S, Olivier C, Gouttenoire J P, **Marchadier A**, Benhamou C L. *3D characterization of pores in cortical bone of human femur in different locations by synchrotron micro-computed tomography images*. Osteoporosis International (in press).
2. Harichane Y, Dimitrova-Nakov S, **Marchadier A**, Collet C, Baudry A, Vidal C, Kamoun-Goldrat A, Kellermann O, Goldberg M. *Enamel alterations in serotonin 2B receptor knockout mice*. European Journal of Oral Sciences 2011 (in press).
3. Goldberg M, **Marchadier A**, Vidal C, Harichane Y, Kamoun-Goldrat A, Kellermann O, Kilts T, Young M. *Differential effects of fibromodulin deficiency on mouse mandibular bones and teeth : a microCT time course study*. Cell Tissue Organs, 2011, 194(2-4), DOI : 10.1159/000324397.
4. Nich C, Langlois J, **Marchadier A**, Vidal C, Cohen-Solal M, Petite H, Hamadouche M. *Estrogen Deficiency is Protective Against Particle-Induced Osteolysis*. Arthritis and Rheumatism Journal 2011, 13(3), DOI :10.1186/ar3381.
5. Ranjanomennahary P, Sevestre S, Malouche D, **Marchadier A**, Rachidi M, Benhamou CL, Chappard C. *Comparison of Radiograph-Based Texture Analysis and Bone Mineral Density with Three-Dimensional Microarchitecture of Trabecular Bone*. Journal of Medical Physics 2011, 38(1) :420.
6. Chappard C, Bousson V, Bergot C, Mitton D, **Marchadier A**, Moser T, Benhamou CL, Laredo JD. *Cross-Sectional Study of Texture Analysis and Geometric Measurements on Plain Radiographs versus Bone Mineral Density for Predicting Femoral Fracture Load*. Radiology 2010 May, 255(2) :536-43.
7. Nich C, **Marchadier A**, Sedel L, Petite H, Vidal C, Hamadouche M. *Decrease in particle-induced osteolysis in ovariectomized mice*. J Orthop Res. 2010 Feb,28(2) :178-83.
8. Chappard C, **Marchadier A**, Benhamou L. *Side-to-side and within-side variability of 3D bone microarchitecture by conventional micro-computed tomography of paired iliac crest biopsies*. Bone 2008, 43, 203-208.

9. Chappard C, **Marchadier A**, Benhamou L. *Interindividual and intraspecimen variability of 3-D bone microarchitectural parameters in iliac crest biopsies imaged by conventional micro-computed tomography*. J Bone Miner Metab 2008, 26 :506-513.
10. Lacerda-Pinheiro S, **Marchadier A**, Donãs P, Septier D, Benhamou CL, Kellermann O, Goldberg M, Poliard A. *An In vivo Model for Short-Term Evaluation of the Implantation Effects of Biomolecules or Stem Cells in the Dental Pulp*. Open Dent Journal 2008, 2 :67-72.
11. Rachidi M, **Marchadier A**, Gadois C, Lespessailles E, Chappard C and Benhamou C L. *Laws' masks descriptors applied to bone texture analysis : an innovative and discriminant tool in osteoporosis*. Skeletal Radiology 2008, 37 :541-548.

