



HAL
open science

IRM microscopique 3D de la migration de cellules tumorales et tractographie du cerveau de souris : applications à un modèle de glioblastome Gliob6 et de schizophrénie MAP6

Ulysse Gimenez

► **To cite this version:**

Ulysse Gimenez. IRM microscopique 3D de la migration de cellules tumorales et tractographie du cerveau de souris : applications à un modèle de glioblastome Gliob6 et de schizophrénie MAP6. Cancer. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAS026 . tel-01766455

HAL Id: tel-01766455

<https://theses.hal.science/tel-01766455>

Submitted on 13 Apr 2018

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biotechnologie, Instrumentation, Signal et imagerie pour la médecine, la biologie et l'environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Ulysse GIMENEZ

Thèse dirigée par **Hana LAHRECH**

préparée au sein de **CLINATEC**
dans l'**École Doctorale : Ingénierie pour la santé, la cognition et l'environnement**

IRM microscopique 3D de la migration des cellules tumorales et tractographie du cerveau de souris : applications à un modèle de glioblastome Gliob6 et de schizophrénie MAP6

Thèse soutenue publiquement le **11/12/2015**
devant le jury composé de :

Mme Marlène WIART

Directeur de recherche CNRS

Rapporteur

M. Samuel VALABLE

Chargé de recherche CNRS

Rapporteur

Mme Annie ANDRIEUX

Directeur de recherche Université de Grenoble

Présidente du jury

M. Bassem HIBA

Chargé de recherche Université de Bordeaux

Examineur

M. François BERGER

PU-PH Université de Grenoble

Examineur

Mme Hana LAHRECH

Chargé de Recherche INSERM

Directrice de thèse



REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier Marlène Wiart et Samuel Valable d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie aussi Annie Andrieux et Bassem Hiba d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je remercie l'ensemble de mon jury pour leurs remarques pertinentes et l'échange constructif que nous avons eu.

Je voudrais remercier Hana Lahrech de m'avoir permis de faire cette thèse, dans un domaine de recherche passionnant. Je te remercie d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir fait confiance, et d'avoir toujours cherché à m'apporter de nouveaux défis. Merci d'avoir été là dans les « rush » où les deadlines beaucoup trop serrées ont toujours été respectées, à commencer par ce manuscrit.

Je souhaite aussi remercier François Berger de m'avoir accueilli chaleureusement dans son équipe. Merci François pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ta motivation et ton envie de faire avancer les choses

Merci à toute « l'équipe 7 », au sein de laquelle j'ai travaillé, traversant de nombreuses péripéties du GIN à Clinatoc. Je vous remercie tous d'avoir partagé vos expertises, essentielles à un travail multidisciplinaire, ainsi que pour votre bonne humeur. Merci Michèle pour l'énorme travail que nous avons effectué ensemble en Biologie cellulaire dans la bonne ambiance même quand les cellules nous donnaient du fil à retordre. Merci Didier pour tes conseils de lecture, nous n'aurons jamais pu tenter les expériences originales dont on parlait. Merci Boudewijn pour m'avoir accompagné pour mes nombreuses applications de microscopie. Merci Marie-France pour ton aide dans les laboratoires du GIN. Merci Matthieu pour m'avoir formé sur la moitié des machines que j'ai eu à utiliser, c'était un plaisir de faire nos thèses en parallèle. Merci à Laurianne, Laurent, Ali, Adrien, Marie, Hélène et Guillaume pour avoir fait vivre l'équipe ces années dans la bonne humeur.

Merci Adriana pour m'avoir lancé dans le bain au début de ma thèse, merci pour ton soutien et tes conseils. C'était toujours sympa de se retrouver aux congrès, ainsi qu'en dehors.

Merci Michel et Flavien. Notre trio c'était super, et je ne conçois pas cette thèse sans vous.

Ma première maison pendant cette thèse fut le GIN que j'ai continué à côtoyer jusqu'à y faire ma soutenance. Merci Nathalie pour ta capacité à régler tous les soucis administratifs, merci pour ton efficacité et ta gentillesse. Merci Georges pour tes services, merci d'avoir géré les à cotés pour ma soutenance. Merci à l'équipe GIN-TONIC, merci Sylvain et Adnan, pour nos exploits sportifs et les moments partagés.

Merci Florence de m'avoir aidé à reconstruire l'image la plus diffusée tout au long de ma thèse. Merci Véronique pour notre coopération, merci de m'avoir ouvert la porte de l'animalerie pour accéder à l'IRM un dimanche matin.

Merci à toute l'équipe 5 pour nos interactions « IRM » au labo, dans les bureaux ou aux conférences. Merci à tous les thésards et stagiaires, Nico, Mélina, Lydiane, Margot, Alexia... Merci Vasile et Hervé pour m'avoir aidé à essayer les plâtres des débuts du 9.4T : cryosonde, systèmes de gradients, préémissions, spikes, licence logiciel, reconstruction d'image : l'IRM peut réserver beaucoup de surprises.

Merci à toute l'équipe 1, habituée à me voir débarquer dans les bureaux : « Vous savez où est Toff ? ». Merci Toff pour notre coopération, pour ta passion communicative, pour ton intérêt dans le DTI.

Merci au 3ème étage de Clinatéc.

Merci à toute l'équipe zootechnie, Rolande, Vincente, Mylène, Guillaume, Clément, Julie ; c'était un plaisir de travailler avec vous. Merci Diane pour ton écoute, merci d'avoir toujours su gérer les demandes et contraintes, me permettant de travailler dans les meilleures conditions. Merci Cyril l'as des injections, tu m'as évité des journées éprouvantes !

Merci Vincent pour toutes nos discussions techniques, IRM, ou toutes autres. Merci pour tes conseils. Merci à Jean-Chri, Barbara, Alix, Arnaud, Thomas Céline, Laëticia et Bénédicte pour toutes les discussions, scientifiques ou non, que nous avons pu avoir.

Merci à tous mes amis grenoblois, avec lesquels j'ai passé de belles années.

Merci à ma famille de m'avoir toujours soutenu. Merci de m'avoir permis de faire mes études et d'avoir toujours été là pour moi. Merci Hugues. Merci Maman. Merci Papa.

Merci Sophie. Tu m'as accompagné tout au long de cette thèse, merci d'en avoir partagé les hauts et les bas, et d'avoir su me redonner la motivation quand j'en avais besoin. Merci d'être venu t'installer à Grenoble, et de t'être adaptée à mes contraintes et mes projets. Cette page se tourne, et il me tarde d'en découvrir de nouvelles avec toi.

TABLE DES MATIERES

Résumés (Français, anglais)	7
Liste abrégées	11
Introduction Générale	13

CHAPITRE 1

METHODOLOGIES DEVELOPPEES

<u>I - Imagerie de diffusion</u>	21
1.1 Phénomène de diffusion de l'eau.....	21
1.2 Mesure de la diffusion par RMN.....	23
1.2.1 Gradient de champ magnétique et déphasage des spins.....	23
1.2.2 Séquence Stejskal & Tanner.....	24
1.2.3 Coefficient de diffusion apparent (ADC).....	26
1.2.4 Propagateur moyen (EAP).....	27
1.3 Imagerie du tenseur de diffusion (DTI).....	28
1.3.1 Construction du tenseur.....	28
1.3.2 Paramètres DTI.....	30
1.4 Imagerie de l'ODF.....	32
1.4.1 Déconvolution Sphérique contrainte (CSD).....	34
1.4.2 Imagerie Q-ball.....	35
1.5 Optimisation des directions de diffusion.....	35
<u>II - Tractographie</u>	36
2.1 Tractographie DTI.....	38
2.2 Tractographie sur le modèle ODF.....	39
2.3 Limites et perspectives.....	40
2.3.1 Nouveaux développements.....	40
2.3.2 Choix du logiciel.....	40
2.3.3 Limites.....	41

<u>III - IRM cellulaire</u>	41
3.1 Principe et intérêt.....	41
3.2 Nanoparticules superparamagnétiques.....	42
3.2.1 Relaxivités.....	42
3.2.2 Effet de susceptibilité.....	43
3.3 Contrastes en IRM.....	44
3.3.1 Séquences T_2^*	44
3.3.2 Séquences T_2 et T_1	45
3.3.3 Contraste positif par effet de susceptibilité	45
<u>IV - Etat de l'art et nos stratégies</u>	46
4.1 Méthodologies développées.....	46
4.1.1 Imagerie 3D à haute résolution spatiale isotrope.....	46
4.1.2 Imagerie rapide EPI.....	47
4.1.3 Super-Résolution.....	52
4.1.4 Choix de l'imagerie DTI.....	52
4.1.5 Imagerie multimodale pour validation.....	53
4.2 Stratégie d'ensemble: de l'ex vivo à l'in vivo.....	54

CHAPITRE 2

CARACTERISATION DU MODELE GLIO6

Contribution au travail.....	59
Contexte scientifique.....	60
Articles scientifique.....	62

CHAPITRE 3

APPLICATION DE L'IMAGERIE DTI SUR LE MODELE MAP6-KO

Contribution au travail.....	95
Contexte scientifique.....	96
Articles scientifique.....	97

CHAPITRE 4

IN VIVO SRR ET APPLICATION SUR LE CERVEAU MAP6-KO

Contribution au travail.....	133
Contexte scientifique.....	134
Articles scientifique.....	135

CHAPITRE 5

IRM CELLULAIRE

Contribution au travail.....	161
Contexte scientifique.....	162
Articles scientifique.....	163

PERSPECTIVES ET FUTURS TRAVAUX	195
CONCLUSION	203
Communications.....	204
Références.....	206
Annexes	
- IRM cellulaire du modèle Glioblastoma.....	214
- IRM de cerveaux de rats irradiés au rayonnement synchrotron.....	219
- Tractographie HARDI vs DTI.....	223
- Anatomie du cerveau de souris.....	227

RESUME (*Français*)

La connaissance de l'anatomie du cerveau, de son organisation et des altérations des microstructures qui peuvent apparaître avec des pathologies cérébrales est essentielle pour comprendre et appréhender au mieux les maladies neurologiques. L'imagerie par résonance magnétique (IRM), avec notamment l'imagerie du tenseur de diffusion (DTI), permet de sonder de manière non invasive la microarchitecture cérébrale et s'est montrée essentielle pour détecter et quantifier les effets de diverses maladies neurologiques. La tractographie, qui consiste à reconstruire les paquets de fibres de la matière blanche du cerveau à partir d'acquisitions d'IRM de diffusion, s'est révélée un outil puissant de l'étude des connections du cerveau. Ces outils d'imagerie sont largement développés en clinique, mais aussi en recherche préclinique. Cependant, pour les applications sur rongeurs, elles deviennent difficiles à réaliser, à cause de la petite taille du cerveau. Cette thèse a pour but de développer des techniques d'IRM sur des modèles de neuropathologies chez la souris et le rat. Deux modèles animaux ont été étudiés plus particulièrement, un modèle de glioblastome humain chez la souris (modèle Gliob6), caractérisé par une forte migration des cellules tumorales, et un modèle souris apparenté à la schizophrénie (modèle MAP6).

Dans un premier temps, un développement du DTI 3D *ex vivo* à haute résolution spatiale a été mis au point. Le principe de la méthode repose sur les propriétés d'un agent de contraste paramagnétique qui diminue le temps de relaxation longitudinal T_1 . Les acquisitions peuvent être accélérées avec conservation du rapport signal sur bruit et permettent d'accéder à la haute résolution spatiale. Ce développement a permis de détecter et visualiser les voies de migrations des cellules tumorales dans le modèle Gliob6, et de caractériser par tractographie les déficits des faisceaux de la matière blanche et de leurs connectivités dans le modèle MAP6. Ces résultats ont été confirmés par d'autres modalités d'imagerie (microscopie de fluorescence, microscopie électronique, histologie). Cette méthodologie a permis de détecter des altérations neurologiques à l'échelle microscopique dans d'autres modèles animaux, notamment celui du rat irradié par rayonnement synchrotron.

D'autre part, dans le but d'obtenir des images 3D-DTI à haute résolution spatiale avec un temps d'acquisition qui demeure réalisable dans des protocoles *in vivo*, une méthode basée sur la reconstruction 3D à partir d'un ensemble d'images 2D a été développée : la Super-Résolution. Les images obtenues par Super-Résolution ont permis de reconstruire avec succès l'ensemble des tracts de la matière blanche des souris du modèle MAP6, avec des résultats similaires à ceux obtenus par DTI 3D *ex vivo*. Cette amélioration ouvre la voie de suivis longitudinaux, notamment pour réaliser des essais thérapeutiques innovants sur les modèles animaux étudiés.

Le dernier axe de cette thèse a porté sur le développement de l'IRM cellulaire. Le but étant, après marquage magnétique de cellules ayant un effet thérapeutique, de pouvoir détecter et quantifier ces cellules après injection dans le cerveau. Nous avons mis en place une nouvelle méthode basée sur la mesure des paramètres de relaxation T_2^* , T_2 et T_1 . Une mesure *in vitro* à différentes concentrations de cellules marquées permet d'identifier les zones de linéarité et de déduire les relaxivités cellulaires, paramètres que nous utilisons pour calculer les concentrations *in vivo*. L'IRM de susceptibilité magnétique (séquence « White Marker ») a été développée pour compléter cette méthode, dans le but de finement localiser les cellules marquées. Ce nouveau développement en IRM cellulaire a permis de détecter et quantifier pendant 14 jours des cellules thérapeutiques U937 dans un modèle de tumeur chez la souris. Les résultats ont été validés par microscopie de fluorescence, et confirment le potentiel de l'IRM cellulaire dans le suivi *in vivo* de nouvelles thérapies.

SUMMARY (*English*)

The knowledge of brain anatomy, organization and microstructural alterations that can occur in brain pathologies is essential to understand and apprehend neurological diseases. Magnetic resonance imaging (MRI), including diffusion tensor imaging (DTI), can probe noninvasively brain microarchitecture and is essential to detect and quantify the effects of various neurological diseases. Tractography, which rebuilds the fiber bundles of the white matter from diffusion weighted MRI acquisitions, has emerged as a powerful tool for the study of brain connections. These imaging tools are widely developed in the clinic, but also in preclinical research. However, for applications on rodents, they become difficult to achieve, due to the small size of the brain. This thesis aims to develop MRI techniques on neuropathology models in mice and rats. Two animal models were studied in particular: a model of human glioblastoma in mice (Gliob model), characterized by highly migrative tumor cells, and a mouse model related to schizophrenia (MAP6 model).

Initially, *ex vivo* DTI 3D with high spatial resolution was developed. The principle of the method is based on the properties of a paramagnetic contrast agent which decreases T_1 longitudinal relaxation time. Acquisitions can be accelerated with conservation of signal to noise ratio and provide access to high spatial resolution. This development has helped to detect and visualize the migration pathways of tumor cells in the Gliob model and to characterize by tractography the white matter bundles deficits in the MAP6 model. These results were confirmed by other imaging modalities (fluorescence microscopy, electron microscopy, histology). This methodology has resulted in the detection of neurological alterations at the microscopic scale in other animal models, including that of rat irradiated by synchrotron radiation.

Moreover, in order to get 3D DTI-high spatial resolution images with an acquisition time that remains achievable for *in vivo* protocols, a method based on 3D reconstruction from a set of 2D images was developed: the Super-Resolution. The images obtained by Super-Resolution successfully reconstruct the whole tracts of the white matter of MAP6-KO mice, with similar results to those obtained by DTI 3D *ex vivo*. This improvement paves the way for longitudinal studies, in particular for innovative therapeutic trials on animal models.

The last axis of this thesis focused on the development of cellular MRI. The aim is to detect and quantify therapeutic cells injected in the brain, after a magnetic labelling. We have introduced a new method based on the measurement of relaxation parameters T_2^* , T_2 and T_1 . *In vitro* measurement at different concentrations of labeled cells can identify areas linearity and deduce cell relaxivities, parameters we use to calculate the cell concentrations *in vivo*. The magnetic susceptibility (MRI sequence "White Marker") was developed in order to finely locate labeled cells. This new development in cellular MRI detected and quantified for 14 days therapeutic U937 cells in a tumor

model in mice. The results were validated by fluorescence microscopy, and confirm the potential of the cellular MRI to monitor new therapies *in vivo*.

Liste abrégations

AC : agent de contraste
ADC : coefficient de diffusion apparent
CSD : déconvolution sphérique contrainte
 $D_{//}$: diffusivité parallèle
 D_{\perp} : diffusivité perpendiculaire
DTI : imagerie du tenseur de diffusion
EAP : Ensemble Average Propagator
EEG : électroencéphalographie
EPI : écho planar imaging
FA : fraction d'anisotropie
FACT : fiber assignment by continuous tracking
Gd-DOTA : gadolinium-tetraazacyclododecanetetraacetic acid
GFA : fraction d'anisotropie généralisée
GFP : Green Fluorescent Protein
HARDI : imagerie de diffusion à haute résolution angulaire
ICP-MS : induced coupled plasma mass spectroscopy
IRM : imagerie par résonance magnétique
MAP : protéine associée aux microtubules
MAP6-KO : MAP6 knock out
MD : diffusivité moyenne
MEG : magnétoencéphalographie
NA : nombre d'accumulations
NMRD : Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion
NPs : nanoparticules
ODF : fonction de distribution de l'orientation
PAF : paraformaldéhyde
PEG : polyéthyléneglycol
PGSE : Pulsed Gradient Spin Echo
QA : anisotropie quantitative
QBI : imagerie Q-ball
RMN : résonance magnétique nucléaire
SNR : rapport signal sur bruit
SR : Super-Résolution
SRR : reconstruction par Super-Résolution
TE : temps d'écho

TEMP : tomographie d'émission monophotonique

TEND : tensor deflection

TEP : tomographie d'émission de positons

TR : temps de répétition

USPIO : ultra small iron oxide particle

INTRODUCTION GENERALE

Mon travail de thèse est centré autour de développements de techniques d'imagerie par résonance magnétique (IRM) en neurosciences, adaptées à des modèles animaux de type rongeur : souris et rats. Le but du travail est d'apporter des outils d'imagerie sensibles et précis pour visualiser et étudier d'une manière ciblée les altérations microscopiques de structures du cerveau dans le cas de différentes neuropathologies.

Les techniques développées dans cette thèse sont centrées autour de l'IRM de diffusion, une imagerie puissante pour sonder la microstructure du tissu dont les applications en neurosciences sont nombreuses, notamment pour l'étude de pathologies neurodégénératives et du cancer. Les développements réalisés dans ce travail concernent la mise en place d'outils mathématiques et de séquences radiofréquence innovantes et représentent un réel challenge car ils doivent être adaptés à la très petite taille du cerveau de souris (haute résolution spatiale) et au besoin d'effectuer des suivis longitudinaux *in vivo* (haute résolution temporelle).

Ma thèse s'est déroulée sous la direction du Dr Hana LAHRECH dans deux lieux successifs. Elle s'est initiée à l'Institut des Neurosciences de Grenoble (GIN), dans l'équipe 7 : Nanomédecine et Cerveau, dirigée par le professeur François Berger. Notre équipe a ensuite déménagé dans le nouveau centre de recherche CLINATEC, situé sur le site du CEA-LETI Grenoble. CLINATEC est un centre de recherche biomédicale "technologique translationnel" regroupant médecins, physiciens, biologistes et spécialistes en micro et nanotechnologies sur le campus MINATEC. Cette proximité permet d'imaginer des traitements et des méthodes de diagnostic et d'investigations physiopathologiques innovants, d'accélérer leur preuve de concept et leur transfert industriel au bénéfice des patients. Notre équipe INSERM UMR UA01, puis depuis janvier 2016 U1205 (Translational Technology Lab), est multidisciplinaire et une de ses thématiques de recherche principales est axée autour de l'étude du microenvironnement tumoral.

Afin de découvrir de nouveaux biomarqueurs diagnostiques, pronostiques et de réponse thérapeutique des glioblastomes, des approches de biologie cellulaire et moléculaire mettant en jeu des micro et nano-technologies détectables par imagerie ont été développées dans l'équipe. Dans ce contexte, mon rôle était de fournir des méthodes avancées en IRM permettant de détecter et de mieux comprendre les anomalies neurologiques dans des modèles animaux de glioblastome développés au laboratoire.

Pour réaliser les développements IRM, j'ai bénéficié de la plateforme d'IRM préclinique IRMaGe qui fait partie du réseau FLI (France Life Imaging) et se situe au GIN. La plateforme est composée d'IRM petit animal 4.7T, 7T et 9.4T dédiés aux rongeurs que j'ai utilisés tout au long de ma thèse. A CLINATEC j'ai aussi utilisé l'IRM 4.7T adaptée aux rongeurs, primates et cochons. Les deux laboratoires sont dotés d'équipements supplémentaires parcourant une large variété de modalités d'imagerie (microscopique de fluorescence et histologie). Ils possèdent leur propre animalerie, et des laboratoires de biologie cellulaire et moléculaire, offrant un environnement de travail idéal qui favorise les applications multidisciplinaires dans un même lieu.

Ce manuscrit de thèse est rédigé sous le format « articles ». Il est composé de quatre articles soumis, ou destinés à être soumis dans des journaux scientifiques internationaux. Ce choix de rédaction s'est fait afin de valoriser ce travail de thèse par des publications scientifiques à l'échelle internationale. Ces quatre articles retranscrivent fidèlement le déroulement de ma thèse et s'orientent tous vers le même but : l'application et/ou l'amélioration de méthodes IRM afin d'étudier, caractériser et comprendre les mécanismes biologiques et physiopathologiques mis en jeu dans des modèles animaux pertinents. Les outils d'imagerie ont été à chaque fois optimisés et dédiés à une problématique spécifique, mais grâce à nos connaissances des relations existantes entre le signal IRM et les fonctions biologiques, ces méthodes ont pu être utilisées dans d'autres études, comme ce fut le cas durant ma thèse avec de nombreuses collaborations (Annexe 2). De plus, ils ont été complétés et validés par d'autres modalités d'imagerie, notamment l'imagerie optique à deux photons, la microscopie électronique ou encore l'imagerie histologique.

L'introduction générale présente les problématiques liées au sujet de thèse et décrit le déroulement de cette thèse. Le premier chapitre fournit les bases scientifiques nécessaires pour comprendre les résultats obtenus dans les articles et décrit les choix scientifiques et stratégiques effectués pour répondre au mieux aux problématiques biologiques. Les chapitres deux à cinq reprennent les articles, avec un tableau récapitulatif spécifiant ma propre contribution, et une introduction permettant de présenter et de remettre dans le contexte scientifique l'article en question. Enfin, les perspectives et la conclusion rendent compte des avancées obtenues durant cette thèse, et de leur potentiel d'application que ce soit au sein de l'équipe ou dans le cadre de collaborations.

L'ensemble de cette thèse s'est déroulé sur des études précliniques que j'ai menées de manière autonome, après avoir obtenu mon certificat d'expérimentation animale de niveau 1. Mon travail de thèse ne fut pas purement méthodologique, mais il consista aussi à être capable de porter des projets multidisciplinaires dans le contexte souvent fastidieux des applications *in vivo*. L'expérimentation animale, qui permet une meilleure connaissance de la physiologie de notre organisme, est essentielle dans la compréhension et la lutte contre les maladies. En effet, le développement de médicaments efficaces est conditionné par notre compréhension de l'ensemble des processus physiopathologiques. De plus, les tests de médicaments sont essentiels pour évaluer leurs effets thérapeutiques ainsi que leurs effets secondaires. Ce besoin est particulièrement vrai dans les neurosciences, pour lesquelles la complexité du cerveau induit des problématiques toujours plus inextricables.

Il est aujourd'hui impossible d'avoir des modèles *in vitro* reproduisant la complexité du cerveau, ce qui rend l'utilisation de modèles animaux indispensable. La recherche animale a connu un essor au XX^{ème} siècle et a privilégié l'utilisation de rongeurs, notamment la souris, à cause de leur faible coût et de leur rapidité de reproduction. Les croisements de lignée et les travaux sur les modifications génétiques permettent aujourd'hui de disposer d'une grande variété de modèles animaux, capable de reproduire les symptômes d'une maladie neurologique particulière. De plus, la génétique permet aujourd'hui de cibler une protéine ou un gène avec précision afin d'observer son implication sur le phénotype final d'une souris. Cette grande variété de modèle animaux conjuguée aux techniques mettant en lumière les altérations biologiques, structurelles ou fonctionnelles liées à un gène ou à une protéine fournissent un fabuleux éventail d'outils pour la recherche neurologique. Cependant, ces modèles animaux doivent être accompagnés de techniques capables de mesurer spécifiquement les processus biologiques mis en jeu. L'imagerie médicale fait partie des techniques recherchées car elle ne détruit pas le tissu et donne une information spatiale.

Les premières méthodes d'imagerie se basaient sur la microscopie optique de tissus excisés. Puis, des imageries plus « spécifiques » sont apparues, avec notamment l'histologie, ou l'imagerie de fluorescence. Celles-ci permettent, en utilisant un marquage, de repérer une structure ou un « objet » biologique spécifique. Elles sont limitées par plusieurs facteurs : leur aspect invasif (travail sur des coupes du cerveau) empêchant la visualisation de processus dynamiques, et leur limitation à une visualisation 2D. Ces techniques restent cependant largement utilisées aujourd'hui, comme ce fut le cas pour valider nos résultats obtenus en IRM (chapitre 2, 3, 5).

Les techniques d'imagerie médicale prenant en compte l'information provenant des trois dimensions de l'espace semblent essentielles pour étudier le cerveau. L'imagerie à partir de rayons X, qui comprend la radiographie et le scanner (tomodensitométrie), permet d'avoir des images dont le contraste provient de l'absorption des rayons X par les tissus. Les images sont de très bonne qualité, et des études angiographiques peuvent aussi être effectuées après injection d'agent de contraste.

Cependant, ces rayonnements sont ionisants, et doivent être maîtrisés par les mesures de radioprotection. La tomographie d'émission monophotonique (TEMP) et la tomographie d'émission de positons (TEP) imagent un marqueur radioactif préalablement ingéré et donnent une imagerie spécifique, ciblée sur une activité métabolique ou moléculaire donnée. L'imagerie par ultrason, communément utilisée pour les échographies, bénéficie d'une grande accessibilité matérielle et d'une bonne résolution temporelle. Cependant, elle souffre d'une faible résolution spatiale et est très perturbée par les os, ce qui la rend peu pertinente pour l'imagerie cérébrale. L'électroencéphalographie (EEG) et la magnétoencéphalographie (MEG) mesurent respectivement les champs électriques et magnétiques dus à l'activité cérébrale. L'EEG renseigne sur l'activité neurophysiologique, et voit son champ d'application orienté principalement vers des mesures locales plutôt que de l'imagerie, généralement dans le cortex cérébral. La MEG utilise un ensemble de capteurs refroidis à l'hélium pour mesurer les champs magnétiques minimes émis par le fonctionnement des neurones. Elle reste peu développée, notamment à cause des difficultés de traitement du signal. Sa principale application porte sur l'épilepsie, où elle aide à localiser les foyers déclencheurs de crise.

Par rapport à toutes ces techniques, l'IRM présente de nombreux avantages pour l'imagerie cérébrale. Les rayonnements mis en jeu ne sont pas ionisants et sont des rayonnements radio. Son signal provient des noyaux d'hydrogène contenus dans l'eau, qui constitue le corps humain à 70%. Elle possède une bonne résolution spatiale, avec la possibilité d'acquérir des images en trois dimensions. En particulier, elle est devenue indispensable à la neuro-imagerie car cette technique non-invasive différencie les tissus mous du cerveau, se basant principalement sur les temps de relaxation T_1 et T_2 . Ces temps de relaxation donnent des différences de contraste entre matière blanche et matière grise, et sont à l'origine du succès de l'IRM.

Dans les années 1990, l'IRM s'est largement développée, à la fois du côté instrumentation (aimants avec un plus haut champ, système de gradients blindés plus intenses, système de shim automatisé, et bobine radiofréquence davantage homogène et sensible) et du côté méthodologique (développement de nouvelles séquences IRM mettant en jeu de nouveaux contrastes en relation avec les propriétés du tissu). De plus, l'introduction d'agents de contraste a permis d'ouvrir de nombreuses voies pour explorer la microvascularisation ou l'inflammation, et a permis récemment le développement de l'imagerie cellulaire et moléculaire. L'IRM peut fournir une information fonctionnelle, révélant quelles zones du cerveau sont activées et consomment de l'oxygène, à cause de la propriété paramagnétique de la désoxyhémoglobine, diminuée dans ces cas-là. Des informations moléculaires peuvent aussi être obtenues en IRM de spectroscopie, en mesurant les différences de fréquence de résonance, les « déplacements chimiques », propres à chaque molécule. La richesse de l'IRM réside dans cet assortiment de spécialités réunissant des informations structurelles, fonctionnelles ou encore moléculaires. Ces techniques sont encore récentes et en constante évolution, suivant les nouveaux traitements de données développés, ainsi que les avancées techniques.

Son principal inconvénient réside dans le peu de signal reçu, rendant sa sensibilité assez faible en général et poussant les constructeurs à des champs magnétiques de plus en plus intenses qui impliquent malheureusement une diminution du contraste entre les tissus et génèrent des artefacts d'image de plus en plus importants.

L'IRM de diffusion nous donne une information structurelle, en évaluant la géométrie et l'organisation de l'environnement du tissu exploré. Son principe repose sur la diffusion des molécules d'eau dans le tissu et permet de sonder sa microarchitecture (chapitre 1, 1). Des techniques dites de « tractographie » permettent même de reconstruire les paquets de fibres de la matière blanche (chapitre 1, 2). L'IRM de diffusion a montré son potentiel dans l'étude des connections entre les aires constituant le cerveau, ainsi que dans l'étude de maladies neurologiques affectant la microarchitecture du cerveau, en particulier les structures de la matière blanche. Nous verrons dans cette thèse que son intérêt est indiscutable dans l'étude de modèles de glioblastome et de schizophrénie chez la souris.

Cependant, l'utilisation de l'IRM chez le petit animal présente de nouveaux challenges par rapport aux applications cliniques. Pour donner un ordre d'idée, un cerveau de souris pèse environ 0.3 gramme, contre 1.3 kilogramme pour l'homme. Il devient donc très compliqué d'atteindre le même degré de détail que celui obtenu chez l'homme, le signal provenant d'un voxel étant diminué drastiquement. Les progrès atteints au niveau des différents éléments de la chaîne de mesure ont permis d'accéder à des résolutions spatiales compatibles avec l'imagerie du cerveau de souris. Ces améliorations ne sont pas sans prix et vont de pair avec une augmentation d'artefacts d'images devenant prépondérants (chapitre 1, 4.1.2), nuisant à l'interprétation des images, et qu'il faut donc absolument maîtriser et supprimer. Un des défis majeurs de l'imagerie sur petit animal consiste donc à obtenir des images de haute qualité tout en contrôlant les artefacts d'image inévitables à haut champ. Des techniques de correction et de reconstruction innovantes d'images sont proposées et peuvent être mises en place afin de contourner ces problèmes, comme ce fut le cas dans ce travail de thèse.

Dans le cadre de ma thèse, deux modèles animaux ont été étudiés plus particulièrement : un modèle de migration de cellules tumorales chez la souris (modèle Glioblastome) développé dans l'équipe, et un modèle apparenté à la schizophrénie chez la souris (modèle MAP6-KO) développé dans l'équipe « Physiopathologie du cytosquelette » dirigée par Annie Andrieux. Les résultats issus des développements IRM réalisés au cours de cette thèse ont permis d'apporter de nouveaux éléments quant à la compréhension des mécanismes biologiques mis en jeu dans ces modèles.

En effet, il a été possible dans le cas du modèle Glioblastome de détecter et visualiser les voies de migrations des cellules tumorales (chapitre 2), et dans le cas du modèle MAP6 de caractériser les

déficits des faisceaux de la matière blanche et de leurs connectivités (chapitre 3) en utilisant l'imagerie de diffusion *ex vivo* à haute résolution spatiale. Ces développements IRM de diffusion se sont également avérés pertinents pour l'étude d'autres altérations neurologiques dans plusieurs modèles animaux, notamment d'épilepsie ou d'irradiation par rayonnement synchrotron (Annexe 2).

Puis, le besoin d'aller vers l'imagerie *in vivo* pour de futurs tests thérapeutiques a nécessité le développement de traitements de données IRM innovants permettant de réduire les temps d'acquisition. Les algorithmes de reconstruction par Super-Résolution (chapitre 4) ont été développés, et des images de diffusion 3D à haute résolution spatiale ont été obtenues à partir d'acquisitions *in vivo*. Cette amélioration est un pas significatif ouvrant la voie à des suivis longitudinaux d'essais thérapeutiques innovants. Les résultats obtenus *ex vivo* chez la souris schizophrène MAP6-KO ont été retrouvés *in vivo* en appliquant ces techniques de Super-Résolution (chapitre 4).

Par ailleurs, des méthodes d'IRM utilisant des nanoparticules superparamagnétiques comme agent de contraste ou marqueur cellulaire ont été aussi mises au point. Les nanoparticules font l'objet de développements récents au sein de notre équipe pour des applications en médecine qui s'orientent à la fois vers le diagnostic et le traitement. L'IRM de susceptibilité magnétique a été développée dans le cadre de la mise au point d'une nouvelle méthode d'IRM cellulaire quantitative, basée sur la mesure des paramètres de relaxation T_2^* , T_2 et T_1 (chapitre 5). L'IRM cellulaire a été mise en place avec succès (chapitre 5) pour détecter et quantifier des cellules thérapeutiques marquées par des nanoparticules d'oxyde de fer en présence d'une tumeur chez la souris. Par ailleurs, les applications de l'imagerie cellulaire pour réaliser un suivi des cellules Glioblastome ne se sont pas avérées adaptées à cause de l'exocytose des nanoparticules au cours de la croissance tumorale et ceci pour deux types différents de nanoparticules (Annexe 1).

CHAPITRE 1

METHODOLOGIES DEVELOPPEES

Ce chapitre décrit le principe des méthodes IRM que j'ai approfondies afin de développer de nouveaux outils d'imagerie et qui sont focalisées autour de l'imagerie rapide, l'imagerie de diffusion et l'IRM cellulaire. Ce manuscrit ne traitera pas par ailleurs les bases de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et de l'IRM, laissant le lecteur, en cas de besoin, consulter des ouvrages de référence (Ernst, 1987, Callaghan, 1993).

I - Imagerie de diffusion

Le principe de l'imagerie de diffusion repose sur le phénomène de mouvement aléatoire, mouvement Brownien, de diffusion des molécules possédant au moins un noyau ayant un spin non nul. Le signal RMN devient sensible à la diffusion moléculaire seulement en présence d'inhomogénéités du champ magnétique statique B_0 , que l'on crée par application de gradients de champ magnétique, dits gradients de diffusion. L'IRM de diffusion concerne en général la diffusion des molécules d'eau et détecte les signaux des noyaux d'hydrogène, les protons. Dans le cerveau, la diffusion des molécules d'eau est contrainte par les différentes microstructures environnantes : elle peut être libre, dans un milieu comme le liquide céphalo-rachidien ou le long des axones des neurones, et elle peut être restreinte dans une cellule ou perpendiculairement à l'axe principal de l'axone d'un neurone. Comme le signal RMN de diffusion est sensible au parcours moyen de diffusion, la caractérisation de la diffusion de l'eau dans les tissus vivants comme le cerveau conduit, indirectement à la microarchitecture des tissus en question. Elle permet de sonder les variations des microstructures qui peuvent apparaître avec une pathologie cérébrale.

Cette première partie décrit le phénomène de diffusion des molécules d'eau et sa détection par IRM ainsi que les outils mathématiques permettant de traiter le signal de diffusion sont présentés.

1.1 Phénomène de diffusion de l'eau

De manière naturelle, les molécules connaissent un phénomène de diffusion sous l'influence de l'agitation thermique, c'est la diffusion Brownienne, qui a même lieu lorsqu'il n'y a pas de gradient de concentration des molécules. En considérant un grand ensemble de molécules, le traitement statistique peut s'y appliquer pour estimer le parcours moyen effectué par une molécule. Pour une molécule étant à l'origine à la position r_0 , sa probabilité de se retrouver à la position r après un temps de diffusion t est donnée par :

$$P(r|r_0, t) = \frac{1}{\sqrt{(4\pi D_0 t)^3}} \exp\left(\frac{-(r - r_0)^2}{4D_0 t}\right) \quad [\text{Eq. 1}]$$

Où D_0 est le coefficient de diffusion des molécules d'eau, et dépend de la température, de la viscosité du milieu et du poids de la molécule. Dans le cas d'une diffusion libre dans les 3 directions, on a $\langle r \rangle = 0$, car le déplacement moyen de l'ensemble des molécules est nul. L'équation 1 donne alors le parcours moyen quadratique σ :

$$\sigma^2 = \langle r^2 \rangle = 6D_0t \quad [\text{Eq. 2}]$$

Ainsi, le déplacement quadratique moyen (parcours moyen) d'un ensemble de molécules d'eau augmente linéairement avec le temps de diffusion (équation 2).

Dans un milieu non-libre, une molécule va rebondir sur des parois, et son déplacement quadratique moyen va être affecté par la géométrie du milieu. Pour un ensemble de molécules, la diffusion peut être entravée avec un déplacement quadratique moyen limité mais qui continue à augmenter en fonction du temps de diffusion avec une pente faible, ou alors la diffusion peut être restreinte avec le parcours moyen qui atteint une asymptote à partir d'un temps de diffusion relié à la taille du compartiment (figure 1).

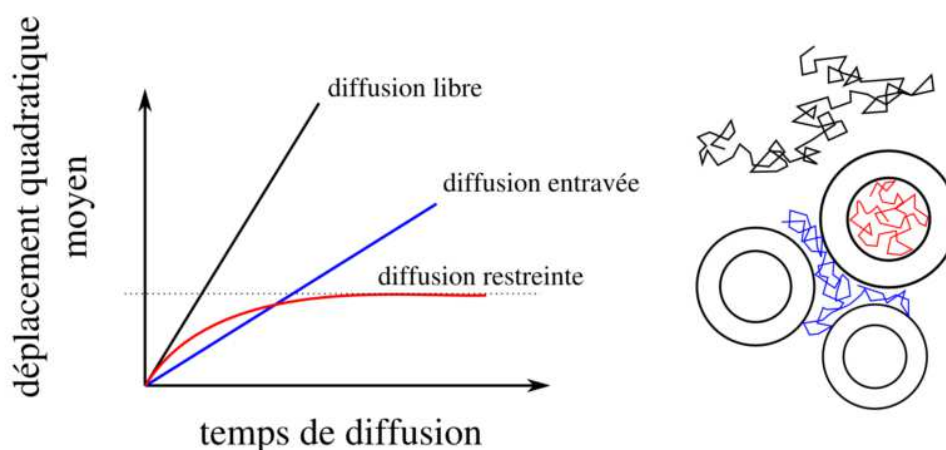


Figure 1. La mesure du déplacement quadratique moyen d'une particule permet d'évaluer son mode de diffusion et d'en déduire son environnement. Une particule libre (noir) ou entravée entre plusieurs obstacles (bleu) est caractérisée par un déplacement quadratique linéaire avec le temps. Dans le cas d'une diffusion restreinte (rouge), le déplacement quadratique atteint une asymptote, indiquant une molécule coincée dans une géométrie fermée.

Ici, il faut souligner l'importance du temps de diffusion pour lequel la mesure du déplacement quadratique moyen est effectuée. Par exemple, un temps trop court ne laissera pas le temps aux molécules de « sonder » la microarchitecture et les molécules seront considérées comme dans un milieu libre. Un temps assez élevé permettra aux molécules de parcourir tout l'espace du compartiment et conduira à la mesure de sa taille.

1.2 Mesure de la diffusion par IRM

Le phénomène de diffusion de l'eau est mesurable par RMN. Hahn avait constaté dans une expérience de spin écho (Hahn, 1950) que le signal RMN était atténué en présence d'inhomogénéités du champ magnétique statique B_0 , expliquant ainsi la sensibilité du signal RMN à la diffusion moléculaire en présence d'inhomogénéités de B_0 . Mais c'est Stejskal et Tanner en 1965 qui proposèrent l'utilisation astucieuse des gradients de champ magnétique pulsés pour rendre le signal sensible à la diffusion d'une manière contrôlée (Stejskal and Tanner, 1965).

1.2.1 Gradient de champ magnétique et déphasage des spins

L'IRM est constituée d'un aimant avec un champ magnétique statique B_0 qui a pour rôle de polariser l'aimantation du système, et le codage de l'espace est possible grâce à un système de gradients de champ magnétiques. Dans le champ magnétique statique, les molécules d'eau précessent à la fréquence de Larmor w_0 :

$$w_0 = -\gamma B_0 \quad [\text{Eq. 3}]$$

où γ est le rapport gyromagnétique de l'eau.

Lors de l'excitation des spins par une impulsion radiofréquence générée par un champ magnétique b_1 , seuls les spins ayant une fréquence de précession similaire à la fréquence d'excitation seront basculés et pourront donner du signal. Dans le cas de l'application d'un gradient de champ magnétique \vec{G} , le champ magnétique devient dépendant de l'espace, et c'est ainsi que la fréquence de précession des molécules d'eau w devient dépendante de leur position spatiale (\vec{r}) :

$$w(\vec{r}) = -\gamma B(\vec{r}) = -\gamma(B_0 + \vec{G} \cdot \vec{r}) \quad [\text{Eq. 4}]$$

Ces gradients de champ magnétique permettent alors de coder l'espace pour l'imagerie en délimitant une zone spécifique où l'intervalle regroupant les différents champs magnétiques $B(r)$, correspond à la bande fréquentielle d'impulsion radio fréquence.

La phase des spins dans un gradient de champ magnétique est décrite par :

$$\varphi(\vec{r}) = \int_0^t w(\vec{r}, t) dt = -\gamma(B_0 t + t \vec{G} \cdot \vec{r}) \quad [\text{Eq. 5}]$$

Durant l'application d'un gradient de champ magnétique, deux spins ayant deux positions spatiales différentes \vec{r}_1 et \vec{r}_2 sont déphasés l'un par rapport à l'autre par :

$$\Delta \varphi = \varphi(\vec{r}_1) - \varphi(\vec{r}_2) = \gamma t \vec{G} \cdot (\vec{r}_1 - \vec{r}_2) \quad [\text{Eq. 6}]$$

Les gradients de champ magnétique ne sont pas seulement utilisés pour le codage spatial de l'image, et ils ont aussi la capacité de rendre le signal IRM sensible aux mouvements des spins comme la vitesse des molécules d'eau dans la circulation sanguine (mouvements cohérents), ou encore la diffusion de l'eau, mouvement incohérent présent dans tous les tissus vivants. Une séquence IRM combine généralement un ensemble de gradients de champ magnétique, appliqués d'une façon temporelle et impulsionnelle sans pour autant qu'il n'y ait d'interférences entre eux.

1.2.2 Séquence Stejskal & Tanner

En 1965, Stejskal et Tanner développent la séquence Pulsed Gradient Spin Echo (PGSE), sensible à la diffusion moléculaire (Stejskal and Tanner, 1965). La mesure de la diffusion des molécules d'eau est rendue possible en ajoutant deux gradients de champ magnétique (gradients de diffusion) de part et d'autre de l'impulsion RF 180° d'une séquence de spin écho classique (figure 2). La mesure de diffusion est faite pour la direction spatiale dans laquelle est appliqué le gradient de diffusion. Les gradients de diffusion sont définis par leur durée δ , leur intensité g , et leur temps de séparation Δ . Dans la séquence Stejskal et Tanner

Le signal d'une séquence de spin écho classique, au temps d'écho TE, est donné par :

$$S(t = TE) = S_0 e^{\left(\frac{-TE}{T_2}\right)} \quad [\text{Eq. 7}]$$

Lors de l'application de gradients de diffusion, le signal répond alors à l'équation :

$$S(t = TE) = S_0 e^{\left(\frac{-TE}{T_2}\right)} e^{-i(\Phi_1 - \Phi_2)} \quad [\text{Eq. 8}]$$

Φ_1 et Φ_2 représentant la somme des phases de tous les spins d'un voxel durant l'application du premier et du deuxième gradient de champ magnétique (figure 2). Φ_1 et Φ_2 sont de signes inversés à cause de l'impulsion de refocalisation dans la séquence PGSE. Pour un spin considéré immobile, on a $\varphi_1 = \varphi_2$, alors que pour un spin qui change de position pendant le temps de séparation Δ , on a $\varphi_1 \neq \varphi_2$. On a pour l'ensemble des spins d'un voxel :

$$\Phi_1 - \Phi_2 = \sum \varphi_{1mobile} + \varphi_{1immobile} - \sum \varphi_{2mobile} + \varphi_{2immobile} = \sum \varphi_{1mobile} - \varphi_{2mobile} \quad [\text{Eq. 9}]$$

Ainsi, la différence de phase entre une séquence avec ou sans gradient de diffusion n'est pas la même. Plus le déphasage sera grand, plus le signal RMN sensible à la diffusion sera atténué.

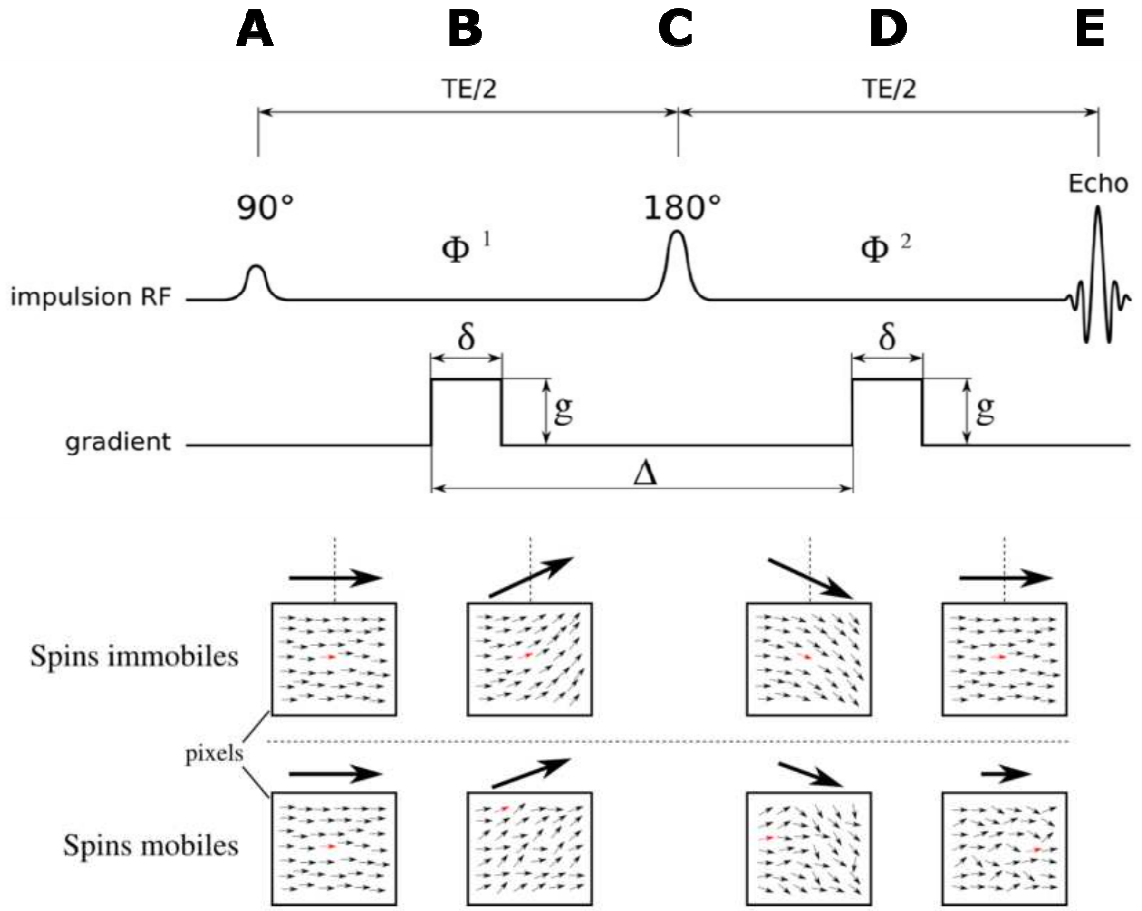


Figure 2. Diagramme de la séquence de Stejskal & Tanner. La première impulsion excite les spins des molécules d'eau (A). Durant le premier gradient de diffusion, les molécules d'eau diffusent dans la direction du gradient et accumulent un déphasage Φ_1 (B). Après une inversion à 180° (C), les molécules d'eau diffusent et accumulent un déphasage Φ_2 durant le deuxième gradient de diffusion (D). Le signal est ensuite recueilli (E). Les spins « statiques » ayant été retournés avec l'impulsion 180°, ils ont un déphasage Φ_2 opposé à Φ_1 et sont alors refocalisés lors de la mesure. Dans le cas des molécules « mobiles », c'est-à-dire qui se déplacent pendant les deux gradients de diffusion, Φ_1 et Φ_2 diffèrent et leurs spins sont déphasés. Dans ce cas, Φ_1 et Φ_2 diffèrent et le signal mesuré au temps d'écho (TE) est atténué.