Communications internationales

1. Destrez R, Albouy-Kissi B, Treuillet S, Lucas Y, **Marchadier A**. *Comparison of Visual Registration Approaches of 3D Models for Orthodontics*. Advanced Concepts for Intelligent Vision Systems (ACIVS). Ghent, Belgium (22-25/08/2011).
2. **Marchadier A**, Vidal C, Tafani J-P, Ordureau S, Lédée R, Léger C. *Quantitative CT imaging for adipose tissue analysis in mouse model of obesity*. SPIE Medical Imaging, Orlando, USA (12-17/02/2011). Poster presentation, "Poster Award".
3. **Marchadier A**, Vidal C, Ordureau S, Lédée R, Léger C, Young M, Goldberg M. *3D visualization and quantification of bone and teeth mineralization for the study of osteo/dentinogenesis in mice models*. SPIE Medical Imaging, Orlando, USA (12-17/02/2011). Oral presentation.
4. Nich C, Langlois J, **Marchadier A**, Vidal C, Cohen-Solal M, Petite H, Hamadouche M. *Estrogen Deficiency is Protective Against Particle-Induced Osteolysis*. 12th EFORT congress, Copenhagen, Danemark (1-4/06/2011).
5. Ordureau S, **Marchadier A**, Lédée R, Vidal C, Tafani JP, Léger C. *New CT imaging method for adipose tissue analysis in mouse model of obesity*. RSNA 2009 (orateur).
6. Nich C, **Marchadier A**, Sedel L, Petite H, Hamadouche M. *Decrease in particle-induced osteolysis in ovariectomized mice*. Société Internationale de Chirurgie Orthopédique et de Traumatologie (SICOT). Pattaya, Thailand, novembre 2009.
7. Nich C, **Marchadier A**, Sedel L, Petite H, Hamadouche M. *Experimental model of particle-induced periprosthetic osteolysis : micro-scanner evaluation*. Société Internationale de Chirurgie Orthopédique et de Traumatologie (SICOT). Pattaya, Thaïlande, novembre 2009.
8. Goldberg M, **Marchadier A**, Septier D, Cherifi H, Vidal C, Sugars R, Oldberg A, Kilts T, Young M. *Fibromodulin is Implicated in Bones and Teeth Minera-*

- lization. Joint Meeting of the Continental European, Israeli and Scandinavian Divisions of the IADR, September 10-12, 2009.
9. Goldberg M, Ono M, Septier D, **Marchadier A**, Ordureau S, Vidal C, Kilts TM, Bi Y, Embree M, Young M. *Importance of Fibromodulin on dental tissues and mandibular bone formation*. PEF-IADR London September 2008.
 10. Nefussi J, **Marchadier A**, Lézot F, Aioub M, Babojko S, Berteretche MV, Benhamou L, Berdal A. *Involvement of Msx1 Homeogene in Alveolar Bone Maintenance*. Pan European Federation of the International Association for Dental Research, London September 10-12, 2008.
 11. Rachidi M, Chappard C, **Marchadier A**, Gadois C, Lespessailles E, Benhamou C. *Application of Laws'masks to bone texture analysis : An innovative image analysis tool in osteoporosis*. Proc. 5th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging : From Nano to Macro ISBI 2008, 2008, 1191-1194.
 12. Chappard C, **Marchadier A**, Rachidi M, Benhamou CL, Peyrin F. *Assessment of cortical bone microarchitecture from X-ray synchrotron radiation at different location of human femur*. International Bone Densitometry Workshop, Pugnochioso, Italy, 2008.
 13. Nefussi JR, **Marchadier A**, Aioub M, Lezot F, Basillais A, Toledo R, Benhamou CL, Berdal A. *Mouse model coupled to micro CT imaging analysis to investigate alveolar bone involution following tooth extraction*. 9th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation (TMD), 5-8 septembre 2007, Zurich.
 14. Simon Y, **Marchadier A**, Lezot F, Aioub M, Berdal A, Nefussi JR. *Cephalometric analysis of cranio-facial bone morphology in relation with gene mutations in transgenic mice*. 9th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation (TMD), 5-8 septembre 2007, Zurich.
 15. Chappard, Meme S, **Marchadier A**, Benhamou CL, Beloeil JC. *Effect of thickness slides on bone morphological parameters assessed in vitro by high resolution magnetic resonance imaging*. 17th International Bone Densitometry Workshop, Kyoto (Japan) 5-7 November 2006.
 16. Chappard C, **Marchadier A**, Basillais A, Benhamou L. *Assessment of intra-individual variability of 3D bone microarchitecture by conventional micro-computed tomography in paired iliac crest biopsies*. J Bone Miner Res. 2006, 21 suppl 1 :F106, S86.
 17. **Marchadier A**, Basillais A, Aioub M, Nefussi JR, Berdal A, Benhamou CL. *Automatic three dimensional anatomic reorientation of micro CT imaging applied to mice molar dento-alveolar bone*. 17th International Bone Densitometry Workshop, Kyoto (Japan) 5-7 November 2006.
 18. Andreff N, **Marchadier A**, Martinet P. *Vision-Based Control of a Gough-Stewart Parallel Mechanism using Legs Observation*. IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA), 2005.