Dans l'hypothèse d'un milieu homogène et isotrope, l'atténuation du signal s'écrit :

$$S(b) = S(b = 0)e^{-bD_0} \quad [\text{Eq. 10}]$$

Avec

$$b = \gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) \quad [\text{Eq. 11}]$$

b est le facteur de gradient et il s'exprime en s/mm^2 .

Le coefficient de diffusion D_0 peut alors s'écrire :

$$D_0 = -\frac{1}{b} \ln \left(\frac{S(b)}{S(b=0)} \right) \quad [\text{Eq. 12}]$$

1.2.3 Coefficient de diffusion apparent (ADC)

En utilisant une séquence de Steskal et Tanner, avec deux valeurs de b (une nulle, et une non-nulle), on peut, à partir de l'équation 12, retrouver le coefficient de diffusion de l'eau (figure 3). Cependant, comme expliqué auparavant, le mouvement de diffusion d'une molécule d'eau est affecté par son environnement. La mesure de diffusion effectuée rend compte du coefficient de diffusion apparent (ADC) (Lebihan et al., 1986), qui est directement lié à la microarchitecture du cerveau. Dans le cas où la diffusion n'est pas libre, mais contrainte ou restreinte, on aura un ADC inférieur à D_0 .

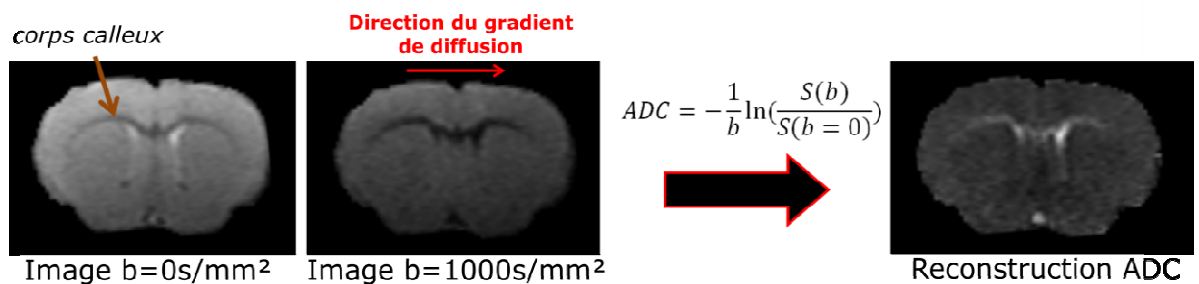


Figure 3. Exemple de calcul d'une carte d'ADC. Une image coronale d'un cerveau de souris est obtenue *in vivo* avec une $b=0$ et $b=1000 \text{ s/mm}^2$ (IRM 9.4T, séquence EPI, résolution $120 \times 120 \times 360 \mu\text{m}^3$). Le gradient de diffusion horizontal est appliqué (flèche rouge), sens des fibres du corps calleux dans lequel les molécules d'eau diffusent librement (perte de signal). La reconstruction de la carte d'ADC propre à cette direction de diffusion est obtenue et montre une plus grande valeur d'ADC dans le corps calleux pour une direction de diffusion horizontale.

Par le passé, l'imagerie de diffusion se limitait à mesurer l'ADC dans une seule direction de l'espace. Des mesures d'ADC dans plusieurs directions permettent de mieux décrire le phénomène de diffusion dans le tissu et d'estimer l'anisotropie du milieu. Ces valeurs d'ADC, moyennant des hypothèses théoriques et connaissances a priori peuvent être reliées à la microarchitecture du tissu. Par exemple, si on se place dans la matière blanche, une direction de gradient de diffusion parallèle ou perpendiculaire à la direction des fibres (ensemble des axones des neurones) rendra compte respectivement d'une diffusivité libre, ou restreinte.

Mais attention, ceci n'est vrai que pour des valeurs de temps de diffusion permettant la mesure de la restriction. En effet si les temps de diffusion sont très courts (parcours moyen d'une

molécule largement inférieur à la taille du compartiment), on mesurera un ADC égal à D_0 dans n'importe quelle direction, ce qui ne donne aucune information sur la microarchitecture.

1.2.4 Propagateur moyen (EAP)

Le propagateur moyen, désigné EAP dans ce manuscrit (pour l'anglais Ensemble Average Propagator), est une fonction que décrit entièrement le phénomène de diffusion des molécules d'eau dans un voxel. L'EAP (noté P dans nos équations) se définit par

$$P(r, \tau) = \int_V p(r_0 + r; r_0, \tau) dr_0 \quad [\text{Eq. 13}]$$

Où $p(r_0 + r; r_0, \tau)$ représente la probabilité qu'une molécule initialement à la position r_0 se déplace r_0+r pendant le temps de diffusion τ , et V est le volume total d'un voxel. La représentation 3D de l'EAP permet de facilement se rendre compte de la relation entre diffusion de l'eau et microarchitecture (figure 4).

Dans le cas d'un milieu isotrope, l'ADC sera indépendant de la direction de diffusion choisie et l'EAP sera une sphère. Dans le cas de fibres de la matière blanche anisotrope, l'EAP est une ellipse (figure 4). Cependant, pour un milieu plus complexe, l'EAP aura alors une forme plus complexe, avec des minimums et des maximums de diffusivité. Dans tous les cas, l'EAP reflète la microstructure du tissu mesuré.

Le but des applications de diffusion est de décrire au mieux l'EAP de tous les voxels pour retranscrire la microarchitecture du tissu. Cependant, il est impossible de directement mesurer l'EAP par IRM car il faudrait faire des acquisitions de diffusion dans toutes les directions de l'espace. Différents modèles mathématiques de reconstruction existent et donnent une approximation de l'EAP à partir des acquisitions IRM. Ces modèles se basent sur des mesures d'ADC dans plusieurs directions de l'espace pour décrire la diffusion des molécules d'eau d'un voxel. Ils diffèrent par leur niveau de simplification de l'EAP (De Santis et al., 2011).

Seuls deux types de formalisme seront étudiés dans cette thèse : le modèle d'imagerie du tenseur de diffusion qui permet de décrire la diffusion des molécules d'eau à partir d'un petit nombre d'acquisitions, et le modèle de l'ODF (fonction de distribution de l'orientation) qui est plus complet mais nécessite un plus grand nombre d'acquisitions.

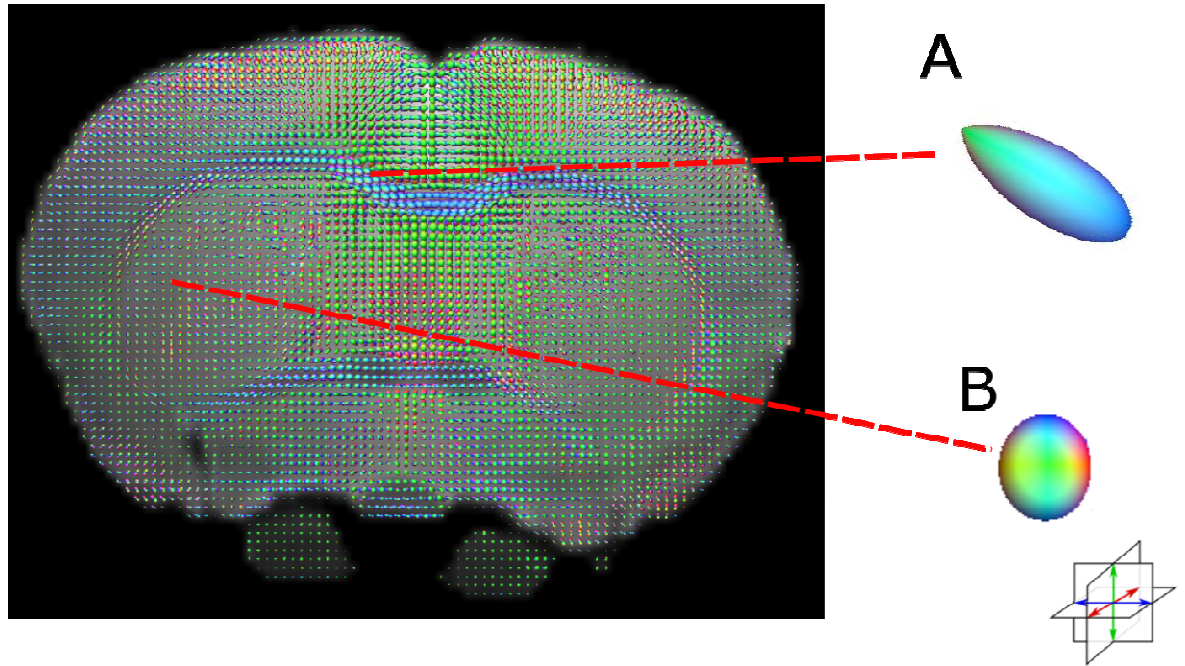


Figure 4. Cartographie des EAP pour une coupe coronale d'un cerveau de souris. La diffusion dans les fibres de la matière blanche du corps calleux se fait de manière anisotrope. Les fibres du corps calleux sont orientées horizontalement, les molécules d'eau coincées dans cette structure ont donc avec une diffusion privilégiée dans la direction latérale et le voxel se caractérise par une EAP allongée (A). A l'inverse, dans le striatum, la diffusion n'a pas de direction privilégiée et l'EAP est sphérique (B). (Acquisition DTI à 9.4T sur cerveau de souris fixé. Paramètres d'acquisition : séquence spin écho avec 6 directions de diffusion, $b=1500 \text{ s/mm}^2$, résolution spatiale= $80 \times 80 \times 80 \mu\text{m}^3$)

1.3 Imagerie du tenseur de diffusion (DTI)

1.3.1 Construction du tenseur

Le formalisme le plus répandu est le DTI où la diffusion est décrite par un tenseur (équation 14). Dans ce cas, l'EAP est une fonction gaussienne.

$$[D] = \begin{pmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{pmatrix} \quad [\text{Eq. 14}]$$

Le tenseur de diffusion est une matrice symétrique et positive car les diffusivités sont positives, et leurs intensités sont les mêmes dans une direction et dans la direction opposée (équation 15).

$$[D] = \begin{pmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{xy} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{xz} & D_{yz} & D_{zz} \end{pmatrix} \quad [\text{Eq. 15}]$$

Par conséquent, le facteur de gradient b peut lui aussi s'écrire sous une forme tensorielle, symétrique :

$$[b] = \begin{pmatrix} b_{xx} & b_{xy} & b_{xz} \\ b_{yx} & b_{yy} & b_{yz} \\ b_{zx} & b_{zy} & b_{zz} \end{pmatrix} \quad [\text{Eq. 16}]$$

L'équation 10 peut alors être étendue au cas tensoriel :

$$S(b) = S_0 e^{-[b][D]} = S_0 e^{-(b_{xx}D_{xx} + b_{yy}D_{yy} + b_{zz}D_{zz} + 2b_{xy}D_{xy} + 2b_{xz}D_{xz} + 2b_{yz}D_{yz})} \quad [\text{Eq. 17}]$$

Les valeurs de facteur de gradient sont fixées par l'expérimentateur. Cette équation a six inconnues qui correspondent aux valeurs de diffusivité du tenseur de diffusion. Il faut donc effectuer au moins six mesures de diffusion avec différentes directions de gradient pour la résoudre, ainsi qu'une mesure du signal S_0 sans pondération en diffusion. Considérons une expérience avec k ($k > 6$) acquisitions de diffusion ayant des directions de diffusion différentes, et une acquisition sans pondération de diffusion. On a alors :

$$[S] = [B] \cdot [D] \quad [\text{Eq. 18}]$$

Avec :

$$[b] = \begin{pmatrix} b_{xx}^1 & b_{yy}^1 & b_{zz}^1 & 2b_{xy}^1 & 2b_{xz}^1 & 2b_{yz}^1 \\ b_{xx}^2 & b_{yy}^2 & b_{zz}^2 & 2b_{xy}^2 & 2b_{xz}^2 & 2b_{yz}^2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ b_{xx}^k & b_{yy}^k & b_{zz}^k & 2b_{xy}^k & 2b_{xz}^k & 2b_{yz}^k \end{pmatrix}, [S] = \begin{pmatrix} \ln\left(\frac{S_1}{S_0}\right) \\ \ln\left(\frac{S_2}{S_0}\right) \\ \vdots \\ \ln\left(\frac{S_k}{S_0}\right) \end{pmatrix}, [D] = \begin{pmatrix} D_{xx} \\ D_{yy} \\ D_{zz} \\ D_{xy} \\ D_{xz} \\ D_{yz} \end{pmatrix} \quad [\text{Eq. 19}]$$

On peut donc retrouver le tenseur de diffusion :

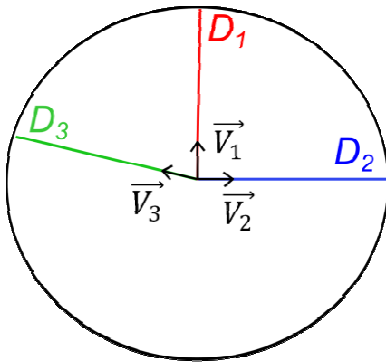
$$[D] = [b^{-1}] \cdot [S] \quad [\text{Eq. 20}]$$

La résolution de ce système linéaire permet d'obtenir les six valeurs de diffusivité. Afin de s'affranchir du repère $(\vec{x}, \vec{y}, \vec{z})$ dans lequel l'acquisition a été faite, on procède à la diagonalisation du tenseur de diffusion.

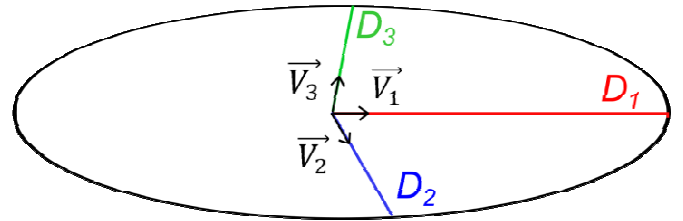
$$[D] = \begin{pmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{xy} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{xz} & D_{yz} & D_{zz} \end{pmatrix}_{(\vec{x}, \vec{y}, \vec{z})} = \begin{pmatrix} D_1 & 0 & 0 \\ 0 & D_2 & 0 \\ 0 & 0 & D_3 \end{pmatrix}_{(\vec{V}_1, \vec{V}_2, \vec{V}_3)} \quad [\text{Eq. 21}]$$

Le tenseur est alors simplifié et contient trois valeurs propres ($D_1 \geq D_2 \geq D_3$) qui correspondent aux valeurs de diffusivité dans le repère composé des trois vecteurs propres ($\vec{V}_1, \vec{V}_2, \vec{V}_3$). Dans la littérature D_1, D_2 et D_3 sont aussi appelés λ_1, λ_2 et λ_3 .

Dans un milieu isotrope, ces trois valeurs sont égales. Dans un milieu anisotrope, la diffusivité maximale D_1 correspond à une diffusion plus libre dans la direction \vec{V}_1 (le vecteur principal) tandis que la diffusivité minimale D_3 traduit une diffusion plus restreinte dans la direction \vec{V}_3 (figure 5).



milieu isotrope



milieu anisotrope

Figure 5. Définition des valeurs du tenseur DTI d'un voxel dans un milieu isotrope, et un milieu anisotrope. La valeur propre D_1 , associée au vecteur \vec{V}_1 , représente la plus grande diffusivité, tandis que D_2 et D_3 sont les diffusivités plus petites associées à \vec{V}_2 et \vec{V}_3 . Dans un milieu isotrope, D_1, D_2 et D_3 sont équivalents.

1.3.2 Paramètres DTI

A partir de ces 6 paramètres issus du tenseur de diffusion, de multiples informations peuvent être obtenues. Ainsi et afin d'illustrer au mieux ce tenseur, plusieurs paramètres ont été définis qui en général se résument à comparer les valeurs propres entre elles ou encore à identifier des directions de diffusion privilégiées. Les plus répandus sont :

Diffusivité moyenne (MD) :

$$\text{MD} = \frac{D_1 + D_2 + D_3}{3} \quad [\text{Eq. 22}]$$

Souvent utilisée pour décrire un milieu isotrope, sa valeur peut donner une information sur la taille du compartiment.

Diffusivité parallèle ($D_{//}$) :

$$D_{//} = D_1 \quad [\text{Eq. 23}]$$

et Diffusivité perpendiculaire (D_{\perp}) :

$$D_{\perp} = \frac{D_2 + D_3}{2} \quad [\text{Eq. 24}]$$

Particulièrement exploitées pour décrire des milieux anisotropes, comme la matière blanche du cerveau

Fraction d'Anisotropie (FA) :

$$FA = \sqrt{\frac{3}{2}} \sqrt{\frac{(D_1 - MD)^2 + (D_2 - MD)^2 + (D_3 - MD)^2}{D_1^2 + D_2^2 + D_3^2}} \quad [\text{Eq. 25}]$$

La FA est un paramètre scalaire qui décrit le degré d'anisotropie de la diffusion et indirectement celui de son environnement reflétant la microarchitecture du tissu. Sa valeur est comprise entre 0 et 1. Les valeurs de FA tendant vers 0 caractérisent un tissu isotrope, et celles tendant vers 1 un tissu anisotrope, comme la matière blanche du cerveau. De plus, en associant la FA au vecteur \vec{V}_1 , l'imagerie FA-couleur permet de décrire la direction de diffusivité principale d'un voxel en y associant un code couleur (figure 6).

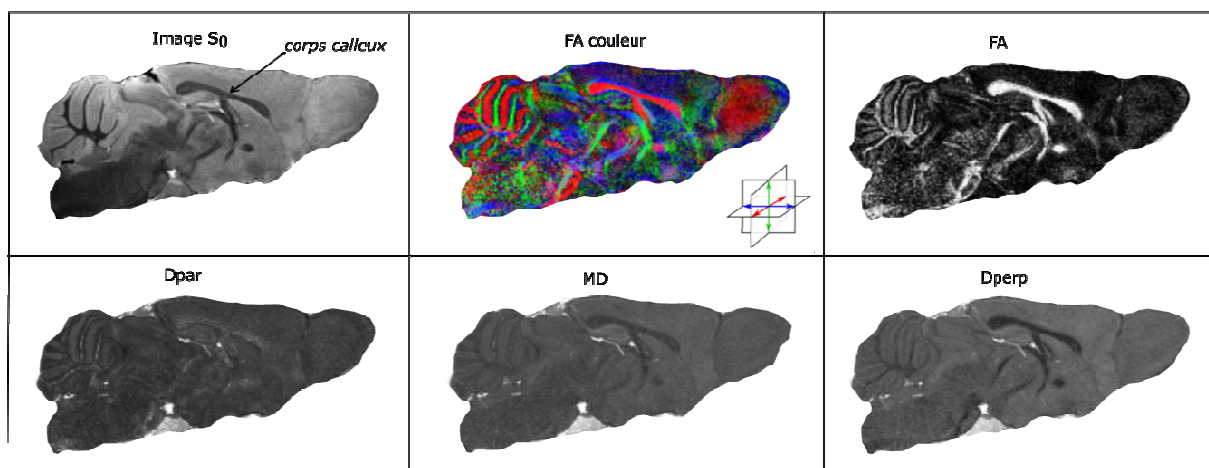


Figure 6. Cartographies d'une coupe sagittale du cerveau de souris obtenues à partir de l'imagerie DTI. L'image S_0 a été acquise sans pondération en diffusion. La direction de diffusivité principale est décrite dans l'image FA-couleur (vert = dorso-ventral, rouge = latéral, bleu = antéro-postérieur). Le corps calleux, principale structure de la matière blanche, est définie par des grandes valeurs de FA et de $D_{//}$ et une faible valeur de D_{\perp} . (Images DTI obtenues à 7T sur cerveau de souris fixé. Paramètres d'acquisition : séquence spin écho avec 6 directions de diffusion, $b=1500$ s/mm², résolution spatiale= $80 \times 80 \times 80 \mu\text{m}^3$).

1.4 Imagerie de l'ODF

Dans certaines situations, le DTI n'est plus suffisant pour rendre compte des phénomènes de diffusivité présents dans un voxel. C'est le cas dans des géométries complexes, comme les croisements de fibres de la matière blanche, où l'EAP est composé de plusieurs maximums de diffusivité. L'hypothèse d'une diffusivité gaussienne selon une direction principale sur laquelle repose le DTI s'avère fautive dans ces structures complexes. Pour le cerveau humain, l'estimation du nombre de voxels contenant des croisements de fibres varie entre un tiers et deux tiers des voxels (Behrens et al., 2007, Jeurissen et al., 2013).

Dans ce cas, un modèle plus complexe pour évaluer l'EAP est nécessaire. Le modèle définissant la fonction de distribution de l'orientation (ODF) traduit la probabilité qu'une molécule d'eau diffuse dans une direction donnée. L'ODF peut être vu comme l'intégration de l'EAP sur un angle solide. Pour une direction donnée, représentée par le vecteur u , elle s'écrit (Tuch, 2004) :

$$ODF(u) = \frac{1}{Z} \int_V P(r, \mathbf{u}) dr \quad [\text{Eq. 26}]$$

Où Z est un terme de normalisation, P est l'EAP (équation 13) et V le volume d'un voxel. Pour une direction donnée, l'ODF est la projection de l'EAP sur cette direction.

L'ODF est un modèle pertinent pour étudier les tissus à géométrie complexe. Elle peut être représentée sous forme d'une surface, montrant clairement les directions de diffusivité principales dans un voxel donné (figure 7).

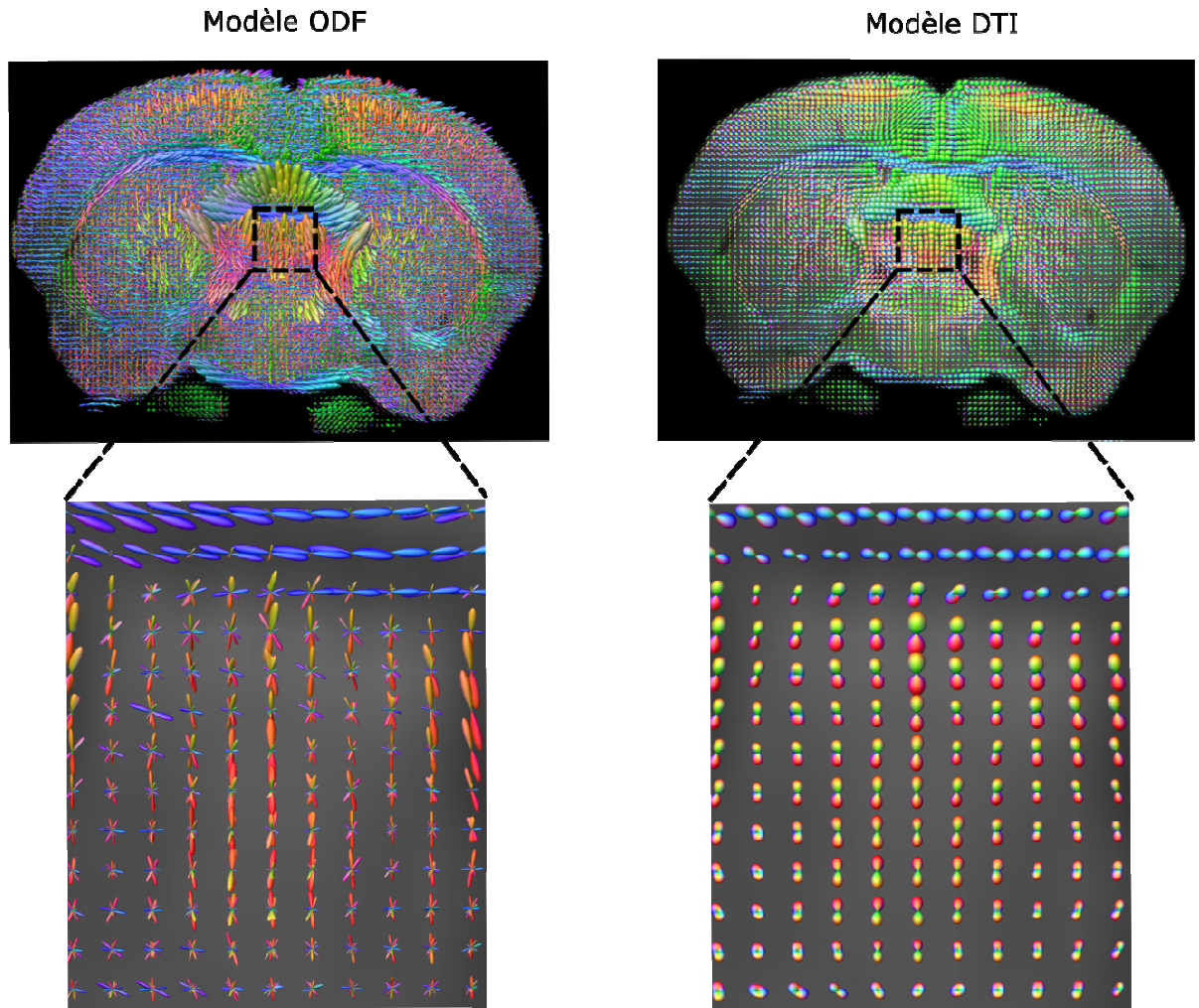


Figure 7. Comparaison des cartographies d'EAP obtenues à partir des modèles ODF et DTI pour la même coupe coronale d'un cerveau de souris. Pour la reconstruction DTI, l'EAP ne définit qu'une direction principale, et donne moins de détails que la reconstruction ODF qui peut retranscrire plusieurs maximums de diffusivités (partie zoomée).

Dans le cadre du modèle ODF, il faut échantillonner plus précisément la sphère de diffusion, avec un grand nombre de directions de diffusion : c'est l'imagerie HARDI (imagerie de diffusion à haute résolution angulaire). Les différents minimums/maximums de diffusivité contenus dans un même voxel peuvent alors être résolus et l'EAP des tissus complexes reconstruite avec succès. Cette imagerie est coûteuse en temps, car elle nécessite de répéter l'acquisition pour un grand nombre de directions de diffusion. Le terme d'HARDI ne concerne que le type d'acquisition utilisé, mais les données peuvent être traitées avec différents algorithmes. Au cours des dernières années, de nombreux modèles sont apparus : la modélisation par de multiples tenseurs (Tuch et al., 2002), par harmonique sphérique (Alexander et al., 2002), par déconvolution sphérique contrainte (CSD) (Tournier et al., 2004), l'imagerie Q-ball (Hess et al., 2006, Tuch, 2004) ou encore l'imagerie du spectre de diffusion (Wedeen et al., 2008).

Ces algorithmes sont difficiles à comparer, car souvent, ils nécessitent une acquisition avec des paramètres spécifiques. Être capable d'évaluer la supériorité d'un algorithme est à mon sens compliqué, car il faut prendre en compte les différences entre les valeurs de b utilisées ainsi que le nombre de directions de gradients de diffusion. Il devient alors difficile de confronter deux reconstructions dont le temps d'acquisition peut varier d'un facteur dix. De plus, le critère du choix de l'algorithme dépend de la problématique en question. Dans ce chapitre, nous proposons de décrire deux théories qui nous semblent se démarquer par leur temps d'acquisition relativement abordable associés à une bonne qualité de reconstruction : le CSD et l'imagerie Q-ball (QBI).

1.4.1 Déconvolution Sphérique contrainte (CSD)

Cette théorie s'appuie sur le principe de déconvolution sphérique (Tournier et al., 2004). On considère que chaque population de fibres de matière blanche dans un voxel donné possède les mêmes caractéristiques de diffusion, la direction mise à part.

L'atténuation du signal lors de la mesure de diffusion, notée R peut être représentée au niveau d'une fibre comme une fonction axisymétrique $R(\theta)$, où θ est l'angle de la fibre. Ainsi, dans un voxel contenant plusieurs orientations de fibres, le signal pourra s'écrire sous la forme :

$$S(\theta) = \sum_i f_i \hat{A}_i R(\theta) \quad [\text{Eq. 27}]$$

Avec f_i la fraction de fibre numero i , \hat{A}_i l'opérateur permettant de projeter dans la direction des fibres i , et φ l'angle azimut de référence. Cette somme peut également s'exprimer comme une convolution sur la sphère unité de la fonction d'atténuation $R(\theta)$ avec l'ODF :

$$S(\theta, \varphi) = \text{ODF}(\theta, \varphi) \otimes R(\theta) \quad [\text{Eq. 28}]$$

Un exemple est donné dans la figure 8, dans le cas d'un croisement de deux populations de fibres. Si $R(\theta)$ est connu, alors on peut retrouver l'ODF en faisant une déconvolution sphérique. Cette déconvolution se fait sous forme matricielle.

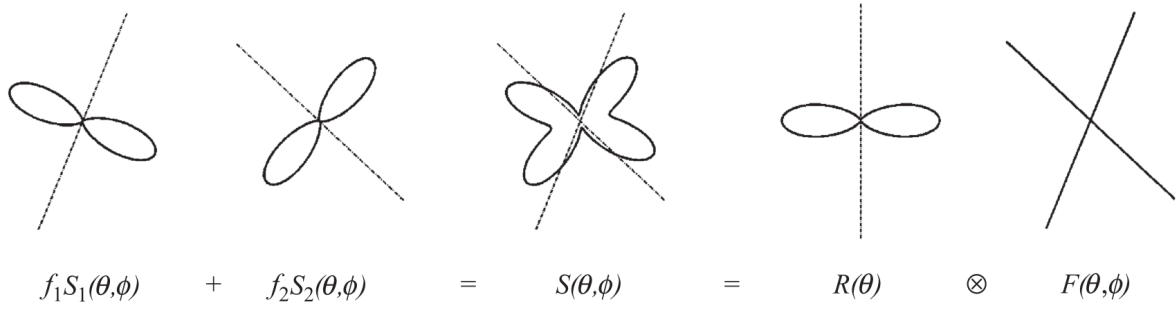


Figure 8. Le cas de la détection du croisement de deux paquets de fibres par la méthode CSD. Le signal mesuré $S(\theta)$ vient de la somme du signal provenant des deux paquets de fibres, et l'on considère les deux paquets égaux ($f_1 = f_2$). Il peut être vu comme la convolution du signal mesuré pour un paquet de fibres dans l'orientation axiale $R(\theta)$ et la fonction de densité d'orientation des fibres $F(\theta, \phi) = \text{ODF}(\theta, \phi)$. Image inspirée de (Tournier et al., 2004).

1.4.2 Imagerie Q-ball

Cette théorie s'appuie sur la transformée de Radon sphérique (ou Funk Radon Transform : FRT), qui consiste en une transformation intégrale sur une sphère. Elle mesure le signal de diffusion dans l'espace réciproque de diffusion, comme expliqué dans (Tuch, 2004).

De ces données, on peut calculer l'ODF pour les différentes directions. Celle-ci correspond à la somme des signaux de diffusion obtenus dans les directions du plan perpendiculaire à la direction étudiée et se traduit par l'équation

$$\text{ODF}(\vec{u}) = \frac{1}{Z} \text{FRT}(S(\vec{w})) = \frac{1}{Z} \int_{\vec{w} \in u^\perp} S(\vec{w}) \delta(|\vec{w}| - r') d\vec{w} \quad [\text{Eq. 29}]$$

Approximation de l'ODF dans la direction u évaluée à un rayon r' , avec Z un coefficient de normalisation

1.5 Optimisation des directions de diffusion

Que ce soit pour les acquisitions HARDI ou DTI, la répartition des directions de diffusion est un paramètre important qui questionne sur la meilleure stratégie d'échantillonnage de la sphère de diffusion. Dans le cas d'acquisitions à valeur de b constante, le modèle proposé par (Jones et al., 1999), inspiré de la répartition de charge électrique, reste le plus utilisé. En se plaçant sur une sphère, les extrémités des différentes directions de gradients diffusion sont réparties comme des charges électriques soumises à la force de Coulomb (figure 9), une force de répulsion dont l'intensité d'action

est proportionnelle à la distance entre deux charges. Le principe d'échantillonnage consiste donc à minimiser l'ensemble de ces forces afin d'obtenir une distribution homogène des charges sur la sphère. Ce modèle a l'avantage d'être applicable à n'importe quel nombre de directions de diffusion. La problématique des directions de diffusion est de moins en moins visible aujourd'hui pour l'expérimentateur, car les logiciels actuels, notamment sur les systèmes Bruker, calculent automatiquement la répartition d'un nombre quelconque de directions.

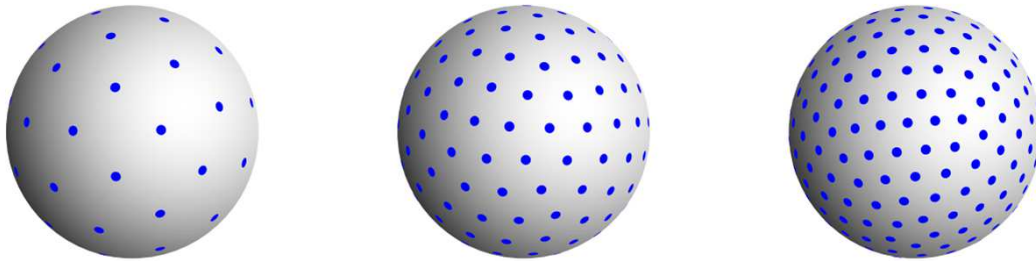


Figure 9. Exemple de répartition des directions de diffusion sur une sphère. Afin d'échantillonner d'une manière homogène la sphère de diffusion, la méthode de la minimisation de l'énergie de répulsion électrostatique est utilisée pour 25, 75 et 125 directions. Figure inspirée de la thèse d'Emmanuel Caruyer 2012.

II - Tractographie

La tractographie (aussi appelée imagerie *fiber tracking*) consiste à reconstruire les fibres de la matière blanche du cerveau à partir de l'imagerie de diffusion avec plusieurs directions de gradients de champ magnétique.

L'anisotropie et la direction des fibres sont révélées par les acquisitions dans les différentes directions spatiales. A partir des données de diffusion, il devient possible de retracer la trajectoire des fibres de la matière blanche dans le cerveau (figure 10). En effet, c'est à partir d'un modèle de reconstruction spécifique mettant en jeu un algorithme de tractographie, appliqué au modèle de diffusion DTI ou ODF, que les fibres de la matière blanche sont construites, voxel par voxel.

La tractographie par IRM est un outil unique en clinique, le seul permettant de visualiser les fibres de la matière blanche de manière non-invasive. Elle est désormais utilisée par les chirurgiens pour délimiter les tracts intangibles avant une résection (Berman, 2009, Romano et al., 2009, Buchmann et al., 2011, Dimou et al., 2013) et peut même être appliquée en temps réel sur des IRM interventionnelles. Son champ d'application s'étend aussi vers le diagnostic de maladies affectant la matière blanche

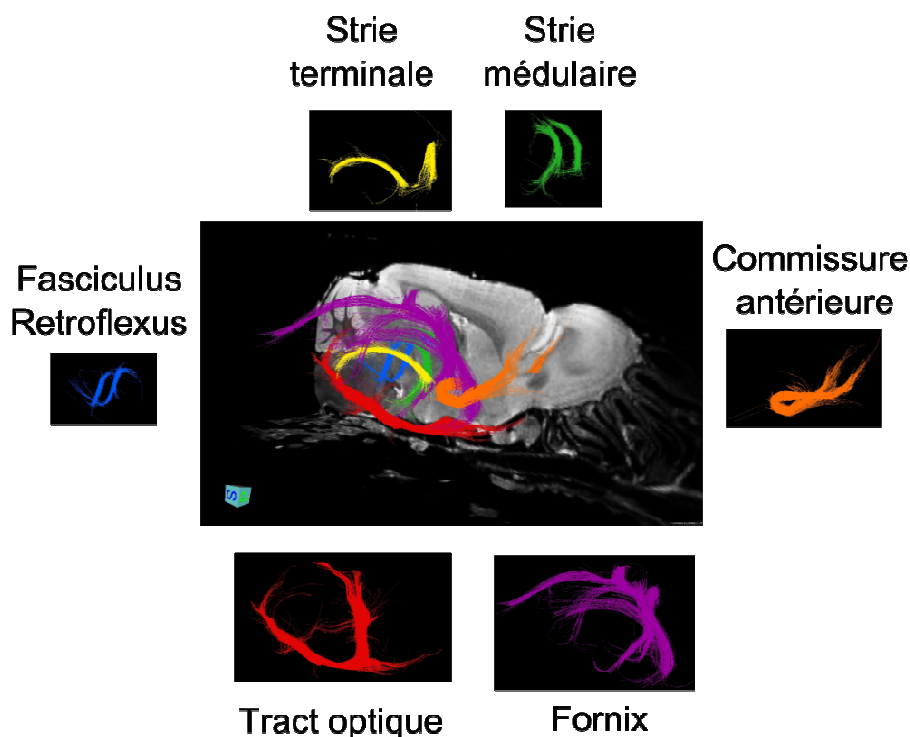


Figure 10. Tractographie d'un cerveau de souris. Différentes structures de matière blanche sont sélectionnées en délimitant des régions d'intérêts sur les images haute résolution 3D. Une représentation couleur permet de bien différencier ces structures qui sont représentées en 3D sur une coupe sagittale. (Images DTI obtenues à 7T sur cerveau de souris fixé. Paramètres d'acquisition : séquence spin écho avec 6 directions de diffusion, $b=1500$ s/mm², résolution spatiale=80x80x80 μm^3).

Les algorithmes de reconstruction d'imagerie de tractographie peuvent être classés selon deux catégories : les algorithmes dits déterministes, et les algorithmes dits probabilistes. Les algorithmes déterministes reconstruisent les fibres de la matière blanche, selon des critères d'anisotropie et d'angulation du vecteur principal, calculé entre deux voxels voisins (figure 11 et 12). Les algorithmes probabilistes se basent sur une itération de reconstructions déterministes et évaluent la probabilité qu'ont les voxels du cerveau d'être connectés à un voxel d'origine. Ces derniers nécessitent de longs temps de calculs, cependant ils ont l'avantage d'être moins sensibles au bruit et plus performants pour détecter les croisements de fibres. Ce type de reconstruction, rarement appliqué, n'a pas été utilisé durant mon travail de thèse et ne sera pas décrit ici.

Concernant la méthode déterministe, au cours des quinze dernières années, de nombreux algorithmes ont été développés, utilisant le même principe général.

Dans le cas d'un voxel avec une diffusion anisotrope, une fibre va pouvoir s'initier, ayant pour direction celle du maximum de diffusivité d'un voxel. Puis, si le voxel désigné par la direction incidente de la fibre garde une direction de maximum de diffusivité similaire et une EAP anisotrope, la fibre se propage dans ce voxel. La propagation continue jusqu'à ce que ces conditions ne soient plus vraies, on dit alors qu'un des critères d'arrêt est atteint. Ce processus est répété pour un grand nombre

de « voxels sources », permettant de reconstruire toutes les fibres du cerveau. Des régions d'intérêt peuvent être délimitées par l'expérimentateur pour cibler une structure en particulier

2.1 Tractographie DTI

Les premiers algorithmes de reconstruction s'appliquaient à l'imagerie DTI, et ne prenaient en compte que le vecteur principal de diffusivité \vec{V}_1 pour chaque voxel, comme la méthode FACT (« fiber assignment by continuous tracking ») (Mori et al., 1999) (figure 11).

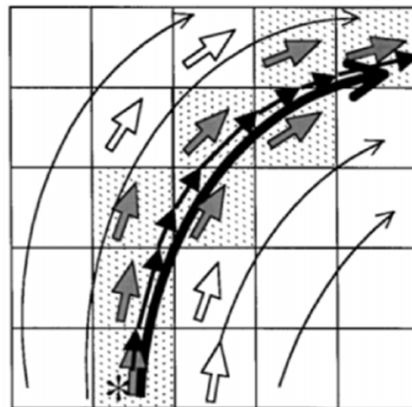


Figure 11. Méthode de tractographie FACT. Pour chaque voxel, dans le cas où la FA est assez élevée, la direction principale de diffusion est représentée par une flèche. La reconstruction commence au point source (étoile), et se propage de voxel en voxel en suivant les directions de diffusion. La fibre est alors reconstruite (flèche noire). Figure inspirée de (Mori et al., 1999)

Des approches utilisant des pas de déplacement plus petits que la taille du voxel et une interpolation des directions de diffusion principales ont montré une plus grande robustesse avec une diminution de la propagation d'erreur (Basser et al., 2000, Conturo et al., 1999) (figure 12).

D'autres techniques plus complexes ont été proposées, comme la technique TEND (Tensor deflection) (Lazar et al., 2003) ou la technique de tensorline (Weinstein et al., 1999), qui prennent en compte l'ensemble des directions de diffusivité, ainsi que la direction d'incidence de la fibre en propagation dans le calcul de trajectoire de la fibre. Ces techniques ont été validées comme plus robustes, et sont appliquées dans de nombreux logiciels de tractographie.

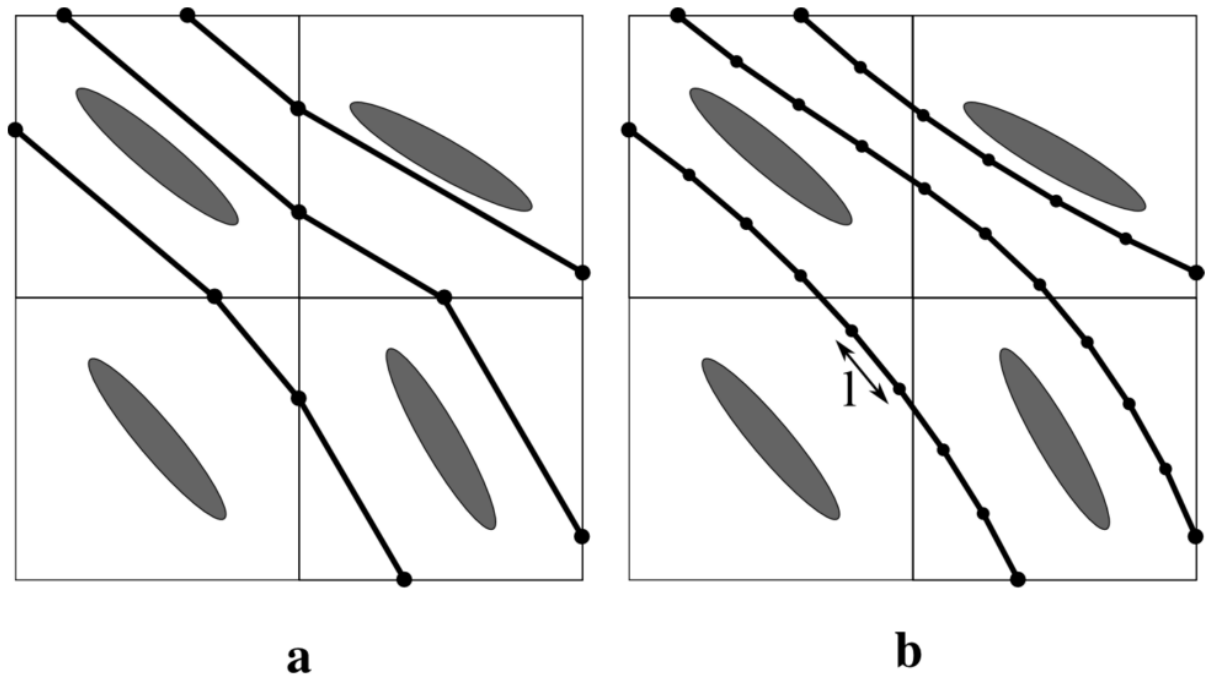


Figure 12. Méthode de tractographie avec interpolation. Les voxels sont représentés avec leur EAP représentant leur direction de diffusivité principale. La méthode de reconstruction FACT est illustrée en (a) où la trajectoire se propageant de voxel à voxel. Dans l'autre cas, une interpolation où le pas d'échantillonnage passe à un quart de voxel est utilisée (b). Les changements de direction des fibres sont plus lisses, représentant mieux la trajectoire réelle des fibres.

Dans tous les cas, ces algorithmes de reconstruction utilisent deux critères d'arrêt de propagation d'une fibre, à fixer par l'expérimentateur : la FA seuil, et la courbure locale maximale d'une fibre entre deux voxels. La condition sur la FA garantit une anisotropie de diffusion dans notre voxel, tandis que la courbure locale repose sur l'hypothèse qu'une fibre de la matière blanche ne peut pas changer de direction trop brutalement.

2.2 Tractographie sur le modèle ODF

Dans le cas de l'acquisition HARDI, le processus de reconstruction voxel par voxel demeure valable, mais il doit prendre en compte les multiples maximums de diffusivité dans le modèle de l'ODF (figure 8). Des modèles de tractographie adaptant la méthode FACT à l'imagerie Q-ball ont été développés (Chao et al., 2008). Des techniques plus avancées ont été proposées par la suite. Un exemple intéressant est celui de (Perrin et al., 2005), avec une régularisation prenant en compte l'anisotropie de l'ODF : dans le cas de voxels avec une diffusion isotrope, la direction d'incidence de la fibre est privilégiée, tandis que dans des voxels avec une diffusion anisotrope, on privilégie les directions de diffusion locales. Durant nos applications de tractographie sur des données HARDI (Annexe 3), nous utiliserons des algorithmes déterministes simples, proposés par les logiciels Mrtrix et Trackvis.