Communications nationales

1. Destrez R, Albouy-Kissi B, Treuillet S, Lucas Y, **Marchadier A**. *Recalage visuel d'une paire de modèles 3D maxillo-mandibulaires*. 13ème colloque GRETSI. Bordeaux, France (5-8/09/2011).
2. Destrez R, Albouy-Kissi B, Treuillet S, Lucas Y, **Marchadier A**. *Comparaison de méthodes de recalage visuel de modèles 3D pour l'orthodontie*. Congrès des jeunes chercheurs en vision par ordinateur, ORASIS 2011. Praz-sur-Arly, France (6-10/06/2011).
3. Nich C, **Marchadier A**, Sedel L, Petite H, Hamadouche M. *Diminution de l'ostéolyse aux particules d'usure chez des souris ovariectomisées*. Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (SOFOT). Paris, 9-13 novembre 2009.
4. Nich C, **Marchadier A**, Sedel L, Petite H, Hamadouche M. *Modèle expérimental d'ostéolyse péri-prothétique aux particules d'usure*. Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (SOFOT). Paris, 12-16 novembre 2008.
5. Chappard C, Randrianomenjanahary P, **Marchadier A**, Rachidi M, Gadois C, Benhamou L. *Corrélation des paramètres de texture dérivés de radiographies numériques haute résolution et de paramètres tridimensionnels de la microarchitecture osseuse : applications au fémur*. Revue du Rhumatisme, 2007, 74, 1069 - 1069.
6. Chappard C, Bousson V, Bergot C, **Marchadier A**, Moser T, Mitton D, Benhamou L, Laredo J. *Analyse de texture et mesures géométriques sur des radiographies de fémur : corrélation avec la résistance mécanique*. Revue du Rhumatisme, 2007, 74, 1068 - 1069.
7. Rocher E, Chappard C, **Marchadier A**, Do-Huu J, Jaffré C, Benhamou L. *Entraînement physique, adipocytokines, densité minérale, macro et microarchitecture osseuse chez l'enfant obèse*. Revue du Rhumatisme, 2007, 74, 1077 - 1077.
8. Rocher E, Chappard C, Gadois C, **Marchadier A**, Do-Huu JP, Benhamou CL. *Densité minérale, macro et microarchitecture osseuse chez l'enfant obèse*. 18ème Congrès Français de Rhumatologie - 3-6 décembre 2006, Paris.

Communications internationales sans actes

1. **Marchadier A**, Basillais A, Nefussi JR, Berdal A, Benhamou CL. *Mice molar dento-alveolar bone characterization with micro-CT*. SKYSCAN User Meeting 16-18 avril 2007, Brugges.

Communications nationales sans actes

1. **Marchadier A**, Goldberg M, Tafani J-P, Lédée R, Léger C, Vidal C. *3D visualization and quantification of mineralized and adipose tissues in mice mo-*

dels. Poster à la Journée du Département Biologie Cellulaire et Infection de l'Institut PASTEUR, Paris (14/10/ 2010).

Séminaires - Réunions GDR

1. Ordureau S, **Marchadier A**, Koenig F, Maison B, Diard F. "*GPU déporté pour la visualisation à distance de données 3D en temps réel et en relief*". Journée GDR STIC-Santé/ISIS, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris (01/12/2010).
2. **Marchadier A**, Lédée R, Vidal C, Le Pape A, Léger C. *Analyse d'images tomographiques chez le petit animal : application aux études de phénotypage de l'embryon à l'adulte, in vivo et ex vivo*. Poster au Séminaire PRISME, Nouan le Fuzelier (02/06/2008).