Pour la tractographie à partir de données HARDI, les critères d'arrêt ne peuvent pas être les mêmes que ceux employés pour l'imagerie DTI. La courbure locale reste pertinente, car on considère toujours qu'une fibre ne peut pas changer d'orientation trop brutalement. Mais, dans le cas de voxels contenant un croisement de fibres, le choix d'une valeur seuil de FA n'est plus pertinent. En effet, un croisement de fibres se traduit comme une diminution de la FA, ce qui représente un effet inverse au critère d'arrêt (Chao et al., 2008). Dans ce cas, d'autres choix de critères d'arrêt existent, comme la longueur d'ODF (Chao et al., 2008) où la fibre ne se propage que pour des grands maximum de diffusivité locale, la GFA (Generalized Fractional Anisotropy) qui généralise le principe de FA à l'ODF (Chou et al., 2013) ou le QA (Quantitative anisotropy) qui sert d'index pour distinguer les pics de diffusion les plus saillants, et qui semble montrer les meilleurs résultats (Yeh et al., 2013).

2.3 Limites et perspectives

2.3.1 Nouveaux développements

Le domaine de la tractographie reste aujourd'hui effervescent avec de nombreuses améliorations et applications qui continuent d'émerger (Dell'Acqua and Catani, 2012). Les algorithmes de calcul s'enrichissent, avec des tractographies globales (Reisert et al., 2011) qui ne reconstruisent pas des fibres voxel par voxel, mais déterminent les configurations de fibres qui décrivent au mieux l'ensemble de l'image de diffusion. Ce formalisme permet de diminuer les erreurs locales lors de la reconstruction des fibres. Des algorithmes utilisant des images anatomiques pour améliorer les reconstructions (Smith et al., 2012), ou encore des tractographies locales plus simples et plus rapides pour des applications cliniques en temps réel (Poupon et al., 2008, Kamada et al., 2005) ont également été proposées.

2.3.2 Choix du logiciel

A l'image des nombreuses méthodes mathématiques développées ces dernières années pour traiter les acquisitions HARDI, un grand choix de logiciels de tractographie existe aujourd'hui. Encore une fois, il est difficile de désigner un logiciel plus performant que les autres, car les algorithmes de calcul sont souvent inaccessibles. Durant ma thèse, j'ai travaillé sur plusieurs d'entre eux : Medinria (<https://med.inria.fr/>), Trackvis (<http://trackvis.org/>), DSI_Studio (<http://dsi-studio.labsolver.org/>), Mrtrix (<http://www.nitrc.org/projects/mrtrix/>). L'exactitude de la reconstruction, l'optimisation des temps de calcul, les capacités d'affichage d'images 3D ou de sélection de paquets de fibres ou encore les possibilités des cartographies DTI sont autant de critères qu'aucun des logiciels n'atteint pleinement. Cependant, le logiciel Trackvis s'est distingué par rapport aux autres, car il offre plus de

libertés dans la sélection de l'algorithme de reconstruction de fibres (méthode FACT, Tensorline, méthode avec interpolation). Des techniques histologiques ou encore l'utilisation de fantômes élaborés demeurent nécessaires pour valider la pertinence de ces logiciels de tractographie, et cerner leurs limites ou encore démontrer leur puissance.

2.3.3 Limites

Une reconstruction par tractographie dépend à la fois de l'expérimentateur (choix des critères d'arrêt, délimitation de régions d'intérêt) et de l'acquisition (paramètres utilisés, bruit). Ainsi, deux études indépendantes ne sont pas comparables directement. De plus, la tractographie peut être sujette à des erreurs de reconstruction, et doit être considérée avec prudence. Les principales sources d'erreur sont le bruit de l'image et le modèle de reconstruction qui simplifie plus ou moins la diffusion dans les tissus complexes.

Ici, il faut garder en tête les ordres de grandeurs des objets que l'on manipule. Les axones constituant la matière blanche ont des diamètres de l'ordre du μm chez l'homme ou chez la souris. Les voxels des acquisitions d'IRM de diffusion sont eux de l'ordre de 1mm ou de 100 μm dans les acquisitions chez l'homme ou la souris, respectivement. Ainsi, dans les deux cas, ce ne sont pas des fibres individuelles que nous traitons, mais des paquets de fibres de la matière blanche.

III - IRM cellulaire

Dans cette partie, nous allons présenter l'IRM cellulaire qui consiste à suivre par IRM *in vivo*, des cellules préalablement marquées par un agent de contraste (AC) paramagnétique ou superparamagnétique. Nous décrivons le principe de la méthode, puis nous nous intéresserons aux nanoparticules superparamagnétiques. Enfin, nous détaillerons l'origine du contraste pour leur visualisation par IRM.

3.1 Principe et intérêt

L'IRM cellulaire consiste à détecter des cellules marquées par un AC paramagnétique ou superparamagnétique. Pour marquer des cellules, les agents de contraste sont soit des particules de petite taille (jusqu'à l'échelle nanométrique) qui sont internalisées dans la cellule, soit des marqueurs extérieurs, de plus grande taille, qui se fixent à la membrane cellulaire.

Les premiers travaux IRM qui ont « tracké » des cellules à effet thérapeutiques (Yeh et al., 1995) ont été appliqués sur des lymphocytes T chez le rat . Depuis cette première expérience, l'IRM cellulaire s'est étendue vers diverses utilisations, avec (Wu et al., 2015) pour le suivi des cellules dendritiques (cellules thérapeutiques) dans le tissu lymphoïde chez la souris, (Moisan et al., 2012) qui a mesuré l'impact de l'injection de cellules souches mésenchymateuses sur la microvasculature après un infarctus cérébral chez le rat ou encore pour la détection des monocytes marqués dans un modèle de gliome chez le rat (Valable et al., 2008).

Les agents de contraste internalisés dans la cellule sont souvent des nanoparticules qui doivent être non toxiques et biocompatibles, n'induisant pas de perturbations du fonctionnement biologique de la cellule (Soenen et al., 2011). Dans mon travail de thèse, seules les nanoparticules (NPs) superparamagnétiques et plus particulièrement les USPIO-NPs (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide) seront considérées. Le signal IRM est très sensible à la présence des USPIO-NPs et en IRM cellulaire, de très faibles quantités de cellules marquées peuvent être détectées. Les USPIO-NPs sont les marqueurs magnétiques les plus utilisés en IRM cellulaire.

Pour les applications en biologie, les USPIO-NPs sont enveloppées en surface (« coating ») par des molécules qui peuvent avoir plusieurs rôles : stabilisation, atténuation de toxicité, solubilité, affinité moléculaire, fonctionnalité chimique ciblant un ligand (Gupta and Gupta, 2005). De nombreuses molécules polymères pour le « coating » ont été proposées et utilisées comme les dextrans, les dendrimers ou encore les polyéthylenglycol (PEG). Les matrices entourant l'oxyde de fer peuvent être fonctionnalisées et permettre, par exemple, l'accrochage d'un anticorps. Dans notre cas, les NPs étaient fonctionnalisées avec la Rhodamine B, molécule fluorescente, pour permettre une validation par microscopie de fluorescence.

3.2 Nanoparticules superparamagnétiques

3.2.1 Relaxivités

Les agents de contraste (AC) paramagnétiques ou superparamagnétiques modifient les phénomènes de relaxation des molécules d'eau qui se trouvent dans leur proximité. Les interactions en jeu sont dipolaires entre le spin nucléaire de l'eau et le spin électronique de l'AC. La capacité d'un AC à réduire les temps de relaxation T_1 et T_2 est définie par les relaxivités longitudinale r_1 et transversale r_2 , que l'on peut mesurer par variation de la concentration de l'AC, noté $[AC]$:

$$\begin{aligned} R_1 &= R_{10} + r_1[AC] \\ R_2 &= R_{20} + r_2[AC] \end{aligned} \quad [\text{Eq. 30}]$$

R_1 et R_2 sont les vitesses de relaxation : $R_1 = 1/T_1$ et $R_2 = 1/T_2$. R_{10} et R_{20} sont les vitesses de relaxation sans AC.

Les relaxivités d'un AC dépendent du champ magnétique statique B_0 . La courbe décrivant la variation de r_1 et r_2 en fonction du champ magnétique s'appelle le profil NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion) et permet de décrire les efficacités et propriétés de l'AC en fonction du champ magnétique B_0 .

Les NPs utilisées dans cette thèse sont superparamagnétiques. Les AC superparamagnétiques sont caractérisés par leur forte relaxivité r_2 comparée à r_1 . Souvent le rapport r_2/r_1 est supérieur à 50 alors que dans le cas des AC paramagnétiques r_1 et r_2 demeurent du même ordre de grandeur. Du point de vue propriétés magnétiques, les USPIO-NPs se distinguent des AC paramagnétiques par le fait qu'ils modifient localement et fortement la valeur du champ magnétique statique B_0 , induisant de forts gradients de susceptibilité magnétique.

3.2.2 Effets de susceptibilité

Lorsqu'une sphère magnétique de rayon a est placée dans un champ magnétique homogène B_0 , celui-ci est perturbé selon l'équation :

$$\Delta B_z(r, \theta) = \frac{\Delta\chi B_0}{3} \left(\frac{a}{r}\right)^3 (3\cos^2\theta - 1) \quad [\text{Eq. 31}]$$

Où $\Delta\chi$ est la différence de susceptibilité magnétique entre l'AC et son environnement, r la distance depuis le centre de la sphère et θ l'angle par rapport au champ B_0 , et z la direction du champ magnétique B_0 (Schenck, 1996).

Ainsi, la présence d'USPIO-NPs modifie localement le champ magnétique B_0 , en créant des gradients de susceptibilités magnétiques, prenant la forme d'un trèfle autour de l'AC (figure 13). La modification du champ magnétique B_0 par les NPs superparamagnétiques se traduit sur le signal RMN par un décalage de fréquence de résonance (figure 13) mais surtout par une augmentation de la largeur de raie qui résulte d'une accélération du temps de relaxation transversal T_2^* . Ce paramètre indique les effets de susceptibilité magnétique sur la relaxation transversale. L'effet de susceptibilité magnétique dépend de plusieurs facteurs comme la compartimentation (un AC confiné crée à l'interface de son compartiment de très forts gradients de champs magnétiques), ou encore l'agrégation de nombreuses molécules.

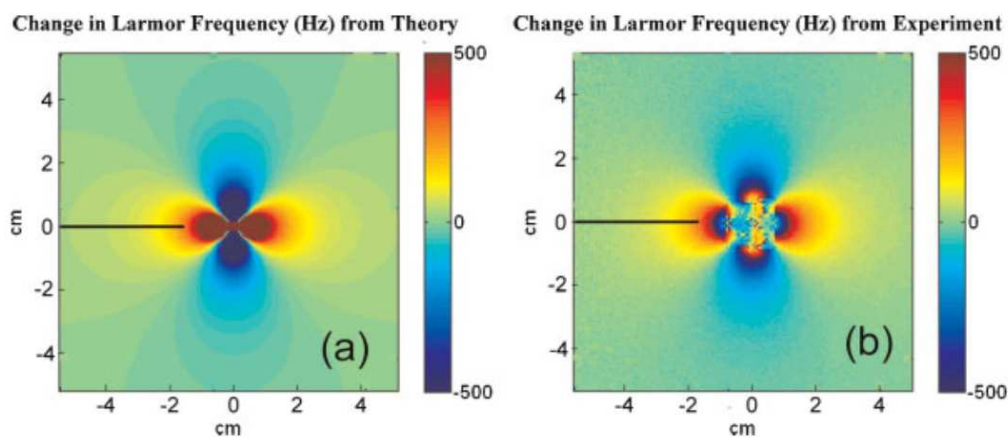


Figure 13. Estimation (a) et mesure (b) des modifications des fréquences de Larmor autour d'un échantillon d'UPSIO-NPs. La forme de trèfle autour de l'échantillon, caractéristique des modifications du champ B_0 , est retrouvée. Selon la théorie, les lobes verticaux connaissent une diminution de la fréquence de Larmor tandis que les lobes horizontaux connaissent une augmentation de la fréquence de Larmor. L'expérience retrouve assez bien ce comportement, à l'exception du centre de l'image, à proximité de l'échantillon. Figure tirée de (Cantillon-Murphy et al., 2009)

Différentes séquences IRM sont sensibles à la présence des USPIO-NPs, et nous nous intéressons à la capacité des paramètres de la relaxation T_1 , T_2 et T_2^* pour détecter efficacement et quantifier des cellules magnétiquement marquées.

3.3 Contrastes en IRM

3.3.1 Séquences T_2^*

Pour les séquences avec un temps d'écho (TE) supérieur égal à T_2^* , le contraste est mesuré par l'atténuation du signal due à la présence des NPs, c'est un contraste négatif. Deux mesures sont généralement réalisées, une image témoin, sans présence d'AC et une image avec présence d'AC. La mesure de l'image témoin est indispensable car en plus des inhomogénéités du champ magnétique introduites par la cellule magnétiquement marquée, il existe des inhomogénéités du champ magnétique statique B_0 qu'il faut soustraire.

Ces séquences sont puissantes et très sensibles à la présence d'USPIO-NPs. Mais ce pouvoir de détection est rapidement limité lorsque la diminution de T_2^* due aux inhomogénéités de champ devient trop grande, et n'est plus mesurable avec les séquences d'IRM classiques. Ainsi, les séquences avec contraste T_2^* sont adaptés pour les faibles concentrations de cellules marquées.

3.3.2 Séquences T_2 et T_1

Comme montré par l'équation 30, les temps de relaxation T_1 et T_2 diminuent avec la présence des USPIO-NPs. L'avantage donné par les USPIO-NPs est que les valeurs de relaxivité r_1 et r_2 sont très différentes. Ainsi, l'effet des cellules marquées sur le signal sera perceptible pour des plages de concentrations différentes, spécifiques à chaque paramètre, comme montré dans le chapitre 5. Dans ce travail, nous nous sommes concentrés sur la quantification des paramètres T_1 et T_2 .

En réalité, le contraste correspondant aux cellules marquées est directement lié au type de séquence utilisée. Ainsi, bien que T_1 et T_2 diminuent tous les deux, ils ont des contrastes opposés dans les imageries pondérées T_1 et T_2 . Les séquences pondérées T_2 montrent généralement une diminution du signal en présence de cellules marquées (Chien et al., 2011). A l'inverse les séquences pondérées T_1 ont un contraste positif, ce sont en général des séquences à temps d'écho très court, insensibles au paramètre T_2^* (Zhang et al., 2012a, Liu et al., 2009).

3.3.3 Contraste positif par effet de susceptibilité

Le principe de base de ces séquences repose sur la compensation des inhomogénéités de gradients de susceptibilité induites par les USPIO-NPs. Les modifications du champ magnétique B_0 décrites précédemment peuvent aussi être vues comme des modifications de la fréquence de Larmor locale des molécules d'eau (figure 13). Ainsi, les molécules d'eau autour des USPIO-NPs précessent à une autre fréquence de Larmor que celles du reste de l'image.

Ces séquences dites de « Positive Contrast » utilisent différentes stratégies pour exciter uniquement les molécules d'eau proches des USPIO-NPs. Les séquences d'« off resonance » utilisent directement une excitation radiofréquence avec une fréquence décalée (Farrar et al., 2008, Balchandani et al., 2009). Le « White Marker » se concentre lui sur le gradient de refocalisation de coupe qui est augmenté ou diminué dans le but de ne refocaliser que les molécules d'eau proches des nanoparticules (Mani et al., 2006, Seppenwoolde et al., 2003, Brisset et al., 2011). Les techniques d'« off resonance saturation » consistent à saturer le signal de l'eau « on resonance » et favoriser la détection du signal de l'eau « off resonance » en proximité des USPIO-NPs (Zurkiya and Hu, 2006).

Ainsi, à l'inverse des séquences IRM classiques, la présence des USPIO-NPs est détectée par un contraste positif. Ces séquences ont de nombreux avantages par rapport aux techniques classiques, qui pour leur part détectent une diminution de signal. Le contraste positif permet d'avoir un meilleur rapport contraste/bruit pour la détection. De plus, ce mode de détection est moins sujet à une mauvaise interprétation en raison de l'absence d'artéfacts de susceptibilité magnétique (Suzuki et al., 2008, Terrovitis et al., 2008). A noter que ce type d'imagerie est particulièrement adapté aux hauts champs

magnétiques car les différences de fréquence de Larmor augmentent avec le champ magnétique, et permettent de résoudre les signaux plus facilement.

Développées depuis une dizaine d’années, ces séquences ont tout de même des limites. Malgré de nombreuses applications, elles se restreignent à la détection de cellules marquées par des UPSIO-NPs, mais plus rarement à leur quantification, sauf dans des cas de faibles plages de concentrations (Suzuki et al., 2008, Brisset et al., 2011).

IV - Etat de l’art et nos stratégies

Dans les trois premières parties du chapitre 1, nous avons décrit de manière didactique les techniques d’imagerie sur lesquelles repose ce travail de thèse. Dans cette partie, nous décrirons plus en détails les méthodologies utilisées. Nous évoquerons le développement de l’imagerie 3D à haute résolution spatiale isotrope qui permet de discerner au mieux les microstructures du cerveau, ensuite nous présenterons l’imagerie rapide EPI (écho planar imaging) et l’algorithme de Super-Résolution qui accélèrent les temps d’acquisitions et permettent d’accéder à l’imagerie *in vivo*.

Nous expliquerons également notre choix du DTI comme modèle d’imagerie de diffusion, et l’utilisation d’imagerie multimodale pour valider les résultats obtenus par l’IRM.

Et enfin, nous résumerons nos démarches et notre stratégie durant cette thèse qui a débuté avec des acquisitions *ex vivo* pour arriver vers des applications *in vivo*.

4.1 Méthodologies développées

4.1.1 Imagerie 3D à haute résolution spatiale isotrope

Le développement de DTI 3D haute résolution spatiale, aussi appelé IRM microscopique 3D DTI, a été l’objectif majeur de cette thèse dont le but d’étudier le cerveau de souris en particulier dans deux modèles animaux, le *Glio6* et le *MAP6*. La haute résolution spatiale est essentielle pour cibler et isoler une zone microscopique du cerveau et étudier sa microarchitecture avec précision sans interférence avec les autres structures avoisinantes, autrement dit, sans « effet de volume partiel ». Comparées à l’imagerie 2D, les acquisitions en imagerie 3D ont l’avantage de ne privilégier aucune orientation spatiale ce qui, dans le cas de la tractographie, permet une construction de fibres sans biais

(Basser et al., 2000). Dans notre problématique, les structures qui nous intéressaient, comme le fornix dans le cas de cerveaux de souris MAP6 knock out (MAP6-KO) (Deloulme et al., 2015), se révélaient être des structures fines difficilement discernables avec des protocoles d’IRM 2D.

L’imagerie microscopique 3D-DTI s’est avérée être une condition nécessaire pour aboutir à la reconstruction de ces faisceaux de la matière blanche.

En IRM, les séquences 3D avec une résolution spatiale isotropique présentent un certain nombre d’avantages. Le signal provient de tout le volume et non d’une seule coupe, et un gradient de codage de phase est appliqué dans la troisième dimension, à la place des gradients de coupe pour les acquisitions 2D. En imagerie 3D, le temps d’acquisition total est très long mais le rapport signal sur bruit (SNR) est meilleur, du fait de l’accumulation des signaux du centre de l’espace-k. En IRM 2D, la résolution spatiale donnée par l’épaisseur de coupe est limitée par l’intensité maximale du système de gradients et par la bande fréquentielle de l’impulsion RF sélective, en général de l’ordre de quelques centaines de μm .

Dans une expérience d’IRM 3D, le temps d’acquisition total est supérieur N_3 fois à celui d’une acquisition 2D, où N_3 est le nombre de pas d’encodage de phase dans la troisième direction. Que ce soit pour l’imagerie 2D ou 3D, les temps d’acquisitions nécessaires à l’imagerie DTI ou HARDI augmentent très vite. Ainsi les applications *in vivo*, tenant compte du paramètre temps, ne conduisent en général qu’à des résolutions spatiales très limitées. En IRM préclinique, il devient nécessaire d’accéder à la haute résolution spatiale ce qui a poussé au développement de séquences destinées à accélérer l’acquisition.

4.1.2 Imagerie rapide EPI

En IRM, on peut considérer qu’il existe deux stratégies pour accélérer les acquisitions IRM. La première agit sur les éléments de la chaîne de mesure et la seconde agit sur les séquences d’imagerie, soit en raccourcissant le temps de répétition TR et en optimisant l’angle d’excitation RF, soit en appliquant astucieusement les trois gradients de champ magnétique pour le codage spatial 3D, dans le but de parcourir rapidement l’espace-k.

La course vers les hauts champs magnétiques est l’un des moyens utilisés pour augmenter le signal reçu pour un voxel donné (Vaughan et al., 2015). Le développement de nouvelles sondes permet aussi d’augmenter le signal reçu. Les cryosondes augmentent le SNR d’une image en supprimant le bruit thermique (Muller et al., 2012, Wu et al., 2013, Mueller et al., 2013). Dans ce cas, le principe repose sur l’immersion des composantes électroniques de la sonde dans un liquide cryogénique. L’imagerie parallèle utilise un réseau de sondes radiofréquences (figure 14) de type bobine de surface, chacune connectée à un canal (excitation multi-canaux). Un ensemble d’images

partielles est ainsi acquis et permet à l’aide d’algorithmes spécifiques (Griswold et al., 2002) d’aboutir à une image finale de très haute sensibilité (Sodickson et al., 2005, Filippi et al., 2012)

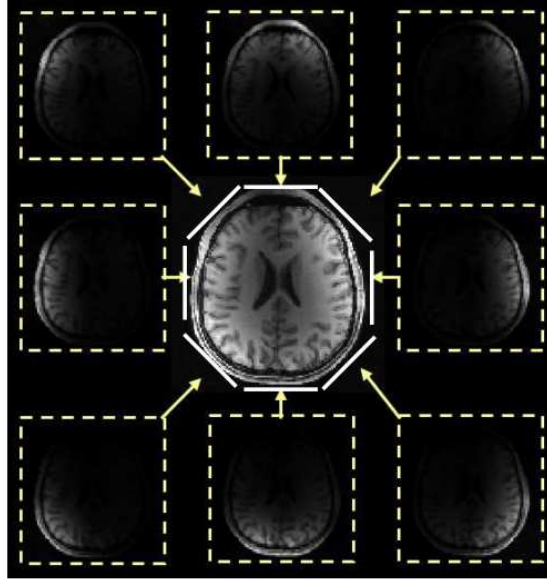


Figure 14. Principe de l’imagerie parallèle. Une antenne de surface 8 canaux est utilisée pour recueillir le signal provenant du cerveau. Chaque antenne relève une partie du signal, dépendant de sa position. Les acquisitions sont regroupées pour former l’image finale, qui bénéficie d’un très bon SNR comparé à une image acquise avec une seule antenne de surface

Le principe de base des séquences d’imagerie rapide les plus courantes reposent sur l’accélération du parcours de l’espace-k pendant l’acquisition. En IRM, les signaux acquis sont des signaux de l’espace-k, dit aussi espace de Fourier, et qui est l’espace conjugué de l’espace position spatiale, pour lequel on a :

$$k_{max} = 1/\Delta r \quad \text{et} \quad \Delta k = 1/R \quad [\text{Eq. 32}]$$

où Δr est la résolution spatiale, R la taille de l’image qui correspond au champ de vue (field of view), k_{max} , la fréquence spatiale maximum et Δk le pas d’échantillonnage de l’espace-k.

Comme nous l’avons expliqué dans le paragraphe (1.2.1) le codage spatial en IRM se fait grâce aux gradients de champs magnétiques, rendant la valeur du champ magnétique statique B_0 dépendante de l’espace. Grâce au paramètre fréquence spatial k , l’image réelle, dont le paramètre est la position spatiale r , s’obtient par transformée de Fourier inverse. Ainsi l’expérience IRM, consiste à varier le paramètre fréquence spatiale k pour remplir l’espace de Fourier. Pour une direction i de gradient de champ magnétique, les fréquences spatiales s’écrivent :

$$k(G, t) = \frac{\gamma}{2\pi} \int_0^t G_i(t') dt' \quad [\text{Eq. 33}]$$

Dans le cas d’acquisitions IRM, la majorité du signal provient du centre de l’espace-k (figure 15), et acquérir des données à haute résolution spatiale revient à acquérir les données à valeurs élevées de k . Une fois le signal acquis dans l’ensemble de l’espace-k, l’image peut être reconstruite par transformée de Fourier inverse.

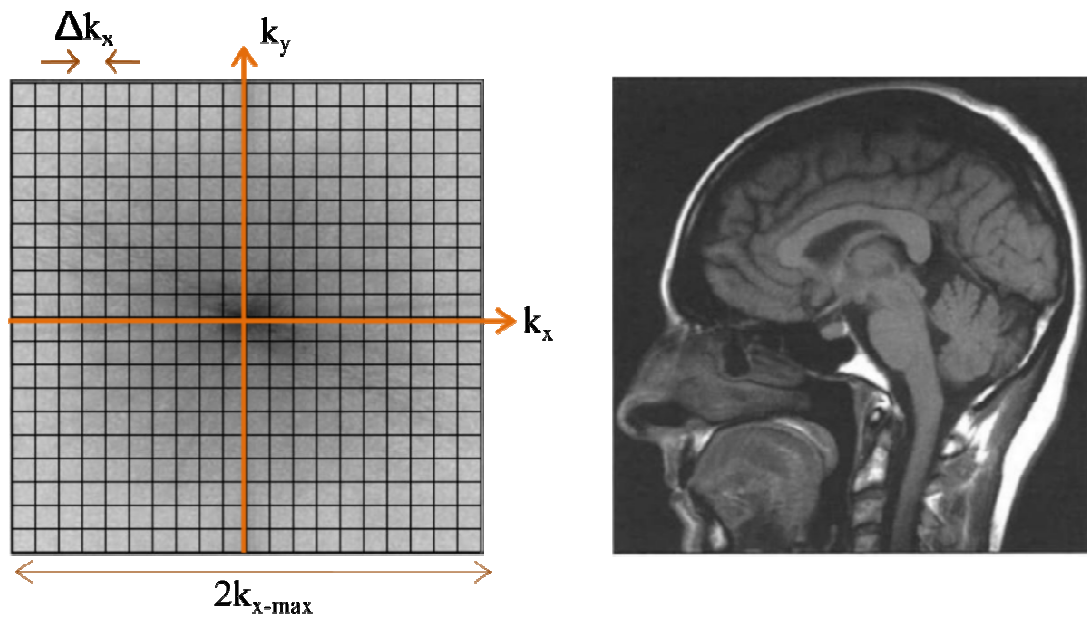


Figure 15. Image cérébrale et sa transformée de Fourier. Dans le plan de Fourier, l’essentiel de l’information s’accumule au centre. L’espace-k est représenté, avec les orientations de k_x et k_y . Le pas d’échantillonnage Δk_x , et la valeur maximum k_{x-max} sont aussi représentés. Figure inspirée de : Kastler 2006 - Comprendre l’IRM d’auto apprentissage

Le parcours de l’espace-k peut se faire de plusieurs manières et selon l’imagination de l’utilisateur dans la limite des caractéristiques des gradients de champ magnétique : leur capacité à commuter rapidement sans induire de courants de Foucault, leur stabilité temporelle et surtout leur intensité maximale pour atteindre des hautes résolutions spatiales. Ce sont les caractéristiques des gradients de champ magnétique qui permettent ou non un parcours rapide de l’espace-k.

Le parcours rapide de l’espace-k le plus répandu est l’imagerie rapide EPI qui consiste à acquérir l’ensemble du signal en utilisant le signal provenant d’une seule excitation radiofréquence (figure 16).

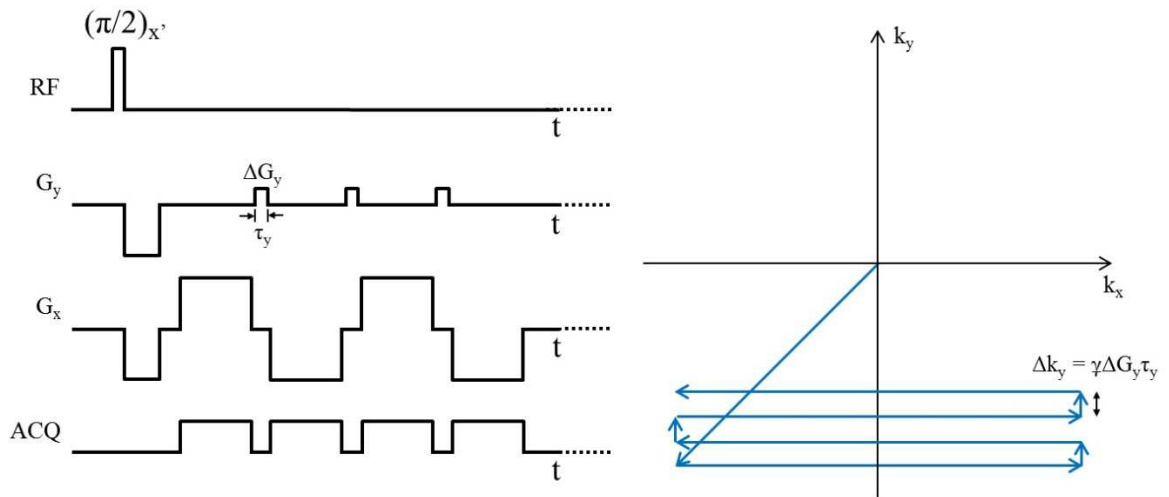


Figure 16. Diagramme d’une séquence EPI et parcours de l’espace-k correspondant. Un gradient dans la direction x est appliqué sous forme d’une succession continue de gradient bipolaires pour refocaliser et acquérir un train d’échos, gradient dit de lecture. Chaque écho est rapidement échantillonné (variation de la fréquence spatiale K par variation du temps) pour acquérir une ligne de l’espace-k. Le passage d’une ligne à une autre est réalisé par application d’un gradient dans la direction y (gradient codage de phase) sous forme d’impulsion très brève dite « blip » appliquée avant chaque commutation de polarité du gradient de lecture. Ainsi avec la méthode EPI, il y a formation d’un train d’échos. Certains sont dits échos pairs, formés pendant que le gradient de lecture a une polarité positive et les autres dits échos impairs, formés lorsque le gradient a une polarité négative. Comme indiqué dans le schéma, les phases introduites par les gradients d’imagerie sont compensées par des gradients appliqués juste après l’excitation radiofréquence.

Ce parcours de l’espace-k est une réelle accélération puisqu’on gagne un facteur temps considérable de l’ordre du nombre de ligne à parcourir. Dans le cas d’une séquence 2D DTI-EPI comme celle utilisée dans le chapitre 4, le temps d’acquisition EPI est de 9min20s alors qu’il dépasse les 10h avec une séquence classique. Comme dans l’acquisition EPI, tout le parcours de l’espace-k est réalisé avec une seule excitation RF, le signal est fortement pondéré par la relaxation transversale très sensible aux susceptibilités magnétiques et aux effets d’off résonance. De plus, comme les gradients de lecture sont régulièrement inversés et que les gradients de codage de phase sous forme de blip sont rapidement commutés, la séquence est très sensible aux effets de courant de Foucault (Jezzard et al., 1998). Les instabilités d’intensité de gradient génèrent des fréquences spatiales non équidistantes qui s’écartent de la grille cartésienne, à l’origine de distorsions géométriques dans l’image. Les systèmes de gradients actuels sont souvent activement blindés (Trakic et al., 2007) pour minimiser au maximum la formation des courants de Foucault et les imageurs intègrent désormais des méthodes qui calculent le déphasage entre échos pairs et impairs et permettent de corriger ces artéfacts dans nos applications (Trakic et al., 2007).

Par ailleurs, les séquences EPI sont très sensibles aux inhomogénéités de champ magnétique B_0 qui interfèrent avec les gradients blips et provoquent des distorsions dans la direction de phase, notamment à l’interface air/tissu et liquide/tissu. En effet des gradients de champs magnétiques locaux sont créés autour de ces interfaces et sont à l’origine de distorsions géométriques avec atténuation du

signal. Ainsi, à haut champ, ces distorsions d’image dans la direction de phase deviennent prépondérantes malgré les corrections des inhomogénéités du champ magnétique B_0 (réglages de shim). En pratique, ce sont ces artefacts qui empêchaient une interprétation pertinente des données, et qui doivent être corrigés par l’expérimentateur.

Le parcours de l’espace-k en plusieurs étapes, appelé EPI segmenté est une solution où avec une seule excitation radiofréquence, seulement une partie de l’espace-k est acquise et par conséquent un certain nombre d’excitation radiofréquences est nécessaire pour parcourir tout l’espace-k. Cependant, cette technique nécessite de plus grands temps d’acquisition. Cette méthode permet en particulier de s’affranchir des effets de T_2^* . Cependant, comme le nombre d’excitation RF augmente, le temps d’acquisition total est allongé, par exemple par 2 si acquisition en 2 segments et par 4 si acquisition en 4 segments.

Ces distorsions peuvent aussi se corriger après traitement des données, et c’est cette stratégie que nous avons privilégiée. Nous avons choisi de mettre au point la correction des distorsions par la méthode dite de gradient renversé (Morgan et al., 2004) qui utilise deux acquisitions EPI avec incrémentation de gradients de phase (blips) dans le sens opposé. Le principe est basé sur le fait que les distorsions dépendent du sens de parcours de l’espace-k. Les distorsions dans la direction de phase dans le cas d’un parcours avec blip « up » puis avec blip « down », peuvent être assimilées à :

$$\begin{aligned} x_1 &= x + \frac{\Delta B(x, y, z)}{|G_y|} \\ x_2 &= x - \frac{\Delta B(x, y, z)}{|G_y|} \end{aligned} \quad [\text{Eq. 34}]$$

où x_1 est la position mesurée pour une acquisition blip up, x_2 la position mesurée pour une acquisition blip down, x est la position théorique et ΔB est la différence entre le champ B_0 attendu et le champ réel (Morgan et al., 2004). Ainsi, les deux images obtenues auront des distorsions inversées, et une image sans distorsion peut en être déduite en utilisant l’opérateur Jacobien (Morgan et al., 2004)(chapitre 4). Ce post processing s’est montré plus performant que les corrections classiques (chapitre 4) utilisant des cartes de champ magnétiques B_0 (Holland et al., 2010).

En pratique, chez la souris, les séquences accélérant les temps d’acquisition ne permettent pas d’obtenir une image 3D à haute résolution spatiale *in vivo* en un temps acceptable (inférieur à une heure). En général, on utilise des séquences 2D avec des hautes résolutions dans le plan, mais des coupes épaisses (Harsan et al., 2010, Boretius et al., 2007), ou alors des séquences 3D qui ont des résolutions spatiales limitées (Mayer et al., 2007, Heemskerk et al., 2005).

Dans le but d’atteindre des images 3D à haute résolution spatiales (chapitre 1, 4.1.1) en un temps d’acquisition qui reste réalisable pour des études *in vivo*, nous avons combiné l’imagerie rapide EPI décrite dans ce paragraphe à des méthodes post-processing dites de « Super-Résolution ».

4.1.3 Super-Résolution

La Super-Résolution (SR) consiste à obtenir des images haute résolution spatiale en appliquant des algorithmes spécifiques sur des images basses résolutions spatiales, ayant des informations spatiales complémentaires.

Dans mon travail de thèse, les méthodes de SR que j’ai développées découlent des travaux initiés par (Gholipour et al., 2010, Scherrer et al., 2012) qui consistent à reconstruire, à partir d’images basse résolution acquises dans les directions coronales, sagittales et axiales, une image haute résolution 3D isotrope (chapitre 4). Comme en IRM et dans le monde médical en général il est bien établi que l’imagerie 3D est un outil puissant pour extraire des informations anatomiques et fonctionnelles, la méthode SR suscite désormais un intérêt grandissant (Greenspan, 2009).

Avec ce traitement post-processing le temps de l’expérience total demeure raisonnable, car les différentes acquisitions sont de type 2D. En effet dans le cas de séquences 2D multicoupes, le temps total d’acquisition est donné par ($t = TR \times NA \times Dim1$) alors que celui des séquences 3D est donné par ($TR \times NA \times Dim1 \times Dim3$), ce qui avec des paramètres typiques ($TR = 2s$, $NA = 4$, $Dim1 = Dim2 = 128$) donne un temps d’acquisition de 17 min pour la 2D et 36 heures pour la 3D. Avec TR le temps de répétition, NA le nombre d’accumulations, Dim1 et Dim3 les tailles des matrices.

La méthode SR utilise des signaux de gros voxels ayant un bon SNR. La résolution spatiale atteinte peut dépasser les limites données par le système de gradient (Peeters et al., 2004, Plenge et al., 2012). Les résultats obtenus avec les algorithmes de SR sont meilleurs qu’en utilisant une simple interpolation (chapitre 4). La méthode de SR permet de reconstruire des fibres indétectables avec les images de basse résolution en clinique (Scherrer et al., 2012) et en préclinique (chapitre 4). La méthode SR est donc davantage utile pour les études *in vivo*.

4.1.4 Choix de l’imagerie DTI

Comme nous l’avons expliqué (chapitre 1, 2.2), la tractographie issue du modèle ODF reflèterait mieux l’anatomie des tracts du cerveau car elle est capable, à l’inverse d’études basées sur le DTI, de reconstruire des croisements de fibres (Annexe 3)(Bucci et al., 2013, Gigandet et al., 2013, Campbell et al., 2005, Wedeen et al., 2008). Cependant le modèle de l’ODF, associé à l’imagerie HARDI,

nécessite une bien plus grande résolution angulaire des directions de diffusion, ce qui augmente d’une façon proportionnelle le temps d’acquisition. De plus, avec le modèle de l’ODF, des grandes valeurs de b sont nécessaires, ce qui pourrait être une limite soit venant des gradients, soit venant du signal.

En pratique, la reconstruction d’un tract à partir du modèle de l’ODF n’est pas toujours meilleure qu’à partir du modèle DTI, en particulier dans des structures simples et homogènes de la matière blanche (Annexe 3) (Behrens et al., 2007).

Au cours de cette thèse, j’ai pu tester la faisabilité de la méthode ODF, et la reconstruction des croisements de fibres de la matière blanche a été réalisée avec succès et pour la première fois dans l’équipe (Annexe 3). Cependant, dans le cas de nos problématiques de recherche et selon les différentes expériences que j’ai réalisées, j’ai pu constater qu’il était préférable de sous-échantillonner la sphère de diffusion et d’augmenter la résolution spatiale plutôt que le contraire.

Mes stratégies d’acquisition se sont alors portées vers l’augmentation de la résolution spatiale (chapitre 3), car les reconstructions ciblées portaient sur des tracts homogènes de la matière blanche. Le DTI apparaît comme un modèle de simplification de l’EAP utile qui permet d’atteindre un meilleur SNR et/ou une meilleure résolution spatiale grâce à son gain de temps.

Ainsi, selon mes propres convictions, une expérience de tractographie n’a pas de paramètres optimaux, et doit être adaptée à la problématique de recherche.

4.1.5 Imagerie multimodale pour validation

Comme en IRM les informations mesurées sont indirectes, la validation des méthodes développées est nécessaire. La tractographie DTI sur des croisements de fibres est un bon exemple. Elle est non seulement incapable de reconstruire ce croisement de fibre, mais peut reconstruire des faisceaux de fibre inexistants (Annexe 3). Ainsi l’application de méthodes d’imagerie alternatives est pertinente pour valider et interpréter les résultats obtenus par une technique IRM.

Dans ce travail de thèse, cet aspect de validation et d’interprétation a tenu une place majeure, chaque résultat novateur obtenu par IRM a été confirmé par une autre modalité d’imagerie.

La spécificité de l’imagerie de fluorescence ou la haute résolution atteinte par la microscopie électronique représentent des outils qui ont permis des validations directes de notre travail (chapitre 2). L’intérêt du travail multidisciplinaire est ici clair, mélangeant les compétences de différents domaines et permettant de répondre à des hypothèses biologiques particulières. Les techniques de validation communes ne sont pas toujours suffisantes, et il faut alors imaginer de nouvelles stratégies. C’est ce

qui a été fait dans le travail du chapitre 3, où pour la première fois à notre connaissance des images de tractographie 3D ont pu être validées par microscopie fluorescente 3D du cerveau transparent.

4.2 Stratégie d’ensemble : de l’*ex vivo* à l’*in vivo*

Comme expliqué précédemment (chapitre 1, 4.1.1), l’imagerie microscopique 3D était nécessaire pour décrire les défauts neuroanatomiques des souris MAP6 et *Glio6*. Dans un premier temps, l’imagerie microscopique 3D DTI a été appliquée sur les cerveaux de souris fixés avec des séquences d’écho de spin 3D de longue durée (chapitre 2 et 3). En effet, comme la taille des pixels devait être de l’ordre de quelques dizaines de μm , le but ici était d’éviter les artefacts géométrique liés à l’imagerie rapide (chapitre 1, 4.1.2) et d’imager les structures du cerveau avec des signaux stables.

Afin d’accélérer les acquisitions *ex vivo*, les cerveaux étaient fixés avec un mélange de paraformaldéhyde (PAF) 4% pour la conservation des tissus et d’agent de contraste Gd-DOTA à $1/80^{\text{ème}}$ pour l’accélération des acquisitions. Le Gd-DOTA permet de diminuer le temps de relaxation longitudinal T_1 des tissus du cerveau, et donc d’accélérer les acquisitions avec des temps de répétition plus courts mais raccourcit également la relaxation T_2 , détériorant ainsi le SNR. La concentration à injecter et le temps nécessaire à la diffusion homogène du Gd-DOTA dans tout le cerveau ont été étudiés dans une expérience préliminaire afin de trouver un bon compromis entre le temps d’acquisition total donné par T_1 , et le SNR donné par T_2 (chapitre 2 – Matériel et méthodes).

Le cerveau ainsi fixé garde la même microarchitecture, mais les diffusivités sont diminuées (Sun et al., 2006, Kim et al., 2007, Shepherd et al., 2009) par rapport à l’acquisition *in vivo*, et restent stables dans le temps (Kim et al., 2007, Zhang et al., 2012b) lorsque les cerveaux sont conservés à 4°C (Thelwall et al., 2006).

Ce développement méthodologique a abouti à deux résultats significatifs. Il a permis de valider l’imagerie DTI comme biomarqueur de la migration de cellules tumorales dans la matière blanche, et plus précisément dans le corps calleux (chapitre 2), et a permis de caractériser avec précision les pertes de matière blanche et les défauts de connectivités cérébrales dans le modèle de souris MAP6 apparenté à la schizophrénie (chapitre 3). Avec ce travail, l’imagerie microscopique 3D DTI peut désormais être considérée de très grande utilité pour étudier et diagnostiquer des maladies neurologiques dans des modèles expérimentaux chez la souris.

Dans ce travail de thèse, les développements méthodologiques de l’imagerie rapide et les méthodes de Super-Résolution ont permis d’obtenir des acquisitions 3D DTI haute résolution spatiale *in vivo*. La preuve de concept de cette imagerie *in vivo* a été validée dans le modèle de schizophrénie

MAP6, où les déficits de matière blanche ont été retrouvés similaires à ceux obtenus *ex vivo*, et ceci grâce à la tractographie 3D à haute résolution spatiale que nous avons pu construire (chapitre 4). A notre connaissance, c’est la première fois qu’une tractographie avec autant de précision est appliquée *in vivo* chez la souris à 9.4T, ouvrant la voie vers de nombreuses applications. Ainsi, l’IRM DTI à haute résolution spatiale peut être utilisée *in vivo* dans une étude longitudinale, dans le but d’étudier les effets de traitements thérapeutiques.

En parallèle, notre stratégie a consisté à valider d’une façon robuste les méthodologies développées et c’est dans ce contexte que nous nous sommes orientés vers d’autres modalités d’imagerie, comme l’imagerie optique ou la microscopie électronique, apportant ainsi multidisciplinarité et complémentarité à nos études IRM.

D’autre part, l’imagerie cellulaire par IRM qui consiste à suivre des cellules préalablement marquées par des USPIO-NPs a été développée dans le but de suivre la biodistribution de cellules tumorales ou de cellules thérapeutiques au cours du temps. Dans ce contexte, une nouvelle approche d’IRM cellulaire quantitative a été développée et mise au point, utilisant simultanément la relaxométrie T_1 et T_2 et les effets de susceptibilité magnétique. Appliquée à des cellules thérapeutiques dans un modèle de glioblastome chez la souris, elle a permis de visualiser la biodistribution des cellules marquées sur une longue période et de les quantifier dans une large plage de concentration.

CHAPITRE 2

CARACTERISATION DU MODELE GLIO6

Microscopic DTI accurately identifies early glioma cell migration: correlation with multimodal imaging in a new glioma stem cell model

Contribution au travail

Je suis le porteur de ce projet, et j'ai mené l'ensemble des expériences que ce soit en IRM, en expérimentation animale ou encore en imagerie multi-modalités. Bien entendu, j'ai d'abord profité des compétences de l'équipe pour m'initier, pour ensuite prendre en charge les différentes étapes expérimentales. Sous l'impulsion de ma directrice de thèse, nous avons mené ce travail en fédérant les qualités multidisciplinaires de l'équipe. L'apport de l'IRM de diffusion pour caractériser le modèle de glioblastome chez la souris, modèle Gliob6, a été validé et complété par différentes modalités d'imagerie. Nous avons mené la rédaction de l'article avec Hana Lahrech, et nous avons sollicité nos partenaires qui sont co-auteurs pour apporter leurs corrections et remarques.

	Conception et design des expérimentations	Mise en place, préparation de l'expérimentation	Acquisition des données	Traitement des données
Figure 1				
Figure 2				*
Figure 3	**	**	***	***
Figure 4	**	*	***	**
Figure 5	**	**	***	***
Figure 6	*	*	***	**

*** travail équivalent à d'autres auteurs**

**** principal acteur du travail**

***** seul participant**

Ce travail est en révision favorable dans le journal NMR IN BIOMEDICINE. Il a obtenu la distinction « Magma Cum Laude » à l'ISMRM 2013 (voir Communications)

Contexte scientifique

Les glioblastomes sont les tumeurs primaires du cerveau les plus agressives pour lesquelles la survie médiane des patients est de 15 mois, et n'a pas évolué depuis 20 ans. Les glioblastomes sont caractérisés par une hétérogénéité du microenvironnement de cellules tumorales (Claes et al., 2007) et se décomposent généralement en deux parties : une masse tumorale et une infiltration de cellules invasives dans le cerveau sain. La masse tumorale est couramment constituée d'une nécrose entourée d'une grande cellularité et d'une augmentation de la micro-vascularisation (Giese and Westphal, 1996) suite à une angiogénèse active. Les glioblastomes sont sensibles aux traitements anti-angiogéniques, et sont souvent traités par résection, radiothérapie et/ou chimiothérapie.