Conférences invité

1. **Marchadier A**, Vidal C, Harichane Y, Simon Y, Lédée R, Léger C, Goldberg M. *Nouveaux outils en imagerie 3D du crâne et des dents*. Conférence scientifique de l'Association Dentaire Française (ADF), interface INSERM odontologie - les retombées de la recherche sur la clinique (23/11/2011).
2. **Marchadier A**. *Visualisation 3D pour la recherche biomédicale*. CNRS, Bioengineering, osteoarticular biomechanics laboratory, Paris (B2OA), (04/02/2010).
3. **Marchadier A**. *Tomographie et visualisation en relief*. INSERM U714, Oro-Faciale biology laboratory seminary. University Paris 5 et Paris Descartes, (18/03/2010).
4. **Marchadier A**. *Tomographie et visualisation en relief : application pour l'industrie*. Séminaire du CRESITT. Université d'Orléans (25/02/2010).
5. **Marchadier A**. *L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle*. Séminaire "Neuroloi" sur les perspectives scientifiques, éthiques et légales sur l'utilisation des neurosciences dans le cadre des procédures judiciaires. Centre d'analyse stratégique du Premier Ministre, France. (10/12/2009).

Divers

1. Lionel Cavicchoili. *Quand l'imagerie médicale rencontre le jeu vidéo*. Biofutur (magazine mensuel), (30) :317, 2011 jan.

Arnaud MARCHADIER

Analyses d'images de tomographie X chez le petit animal : applications aux études de phénotypage *ex vivo* et *in vivo*

Résumé :

L'imagerie du petit animal est incontournable pour le développement des recherches dans les secteurs de la biologie, de la médecine et de l'industrie pharmaceutique. Parmi les différentes modalités d'imagerie développées chez l'humain et adaptées à l'animal, l'imagerie tomographique à rayons X est devenue une référence pour l'analyse des caractères anatomiques et phénotypiques chez la souris. Elle permet de réaliser des études longitudinales *in vivo* et des analyses haute résolution *ex vivo* de façon non invasive et en 3D. L'analyse de ces images 3D nécessite des outils spécifiques à chaque problématique.

Dans ce contexte, notre travail de thèse a permis d'apporter des contributions sur les thématiques suivantes :

1. le développement d'outils d'analyse, à la fois quantitatifs et qualitatifs, pour l'imagerie des tissus minéralisés et adipeux
2. l'application des méthodologies développées à des problématiques de recherche biomédicale
3. l'étude comparative et "multi-échelle" de différentes technologies de tomographie X pour l'imagerie du petit animal
4. la mise au point d'une méthode originale par résonance paramagnétique électronique pour la dosimétrie d'un acte d'imagerie X chez le petit animal

En conclusion, les outils d'imagerie 3D que nous avons développés représentent un nouvel apport pour la dissection virtuelle de l'animal de laboratoire, permettant l'exploration de nombreux tissus et organes et rivalisant avec les méthodes d'histologie et de microscopie électronique.

L'application de ces méthodes d'imagerie pour la recherche fondamentale et pré-clinique ouvre la perspective d'une alternative nouvelle dans l'expérimentation animale.

Mots clés : tomographie X, imagerie du petit animal, volume rendering, segmentation, tissus adipeux, tissus minéralisés

Analysis of small animal X-Ray tomographic imaging : application for phenotypical analysis in mice *ex vivo* and *in vivo*

Summary :

Small animal imaging is highly necessary for the development of biomedical research and pharmaceutical applications. Amongst various available imaging methods, X-Ray tomography is now considered as a gold standard for anatomical and phenotypical analysis in mice. CT imaging allows non invasive longitudinal studies *in vivo* and high resolution analysis *ex vivo*. The 3D image analysis requires the development of specific tools depending on the biomedical problematics.

In this context, we have investigated the following research areas :

1. Development of 3D image tools for qualitative and quantitative image analysis of mineralized and adipose tissues in murin models
2. Application of our tools to biomedical investigations
3. Comparative and multi-scale analysis of various tomography technologies for small animal imaging
4. Development of an original method using Electronic Paramagnetic Resonance (EPR) for X-ray dosimetry in mice

In conclusion, our 3D imaging methods are potentially of high interest for the virtual dissection of laboratory animals, allowing extended analysis of various tissues and organs complementary to standard histological and microscopic approaches.

Keywords : X-Ray tomography, small animal imaging, volume rendering, segmentation, adipose tissue, mineralized tissue