La détection de la distribution des cellules tumorales est essentielle pour le ciblage de la radiothérapie notamment, et le tri des patients selon l'invasion de leur gliome. Les glioblastomes se propagent dans le cerveau de deux manières (Inoue et al., 2012). La première par infiltration des cellules tumorales : les cellules tumorales migrent le long de structures existantes comme la matière blanche ou la microvascularisation (Giese and Westphal, 1996). La seconde par invasion de la tumeur. Dans ce cas, les cellules produisent des protéases qui dégradent la matrice extracellulaire environnante et synthétisent leur propre matrice permissive à l'invasion (Zamecnik, 2005, Gondi et al., 2004).

L'évolution fatale des glioblastomes est souvent due à des récives après un traitement. Les cellules tumorales infiltrantes sont considérées à l'origine des rechutes des patients (Giese et al., 2003). En effet, à l'inverse de la masse tumorale, ces cellules infiltrantes sont insensibles aux thérapies existantes, et les anti-angiogéniques aggravent même le phénomène de migration (Tuettenberg et al., 2006).

Dans le cadre clinique, l'IRM reste la référence pour diagnostiquer les glioblastomes et permet de localiser la tumeur, étudier sa vascularisation ou encore définir son grade. Cependant, les méthodes IRM standards ne permettent pas de visualiser les cellules infiltrantes dans le cerveau sain qui restent souvent indétectables. Le DTI a montré son potentiel pour détecter l'infiltration de cellules tumorales dans la matière blanche (Goebell et al., 2006, Kinoshita et al., 2008, Awasthi et al., 2010, Stadlbauer et al., 2009), avec notamment une diminution du paramètre fraction d'anisotropie FA dans la matière blanche (Kallenberg et al., 2013, Price et al., 2004) alors qu'aucun signe n'apparaît sur l'imagerie T₂.

Dans l'étude présentée, l'objectif est de valider l'imagerie DTI 3D microscopique comme biomarqueur de la migration des cellules tumorales dans la matière blanche. Pour cela nous avons utilisé le modèle de glioblastome développé dans l'équipe, modèle Gliob chez la souris, qui est associé à la migration, dans son phénotype et dans l'expression de ses gènes (CXCR4⁺). La microscopie à deux photons a permis de valider les résultats DTI grâce à l'utilisation de cellules tumorales codées

GFP (Green Fluorescent Protein). Pour comprendre les altérations de la microarchitecture à l'origine de la modification du signal DTI, nous avons utilisé la microscopie électronique.

Microscopic DTI accurately identifies early glioma cell migration: correlation with multimodal imaging in a new glioma stem cell model

Authors & Affiliations:

Ulysse Gimenez^{1*}, Adriana-T. Perles-Barbacaru¹, Arnaud Millet¹, Michel Sarraf¹, Florence Appaix², Michele El-Atifi¹, Karin Pernet-Gallay², Boudewijn van der Sanden¹, Francois Berger¹, Hana Lahrech¹.

¹ CLINATEC Inserm UA01, Centre de recherche Edmond J.Safra, CEA Grenoble, France
17, rue des Martyrs
38054 Grenoble Cedex 9 - FRANCE

² Grenoble Institut des Neurosciences Inserm U836, Grenoble, France.
Batiment Edmond J.Safra
Chemin Fortuné Ferrini
38700 La Tronche – France

***Corresponding author:**

Hana Lahrech,
hana.lahrech@ujf-grenoble.fr
Phone: +33438784539 Fax: +33438785355
Clinatec-CEA
17, rue des Martyrs
38054 Grenoble Cedex 9 - FRANCE

Keywords : DTI, glioma cell migration, animal model study, two-photon, axonal disorganization

6420 words

Abbreviations:

Blood Brain Barrier (BBB)
Blood Volume fraction (BVf)
Comparative Genetic Hybridization (CGH)
Corpus Callosum (CC)
Perpendicular Diffusivity (D_{\perp})
Diffusion Tensor Imaging (DTI)
Echo Planar Imaging (EPI)
Fractional Anisotropy (FA)
Field of view (FOV)
Mean Diffusivity (MD)
Multi-slice-multi-echo (MSME)
Number of averages (NA)
Rapid acquisition with refocused echo (RARE)
Radiofrequency (RF)
Region Of Interest (ROI)
Rapid Steady State T_1 (RSST₁)
 T_1 -weighted (T_{1w})
 T_2 -weighted (T_{2w})
Transmission Electron Microscopy (TEM)
White Matter (WM)

Abstract

Monitoring glioma cell infiltration in the brain is critical for diagnosis and therapy. Using the new glioma Glioblastoma mouse model derived from human stem cells we show how Diffusion Tensor Imaging (DTI) may predict glioma cell migration/invasion.

We first perform an in vivo multiparametric MRI at one, two and three months of Glioblastoma glioma tumor growth, a longitudinal (= follow-up) study which indicates the existence of a time window to study glioma cell/migration/invasion selectively. Indeed, at two months, only a Glioblastoma cell invasion was detected: tumor mass formation, edema, blood brain barrier leakage, and tumor angiogenesis were detected later at 3 months. To robustly confirm the role of DTI to detect glioma cell migration/invasion, microscopic 3D-DTI (80 μ m isotropic spatial resolution) was developed and applied ex vivo on fixed mouse brain.

DTI changes were predominant in the corpus callosum (CC), a known path of cell migration. Fractional anisotropy (FA) and perpendicular diffusivity (D_{\perp}) changes derived from ex vivo microscopic 3D-DTI were significant at two months of tumor growth, FA: +38% increase in caudate putamen ($p < 0.001$) and -28% decrease in the CC ($p < 0.005$) and D_{\perp} : +95% increase in the CC ($p < 0.005$). In the CC, DTI changes and fluorescent Glioblastoma cell density obtained by two-photon microscopy of the same brains were correlated ($p < 0.001$, $r = 0.69$) validating FA and D_{\perp} as quantitative biomarkers to detect glioma cell migration/invasion that appears early. At this stage of tumor growth, the usual T_{1w} and T_{2w} MRI sequences are still insensitive. The origin of DTI changes was assessed by electron microscopy of the same tract showing axon bundle disorganization.

Applying microscopic 3D-DTI at two months of tumor growth, during which Glioblastoma cell migration/invasion is the only disease process detected at this point time, we robustly validate DTI parameters FA and D_{\perp} as biomarkers for glioma cell invasion/migration.

For in vivo applications, microscopic 3D-DTI should be performed with rapid acquisitions which are under development.

Introduction

Glioblastoma multiforme is the most common primary brain tumor in adults and one of the most devastating cancers.(1) Glioblastoma incurability is mainly explained by peritumoral invasion/migration and consequently recurrence, strongly supporting the need for both accurate animal models of tumor cell invasion/migration and new imaging methodology to quantify and to follow up rigorously the extent of tumor cell spread. In comparison to invasion, migration processes use existing brain structures like peri-axonal and perivascular spaces and are therefore more rapid than invasion processes which are principally based on metallo-proteinase mediated degradation of the extracellular matrix.(2)

Migration of tumor cells into the normal brain, a key feature of gliomas, is poorly detected using conventional imaging (T_2 , T_1 and contrast-enhanced T_1 weighted sequences, commonly used in clinic). For example, regarding MRI, biopsy studies have shown that the tumor extends beyond the margins of T_2 and T_1 signal changes in most glioblastomas.(3, 4) This demonstrates the current limits of standard MRI methods for imaging the actual spread of glioma cells in brain tissue.

Determining the invaded area and the tumor margins that are connected to migration roads is essential to improve resection and irradiation protocols. Moreover, the recent finding that anti-angiogenic therapies could increase tumor cell migration(5, 6) further underlines the need for non-invasive imaging facilities to follow-up glioma cell propagation both at the time of diagnosis and during therapy.

Recent advances in MRI can now provide information not available with conventional imaging in pathological regions (7, 8). Diffusion tensor imaging (DTI) (9) is a unique medical imaging method capable of probing in vivo tissue microstructure at the cellular and subcellular scale. DTI is very sensitive in detecting disruption of tissue anisotropy and it is largely used to image white matter (WM) and its pathologies. The potential of DTI to assess

glioma cell migration is now largely accepted by radiologists (7, 8). However, clinical studies frequently lack histological confirmation and validation, requiring studies on relevant animal glioma models that maintain the migratory phenotype.

In order to develop relevant glioma models, several tumor cells derived from surgical fragments from human glioma are cultured under hypoxic conditions (at 3% O₂) rather than 20%, a condition which we demonstrated mandatory to preserve the growth characteristics of the tumor in its microenvironment (10, 11). In this context, the analysis of Comparative Genetic Hybridization (CGH) and flow cytometry is systematically performed to guide the development of a specific tumor phenotype.

After cell characterization, the developed Glioblastoma tumor model was characterized using multi-parametric MRI in vivo. As the in vivo MRI experiments showed that glioma cell invasion could be detected at an early stage preceding edema, tumor mass formation, blood brain barrier (BBB) leakage and tumor angiogenesis, a high spatial resolution 3D DTI ex vivo on fixed brains was designed to validate in vivo diffusivity and fractional anisotropy (FA) DTI parameter changes especially in the corpus callosum (CC), a known path of cell migration. In addition, two photon microscopy analyses were performed on the same brains with the aim to demonstrate the migratory phenotype of the Glioblastoma tumor model but also to validate quantitatively microscopic 3D DTI results. Transmission electron microscopy (TEM) focused on the CC, was used to validate the origin of DTI parameter changes (diffusivities and FA). The widely studied, compactly growing and non-invasive U87-MG human glioma model was used for comparison.

Experimental

Cell cultures

Glioblastoma tumor cells were established and amplified from a fresh glioblastoma surgical specimen (World Health Organization grade IV), as previously described.(12) Briefly, these cells were maintained in culture as neurospheres at 3% O₂ in serum free medium DMEM/F12 (Life Technologies) supplemented with 0.5 N₂ and 0.5 B-27 (Life Technologies) and 30 ng/ml bFGF and 30 ng/ml EGF (Peprotech). The human glioma cell line U87-MG (ATCC n° HTB-14) was cultured in DMEM medium with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies) at 20% O₂. Green fluorescent protein (GFP) expressing cells were obtained following transduction of the GFP gene into glioma cells (Glioblastoma and U87-MG) by using a GFP-expressing lentivirus (Sigma) construct which also expressed the puromycin resistance gene. Glioblastoma cells expressing GFP were amplified as neurospheres via puromycin selection (5µg/ml). For human samples, written consent was obtained from each patient or family and the experimental procedure was approved by the Biological Resource Center Ethics Review Board 38043 Hospital of Grenoble.

Flow cytometry analysis

After FcR Blocking (FcR Blocking Reagent, Miltenyi biotec), 300 000 cells were incubated with the following antibodies during 20 min at 4°C: CD44-FITC (mouse IgG1, clone DB105, Miltenyi Biotec), CD133-PE (mouse IgG1 clone AC133, Miltenyi Biotec), CD184-APC (CXCR4, mouse IgG2a, clone 12G5, Miltenyi Biotec) or A2B5-APC (mouse IgM, clone 105HB29, Miltenyi Biotec). Corresponding isotype antibodies were purchased from Miltenyi Biotec. Cells were gated on their FSC/SSC characteristics, cell doublets were eliminated by analysis of the FSC-H/FSC-A dot plot and dead cells were eliminated by a 7-AAD (Sigma) staining. C6 Accuri flow cytometer (BD) was used.

Microarray analysis

Analysis of the gene copy number variation in Glioblastoma cells was done by DNAvision. Briefly, DNA from Glioblastoma cells was extracted using the DNeasy® Blood and tissue kit from Qiagen and SNP analysis were performed using SNP 6.0 chips from Affymetrix.

Animals

Six week old female immune deficient nude mice (*Harlan*) weighing 25-30g were used. All animal procedures, including the intracerebral injection of glioma cells, were reviewed and approved by the Internal Evaluation Committee for Animal Welfare of the Grenoble Institute of Neurosciences in accordance with the guidelines of the French Government (decree 87-848 of October 19, 1987, licenses 380719, A3851610004 and B3851610003 from the French Ministry of Agriculture) and the European Guidelines for the Protection of Vertebrate Animals. The in vivo MRI study was performed on 9 mice (Glioblastoma (n=6) and Sham (n=3)), the 3D microscopic-DTI combined with optical microscopy on fixed brain was performed on 9 mice (Glioblastoma (n=6) and Sham (n=3)), and the electron microscopy was performed on 6 mice (Glioblastoma (n=3) and Sham (n=3)).

Xenograft glioma models

For both Glioblastoma and U87-MG models, mice were injected with 500000 glioma cells (1 μ L/min, volume=3 μ L) in the right striatum (Bregma level, 2mm right, 2.5mm depth) under 3% isoflurane in air and local subcutaneous infiltration of 2mg bupivacaine to cover post-surgical scalp pain. The sham mice underwent the same implantation surgery with an equivalent saline volume instead of glioma cells.

Fixed-brain preparation

The brains were fixed by transcardiac perfusion of a 4% paraformaldehyde solution in phosphate buffered saline containing 6.25mM of Gd-DOTA (Guerbet Laboratories), a

paramagnetic MRI contrast agent. After removing surrounding skin and muscles, the skulls containing the intact brains were immersed in the same solution during four days and then conserved in Fomblin-oil (FenS chemicals) for MRI acquisitions performed at least eleven days after fixation.

MRI

In vivo experiments were carried out at 4.7T in a Bruker Biospec USR AV III 4.7T/400 mm horizontal scanner while experiments on fixed-brains were carried out at 7T in a Bruker Biospec USR AV III 7T/200mm horizontal scanner using radiofrequency (RF) birdcage volume coil that provides homogenous RF excitation across all the mouse brain for transmission and a head surface coil for reception (Grenoble MRI facility IRMaGE). Both magnets are equipped with magnetic field gradients of 600mT/m strength and interfaced with ParaVision 5.1 software.

In vivo multi-parametric MRI

In vivo acquisitions on mice were performed under isoflurane anesthesia (1-2%) one, two and three months after implantation. Mice were equipped with an intraperitoneal catheter for Gd-DOTA administration.

The multi-parametric MRI protocol consisted of T_2 -weighted (T_{2w}), pre- and postcontrast T_1 -weighted (T_{1w}), DTI and rapid steady state T_1 (RSST₁) acquisitions for microvasculature study.(14)

The geometric parameters were identical for all acquisitions: eight coronal slices of 0.7 mm thickness with a field of view (FOV) of $15 \times 15\text{mm}^2$. A rapid acquisition with refocused echo (RARE) sequence was used for T_{2w} (TR/TE = 3500/33 ms, number of averages NA = 6, RARE factor = 8) and a multi-slice-multi-echo (MSME) sequence for T_{1w} (TR/TE = 300/6.3 ms, NA = 8) images with a matrix of 128×128 . DTI Echo Planar Imaging (EPI) was acquired (TR/TE = 2000/36 ms, NA = 26, 4 segments) with a matrix of 128×128 . Diffusion

gradients with a duration of $\delta = 5$ ms and a separating delay $\Delta = 10$ ms were applied in 6 different orientations in the [X,Y,Z] planes: [1,1,0]; [0,1,1]; [1,0,1]; [1,-1,0]; [0,1,-1]; [-1,0,1] with a b-value of 1000 s/mm².

The RSST₁ method (13) consists of a 3D inversion recovery sequence (TR/T_{inv} = 750/303 ms) and a series of RF pulses ($\alpha = 10^\circ$, TR/TE = 6.5/1.2 ms.). The RSST₁ signal was acquired for 5 minutes pre (S_{pre}) and for 55 minutes post (S_{post}) intraperitoneal Gd-DOTA injection (6mmol/kg, 12 ml/kg) with a temporal resolution of 6 s (matrix 8 × 32 × 32). The normalized RSST₁ signal over time is given by :

$$S_{norm}(t) = (\langle S_{post}(t) \rangle - \langle S_{pre} \rangle) / \langle S_0 \rangle \quad [\text{Eq. 1}]$$

S_{pre} and S_{post} are the RSST₁ signals acquired before and after Gd-DOTA administration, S₀ is the signal corresponding to the equilibrium magnetization of the intra- and extravascular compartment acquired with TR = 10 s without inversion, and $\langle \rangle$ signifies signal averages over time intervals with constant signal.

In the absence of BBB permeability, i.e. when the S_{post} signal is constant over time, blood volume fraction (BVf) was quantified according to

$$BVf = (\langle S_{post} \rangle - \langle S_{pre} \rangle) / \langle S_0 \rangle \quad [\text{Eq. 2}]$$

3D DTI of fixed-brain

As we described in paragraph “Fixed-brain preparation”, the paraformaldehyde solution used to preserve cerebral tissue was supplemented with Gd-DOTA, a paramagnetic contrast agent, to reduce the T₁ relaxation time permitting short repetition times for MR scan acceleration. The Gd-DOTA concentration of 6.25mM was optimized in a preliminary study. Eleven days after intracardiac perfusion (4 days in paraformaldehyde supplemented with Gd DOTA and 7 days in Fomblin) T₁ and T₂ reached constant values of 62 ms and 16 ms and were shortened

by a factor of about 30 and 5 respectively. To assure good NMR signal sensitivity, T_2 should be in the order of the echo time, around 16 ms. Fomblin-oil was used to avoid magnetic susceptibility artifacts since its chemical composition does not contain hydrogen atoms.

Fixed brain of the Gliob6 model (n=6), U87-MG model (n=6) and Sham mice (n=6), were imaged using the 3D-DTI sequence with high isotropic spatial resolution of $80 \times 80 \times 80 \mu\text{m}^3$ (microscopic 3D-DTI), a FOV of $20 \times 8.5 \times 11.5 \text{ mm}^3$ and NA=18 for a total duration of 59 hours. Diffusion gradients with durations of $\delta=3.5 \text{ ms}$ and separating delay $\Delta=8 \text{ ms}$, were applied in 6 different orientations [1,1,0]; [0,1,1]; [1,0,1]; [1,-1,0]; [0,1,-1]; [-1,0,1] with a b-value of 1500 s/mm^2 , greater than the value used in vivo, since the extracellular water is more restricted due to cell swelling in ex vivo tissue. A 3D spin-echo DTI sequence with Cartesian K-space sampling was used and preferred to the rapid EPI sequence to reach high isotropic spatial resolution (microscopic 3D-DTI) without geometrical distortions and susceptibility artifacts.

MRI analysis

All MRI images were analyzed using homemade Matlab (Mathworks[®], Natick, MA, USA) software. Regarding diffusion data, for each pixel or voxel, the tensor was diagonalized. Eigenvalues ($\lambda_1 > \lambda_2 > \lambda_3$) corresponding to the diffusivities and their corresponding eigenvectors ($\vec{V}_1, \vec{V}_2, \vec{V}_3$) were obtained. Mean diffusivity (MD), D_{\perp} and FA maps were calculated according to:

$$\text{MD} = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3} \quad [\text{Eq. 3}]$$

$$D_{\perp} = \frac{\lambda_2 + \lambda_3}{2} \quad [\text{Eq. 4}]$$

$$FA = \frac{\sqrt{3}}{2} \sqrt{\frac{(\lambda_1 - MD)^2 + (\lambda_2 - MD)^2 + (\lambda_3 - MD)^2}{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}} \quad [\text{Eq. 5}]$$

FA-color maps were generated according to a color code of the direction of the main eigenvector \vec{v}_1 which corresponds to the main diffusivity $\lambda_1 = D_{//}$. The colors blue, red and green were attributed to anterior-posterior, lateral and dorsal-ventral directions respectively and the pixel intensity was weighted by the FA value to highlight the anisotropic brain structures. The DTI parameters differences between sham and tumor bearing mice were tested by Welch's t test. Statistical analyses were performed using R software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Data are presented as mean \pm standard deviation.

Fluorescence microscopy

After DTI acquisitions, brains were extracted from the skulls and 300 μm thick coronal brain slices were cut using a vibratome (V1000S, Leica) and stored at 4°C. Images of the whole coronal brain slices were acquired with a multi-zoom AZ100 Nikon microscope using a wide-field CCD camera (Orca R2, Hamamatsu). Fluorescence and oblique light illumination were combined in composite images to detect GFP-fluorescent glioma cells and axon fiber bundles simultaneously.

Two-photon Laser Scanning Microscopy (LSM 7MP, ZEISS, Jena), was performed with a 20x water immersion objective (ZEISS, N.A. 1.0) and a motorized platform for the acquisitions of mosaic images in 3D. Fluorescence signal detection was obtained simultaneously on three photon multiplier tubes. ImageJ software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) was used for the reconstruction of mosaics.(16)

Electron Microscopy

Gliob6 (n=3) and sham (n=3) brains were rapidly excised and the CC was fixed in 2.5% glutaraldehyde (0.1M cacodylate buffer, pH 7.4) for 24 h at room temperature. Samples were post-fixed with 1% osmium tetroxide in 0.1M cacodylate, pH 7.2 for 1 h at 4°C, stained with

1% uranyl acetate (pH 4) in water for 1 h at 4°C and dehydrated through graded alcohol concentrations before being embedded in Epoxy Embedding Medium (Fluka, Sigma-Aldrich). Transversal ultrathin sections (60 nm-thickness) of the CC were stained with 5% uranyl acetate and 0.4% lead citrate before being observed under a transmission electron microscope at 80kV (Jeol 1200 EX, JEOL Ltd). Images were acquired with a digital camera (Veleta, SIS, Olympus).

MRI and optical data correlation

Different regions of interest (ROIs \approx 0.1mm²) along the CC were drawn on MRI and two-photon images independently with a particular attention to delineate the same brain areas using the contrast of the CC in both modalities. ROIs were drawn on slices around the implantation to avoid the artifacts due to the needle trajectory. In each ROI, GFP encoded Gliob6 cells were manually counted and Gliob6 cell density (Gliob6 cell number / ROI surface) was calculated and compared to D_{\perp} changes, computed according to:

$$\Delta D_{\perp} \% = 100 \frac{D_{\perp \text{Gliob6}} - D_{\perp \text{Sham}}}{D_{\perp \text{Sham}}} \quad [\text{Eq. 6}]$$

The Pearson rank correlation coefficient was used to correlate $\Delta D_{\perp} \%$ to Gliob6 cell density.

Results

CGH analysis

The analysis of gene copy number changes of the Gliob6 cells showed a gain of 7q and 7p and a loss of 10q and 10p (68%) chromosome arms (Fig. 1A). These variations are the two most common genetic alterations in glioblastoma(17), confirming the glioblastoma signature of Gliob6 cells. Deletions of chromosome 6, a common abnormality in glioma tumors(18), are also detected.

Flow cytometry analysis

We secondarily analyzed membrane expression of stem cell markers (CD133, A2B5) and putative membrane markers associated with glioma invasiveness and severity (CD44, CXCR4) on our Gliob6 cells and compared to U87-MG cells. Gliob6 expressed stem markers which were found to be CD133⁺A2B5⁺ contrary to U87-MG cells which were found CD133⁻A2B5⁻. The expression of CXCR4 was found increased in Gliob6 compared to U87-MG. Both cell types express a high level of CD44 with a higher level in U87-MG (Fig. 1B).

In vivo multiparametric MRI

During the first month of growth, no tumor was detected while during the second month tumor occurrence was sometimes detectable on T_{2w} acquisitions as a slight hyper-intensity with respect to normal brain tissue (Fig. 2A), as seen in the needle trajectory. At the 3rd month, the tumor occupied substantial parts of the ipsilateral hemisphere with blurred margins resulting in a midline shift (Fig. 2B).

BVf quantification

During the 2nd month (Fig. 2C), the RSST₁ signal in ipsilateral and contralateral hemispheres remained constant after intraperitoneal injection of Gd-DOTA demonstrating the absence of Gd-DOTA extravasation, and consequently showing a relatively intact BBB. BVf in ipsilateral regions was not statistically different from BVf in contralateral contrast enhanced

MR-visible tumor ($1.7 \pm 0.6\%$ vs $1.8 \pm 0.6\%$ in the caudate putamen), reflecting the absence or a very limited tumor angiogenesis. However during the 3rd month, the RSST₁ signal increase in the tumor reveals extravasation of Gd-DOTA, i.e. pathologically increased microvascular permeability.. Indeed in figure 2B we can clearly see a tumor BVf increase with regions reaching over 10% of BVf.

In vivo DTI

At two months, a FA decrease (0.38 ± 0.03 vs 0.42 ± 0.03 i.e. -11%) and a D_{\perp} increase ($5.9 \cdot 10^{-4} \pm 5 \cdot 10^{-5}$ vs $5.5 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ mm²/s i.e. +9%) were detected in the ipsilateral CC (Fig. 2D) compared to sham mice but were not significant ($p=0.073$ and $p=0.26$ respectively). In the ipsilateral caudate putamen (around the site of tumor cell implantation), a non-significant ($p=0.20$) increase of FA (0.24 ± 0.01 vs 0.22 ± 0.02 i.e. +9%) was detected compared to contralateral caudate putamen.

At three months, compared to sham mice, a significant ($p<0.05$) D_{\perp} increase ($6.6 \cdot 10^{-4} \pm 7 \cdot 10^{-5}$ vs $5.4 \cdot 10^{-4} \pm 7 \cdot 10^{-5}$ mm²/s i.e. +22%) and a significant ($p<0.05$) FA decrease (0.34 ± 0.05 vs 0.43 ± 0.04 i.e. -21%) was found in the ipsilateral CC as can be observed on the FA map (Fig. 2B). In the contralateral CC, a FA decrease (0.39 ± 0.04 vs 0.42 ± 0.02 i.e. -7%) and a D_{\perp} increase ($6 \cdot 10^{-4} \pm 5 \cdot 10^{-5}$ vs $5.6 \cdot 10^{-4} \pm 8 \cdot 10^{-6}$ mm²/s i.e. +7%) were detected compared to sham mice but were not significant ($p=0.26$ and $p=0.92$ respectively). Moreover, the contrast enhanced tumor shows a FA increase compared to contralateral caudate putamen (0.31 ± 0.02 vs 0.24 ± 0.01 i.e. +29%), ($p<0.001$).

Gliob versus U87-MG

Taking into account the growth difference of these two models, experiments were performed at two months of tumor growth for Gliob on the basis of our *in vivo* MRI follow-up and at 3 weeks for U87-MG which corresponds to an advanced stage of tumor growth without mass

effect in the contralateral hemisphere. Microscopic 3D-DTI were performed on fixed brains to reach high spatial resolution, necessary for accurate quantifications in small animals.

Microscopic images and data analysis (3D-DTI and fluorescence microscopy) are presented in figure 3. The U87-MG glioma model formed rapidly a solid tumor mass as confirmed by a well-delimited region of high MD ($6.6.10^{-4} \pm 3.10^{-5}$ vs $3.4.10^{-4} \pm 2.10^{-5}$ mm²/s i.e. +94%, $p < 0.001$) (Fig. 3A). In addition, on fluorescence microscopic images, no individual U87-MG cell was detected beyond compact tumor, confirming the absence of U87-MG cell migration (Fig. 3C-D). Conversely, we observed a gradient of fluorescence intensity from the Gliob6 cell injection site along the CC, indicating the migrating characteristic of the Gliob6 model. On FA-color maps (Fig. 3B), an enlargement of the ipsilateral CC was observed in comparison to sham mice, surely due to the presence of migrating glioma cells.

Quantitative analysis of Gliob6 cell migration

DTI parameters of the CC for both models are presented in figure 3E and were compared to sham mice. In the ipsilateral hemisphere, FA decrease of 28% ($p < 0.005$) and D_{\perp} increase of 95% ($p < 0.005$) were detected in the Gliob6 model while no changes were observed in the U87-MG model. For the Gliob6 model, the FA decrease of 12% and D_{\perp} increase of 25% ($p < 0.001$) between ipsilateral and contralateral CC are in accordance with the progressive Gliob6 cell infiltration shown by fluorescence microscopy. Finally, as D_{\perp} variations are shown more sensitive to CC alterations, this parameter is used in the rest of this study.

To confirm that micro-architecture of the CC was affected in the Gliob6 model, electron microscopy was performed on several subparts of the CC (Fig. 4). In the ipsilateral CC, defects in the organization of myelinated axons were noticed in Gliob6 bearing mice. The homogeneous compact structure of fibers observed in the sham mouse is strongly disturbed in Gliob6 CC with an enlargement of extra-axonal space. These structural alterations may explain the variations in DTI parameters.

Figure 5A shows continuous and significant regional variations of D_{\perp} along the CC. From a starting point in ipsilateral CC (ROI_{ipsi0}) to an arrival point in contralateral CC (ROI_{contra0}) we see a progressive $\Delta D_{\perp}\%$ decrease. This finding agrees with the fluorescence intensity gradient observed in figure 3C. In addition, an interesting finding concerns the ipsilateral caudate putamen (region around the site of Glioblastoma implantation) in which a FA increase of 38% (0.25 ± 0.03 vs 0.18 ± 0.01) was found significant ($p < 0.001$) compared to contralateral caudate putamen (Fig. 5B).

On two-photon microscopy images (Fig. 6A) in which each individual cell is detectable, the presence of a large population of Glioblastoma cells in the CC is confirmed. Glioblastoma cells were also detected in the cortex and brain structures surrounding the caudate nucleus but not in the hippocampal region. Figure 6B compares DTI and two-photon microscopy data. The relation between $\Delta D_{\perp}\%$ changes and Glioblastoma cell density obtained from ROIs corresponding to the same brain region are plotted. A Pearson correlation ($p < 0.001$) is observed with a coefficient of 0.69, confirming a strong relation between D_{\perp} changes and the presence of Glioblastoma cells. In the CC, $\Delta D_{\perp}\%$ appears sensitive for a range of Glioblastoma cell density from 0 to $8 \cdot 10^2$ cells/mm².

Discussion

Current rodent models of various intracranial tumors generally fail in reproducing migration patterns. Using a primary cell line from a glioblastoma patient cultivated under 3% O₂ (rather than 20% O₂) as neurospheres in a serum-free medium under 3% O₂, we were able to show that the migratory phenotype of Glioblastoma cells is preserved. Glioblastoma cells display a cancer stem cell phenotype (CD133⁺A2B5⁺) and a higher expression of CXCR4 compared to U87-MG. CXCR4 pathway has been implicated in the invasiveness of glioma cells due to the local secretion of SDF-1 (a CXCR4 ligand) and CXCR4 expressing cells show increased ability to invade tissue as demonstrated by the efficiency of CXCR4 inhibitors or blocking antibodies to inhibit invasive growth pattern.(20-22) U87-MG and Glioblastoma cells express a high level of CD44. This glycoprotein which is a receptor for extracellular matrix components such as hyaluronic acid and osteopontin has also been implicated in invasiveness of glioma cells.(23)

Using in vivo multi-parametric MRI, we showed that Glioblastoma model is reproducible, characterized by slow tumor growth (three months to detect first anatomical signs by conventional MRI), late angiogenesis and late BBB leakage. At two months of growth, the migratory phenotype of Glioblastoma cells is dominant without angiogenesis and edema contrary to current models such as U87. As observed with two-photon microscopy in the CC, these cells have a strong affinity to WM fibers and use them to travel long distances within the brain a known mechanism of the high grade glioma.(24) In addition, we observed that Glioblastoma cells adopted an elongated shape which we interpret as an active migration.(19)

The well-known symptoms of the high grade glioma appear later, at three months. In this model, glioma cell migration precedes tumor mass formation leading to a model of glioma cell migration until two month. Invasion which precedes tumor mass has also been reported in the literature (25). It appears to be a relevant model to study glioma cell migration which can

be useful to test new therapeutic strategies currently developed to stop or invert glioma cell migration within a time window of two months without interferences with others glioma symptoms. Significant FA decrease and D_{\perp} increase were detected in vivo in the CC at three month of tumor growth, confirming microstructural alterations in the Glioblastoma model. However, due to the very small mouse brain, these changes were not significant in vivo at two months of tumor growth. We therefore developed 3D-DTI with high spatial resolution on fixed-brains to accurately correlate DTI parameter changes to cell migration in the CC and to investigate other tumor regions.

For the very small mouse brain, a time consuming cartesian k-space was preferred (59 hours with a signal to noise ratio of 104) rather than the rapid EPI or spiral trajectories (28) to avoid the artifacts that can occur in diffusion measurements (susceptibility, off-resonance, eddy currents). Naturally for therapeutic trials, in vivo investigations are required. Rapid microscopic 3D-DTI methods for in vivo preclinical applications are under development at 9.4T using a cryogenic RF coil and Super-Resolution methods applied on 2D images (29, 30). First successful results were recently obtained and the method could be easily applied in clinic.

As previously described in the clinic (26) and in preclinical work (27), the present study highlights and validates the utility of FA and D_{\perp} parameters to early detect tumor cell migration in the CC. The origin of these variations was assessed by transmission electron microscopy observations (Fig. 4). Glioblastoma cells may infiltrate the CC moving aside the axons, leaving space behind them which may be used by other cells for migration. The disorganization and the spread of myelinated axons should explain the observed “thickening” of the CC in FA-color maps, and the increase of the extra-axonal volume should explain the FA decrease and the D_{\perp} increase.

At two months of tumor growth, D_{\perp} variations seem to be more sensitive to CC alterations. D_{\perp} changes were correlated with cell density measured by two-photon microscopy on the same brains (Fig. 6), showing a linear behavior for a range of cell density from 0 to $8 \cdot 10^2$ cells/mm². To our knowledge, this the first time that the origin of FA and D_{\perp} changes due to cell migration in WM is robustly assessed and that these variations are quantitatively correlated to infiltrative cell density.

The FA decrease and D_{\perp} increase alone cannot confirm reliably the glioma cell migration in the CC, because the same changes can also be detected in the presence of vasogenic edema which occurs following BBB lesion. To discriminate between these two pathophysiological alterations, vascular permeability was assessed in vivo using MRI contrast agent. Up to two months of Gliob tumor growth, BBB rupture was not detected (Fig. 2C) confirming that the DTI changes are predominantly due to the glioma cell migration.

Moreover, in the caudate putamen, around the site of the tumor implantation, a FA increase was systematically detected at two months. At this stage, tumor is still not visible on conventional MRI without midline shift whereas at three months, tumor growth is characterized by an increased FA, edema, as well as angiogenesis and BBB leakage. FA increase in grey matter, in the margin of tumor was described in clinic as specific to glioblastoma (31) and reinforces the conclusion that the Gliob model mimics the clinical disease quite well. The origin of this FA increase reflects some microarchitecture organization in the tumor microenvironment which can be explained by compressed WM fibers reducing the extracellular volume fraction, or by an increase of the microvasculature at the onset of the angiogenic process but as shown by optical microscopy, it should be due to a spatial organization of Gliob cells along axons or microvasculature in the course of migration.

Finally, at two months of tumor growth, the new Glioblastoma model and DTI technique together were validated as a robust experimental tool to study fundamental biological hypotheses of glioma cell migration. The FA increase in grey matter and the FA decrease with D_{\perp} increase in the WM can be considered as an early biomarker of tumor invasion in the case of the absence of BBB leakage and angiogenesis formation which should be inspected. Applying microscopic 3D-DTI during the temporal window where the Glioblastoma cell migration is not yet affected by any other pathological process, the migration of Glioblastoma cells in the CC is accurately quantified and mechanisms at the origin of DTI parameters variations are assessed and validated by multimodal imaging techniques.

Acknowledgements

All imaging was performed on the Intravital Microscopy and IRMaGE platforms of Grenoble partners of France Life Imaging (FLI) and on the electron microscopy facility of the Grenoble Institute of Neuroscience. This research was supported by la Ligue Contre le Cancer Comité Isère 2010-2014 and l'Institut National du Cancer 2009-2012 (INCa – AAPFORMATION2009). We are grateful to Anne Bertrand for biotechnical assistance to set-up electron microscopy experiments. We thank Jean-Christophe Deloulme for his assistance in brain fixation, Emilie Langard and Franck Mauconduit for their participation in the beginning of the 3D-diffusion MRI set-up and Didier Wion for the Glioblastoma cell development.

References

1. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *New Engl J Med*. 2008;359(5):492-507.
2. Inoue S, Ichikawa T, Kurozumi K, Maruo T, Onishi M, Yoshida K, Fujii K, Kambara H, Chiocca EA, Date I. Novel Animal Glioma Models that Separately Exhibit Two Different Invasive and Angiogenic Phenotypes of Human Glioblastomas. *World Neurosurgery*. 2012;78(6):670-682.
3. Claes A, Idema AJ, Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol*. 2007;114(5):443-458.
4. Lunsford LD, Martinez AJ, Latchaw RE. Magnetic resonance imaging does not define tumor boundaries. *Acta radiol. Supplementum*. 1986;369:154-156.
5. de Groot JF, Fuller G, Kumar AJ, Piao Y, Eterovic K, Ji YJ, Conrad CA. Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice. *Neuro-Oncology*. 2010;12(3):233-242.
6. Keunen O, Johansson M, Oudin A, Sanzey M, Rahim SAA, Fack F, Thorsen F, Taxt T, Bartos M, Jirik R, Miletic H, Wang JA, Stieber D, Stuhr L, Moen I, Rygh CB, Bjerkvig R, Niclou SP. Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *P Natl Acad Sci USA*. 2011;108(9):3749-3754.
7. Deng ZX, Yan Y, Zhong D, Yang G, Tang WY, Lu FJ, Xie B, Liu B. Quantitative analysis of glioma cell invasion by diffusion tensor imaging. *J Clin Neurosci*. 2010;17(12):1530-1536.
8. Abdullah KG, Lubelski D, Nucifora PGP, Brem S. Use of diffusion tensor imaging in glioma resection. *Neurosurg Focus*. 2013;34(4):7.
9. Basser PJ, Pierpaoli C. Microstructural and physiological features of tissues elucidated by quantitative-diffusion-tensor MRI. *J Magn Reson Ser B*. 1996;111(3):209-219.
10. Wion D, Christen T, Barbier EL, Coles JA. PO2 Matters in Stem Cell Culture. *Cell Stem Cell*. 2009;5(3):242-243.
11. Bourseau-Guilmain E, Lemaire L, Griveau A, Hervouet E, Vallette F, Berger F, Menei P, Benoit JP, Wion D, Garcion E. In vitro expansion of human glioblastoma cells at non-physiological oxygen tension irreversibly alters subsequent in vivo aggressiveness and AC133 expression. *Int J Oncol*. 2012;40(4):1220-1229.
12. Platet N, Liu SY, El Atifi M, Oliver L, Vallette FM, Berger F, Wion D. Influence of oxygen tension on CD133 phenotype in human glioma cell cultures. *Cancer Lett*. 2007;258(2):286-290.
13. Perles-Barbacaru AT, Berger F, Lahrech H. Quantitative rapid steady state T1 magnetic resonance imaging for cerebral blood volume mapping in mice: Lengthened measurement time window with intraperitoneal Gd-DOTA injection. *Magn Reson Med*. 2013;69(5):1451-1456.
14. Perles-Barbacaru AT, Lahrech H. A new magnetic resonance imaging method for mapping the cerebral blood volume fraction: the rapid steady-state T-1 method. *J Cerebr Blood F Met*. 2007;27(3):618-631.
15. Sarraf M, Perles-Barbacaru AT, Nissou MF, van der Sanden B, Berger F, Lahrech H. Rapid-Steady-State-T1 signal modeling during contrast agent extravasation: Toward tumor blood volume quantification without requiring the arterial input function. *Magn Reson Med*. 2015;73(3):1005-1014.
16. Preibisch S, Saalfeld S, Tomancak P. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics*. 2009;25(11):1463-1465.
17. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Noushmehr H, Salama SR, Zheng SY, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, Beroukhi R, Bernard B, Wu CJ, Genovese G, Shmulevich I, Barnholtz-Sloan J, Zou LH, Vegesna R, Shukla SA, Ciriello G, Yung WK, Zhang W, Sougnez C, Mikkelsen T, Aldape K, Bigner DD, Van Meir EG, Prados M, Sloan A, Black KL, Eschbacher J, Finocchiaro G, Friedman W, Andrews DW, Guha A, Iacocca M, O'Neill BP, Foltz G, Myers J, Weisenberger DJ, Penny R, Kucherlapati R, Perou CM, Hayes

- DN, Gibbs R, Marra M, Mills GB, Lander E, Spellman P, Wilson R, Sander C, Weinstein J, Meyerson M, Gabriel S, Laird PW, Haussler D, Getz G, Chin L. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell*. 2013;155(2):462-477.
18. Ichimura K, Mungall AJ, Fiegler H, Pearson DM, Dunham I, Carter NP, Collins VP. Small regions of overlapping deletions on 6q26 in human astrocytic tumours identified using chromosome 6 tile path array-CGH. *Oncogene*. 2006;25(8):1261-1271.
 19. Johnson J, Nowicki MO, Lee CH, Chiocca EA, Viapiano MS, Lawler SE, Lannutti JJ. Quantitative Analysis of Complex Glioma Cell Migration on Electrospun Polycaprolactone Using Time-Lapse Microscopy. *Tissue Eng Pt C-Meth*. 2009;15(4):531-540.
 20. Schulte A, Guenther HS, Phillips HS, Kemming D, Martens T, Kharbanda S, Soriano RH, Modrusan Z, Zapf S, Westphal M, Lamszus K. A Distinct Subset of Glioma Cell Lines with Stem Cell-like Properties Reflects the Transcriptional Phenotype of Glioblastomas and Overexpresses CXCR4 as Therapeutic Target. *Glia*. 2011;59(4):590-602.
 21. Ehtesham M, Winston JA, Kabos P, Thompson RC. CXCR4 expression mediates glioma cell invasiveness. *Oncogene*. 2006;25(19):2801-2806.
 22. Ehtesham M, Thompson RC. CXCR4-Expressing Glial Precursor Cells Demonstrate Enhanced Migratory Tropism for Glioma. *J Cancer Ther*. 2012;3(6):1086-1091.
 23. Akiyama Y, Jung S, Salhia B, Lee SP, Hubbard S, Taylor M, Mainprize T, Akaishi K, van Furth W, Rutka JT. Hyaluronate receptors mediating glioma cell migration and proliferation. *J Neuro-Oncol*. 2001;53(2):115-127.
 24. Giese A, Westphal M. Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery*. 1996;39(2):235-250.
 25. Sampetrean O, Saga I, Nakanishi M, Sugihara E, Fukaya R, Onishi N, Osuka S, Akahata M, Kai K, Sugimoto H, Hirao A, Saya H. Invasion Precedes Tumor Mass Formation in a Malignant Brain Tumor Model of Genetically Modified Neural Stem Cells. *Neoplasia*. 2011;13(9):784-U728.
 26. Stadlbauer A, Ganslandt O, Buslei R, Hammen T, Gruber S, Moser E, Buchfelder M, Salomonowitz E, Nimsky C. Gliomas: Histopathologic evaluation of changes in directionality and magnitude of water diffusion at diffusion-tensor MR imaging. *Radiology*. 2006;240(3):803-810.
 27. Lope-Piedrafita S, Garcia-Martin ML, Galons JP, Gillies RJ, Trouard TP. Longitudinal diffusion tensor imaging in a rat brain glioma model. *Nmr Biomed*. 2008;21(8):799-808.
 28. van de Looij Y, Mauconduit F, Beaumont M, Valable S, Farion R, Francony G, Payen JF, Lahrech H. Diffusion tensor imaging of diffuse axonal injury in a rat brain trauma model. *Nmr Biomed*. 2012;25(1):93-103.
 29. Van Reeth E, Tham IWK, Tan CH, Poh CL. Super-resolution in magnetic resonance imaging: A review. *Concept Magn Reson A*. 2012;40A(6):306-325.
 30. Scherrer B, Gholipour A, Warfield SK. Super-resolution reconstruction to increase the spatial resolution of diffusion weighted images from orthogonal anisotropic acquisitions. *Med Image Anal*. 2012;16(7):1465-1476.
 31. Tropine A, Vucurevic G, Delani P, Boor S, Hopf N, Bohl J, Stoeter P. Contribution of diffusion tensor imaging to delineation of gliomas and glioblastomas. *J Magn Reson Imaging*. 2004;20(6):905-912.

Figures

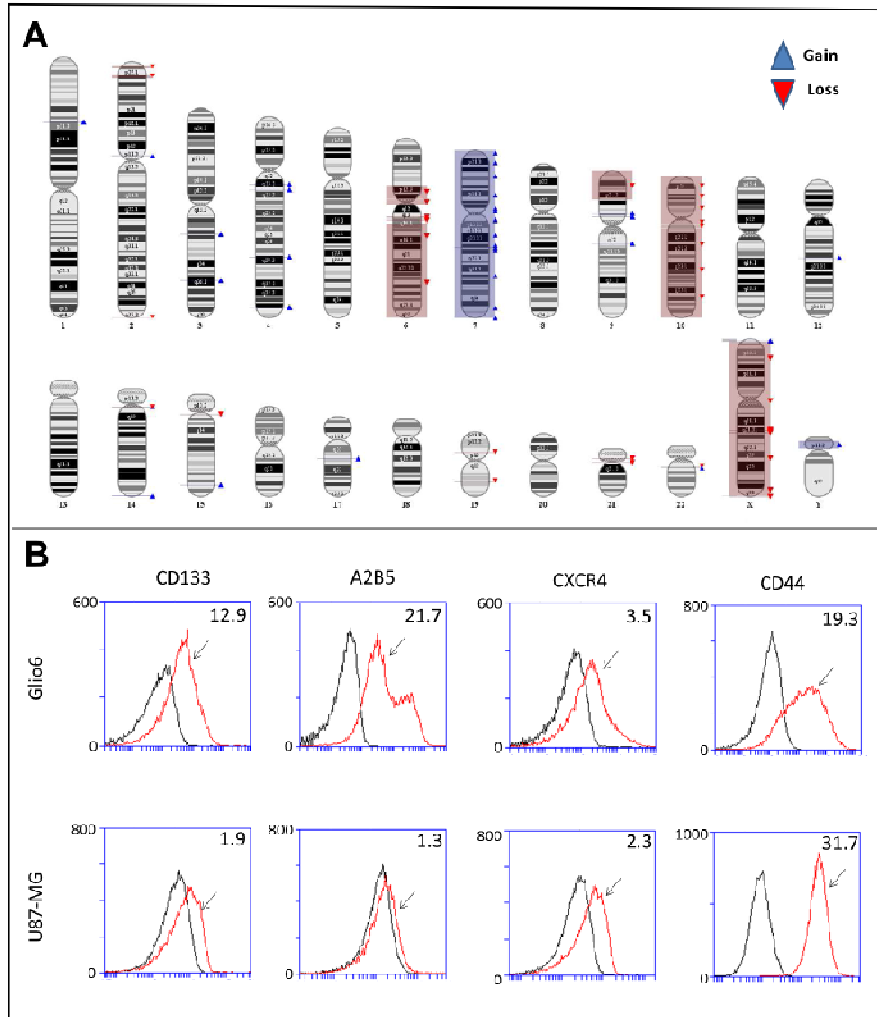


Figure 1. Characterization of Gliob6 cells. (A) Mapping of the genomic DNA copy number variation to individual chromosomes of Gliob6 cells. Blue triangles indicate regions of copy number gain and red triangles indicate copy number loss. (B) Flow cytometry analysis of the expression of stem cell markers (CD133, A2B5), CD44 and CXCR4 in Gliob6 and U87-MG. Histograms show the level of expression of membrane antigens (arrow) compared to the corresponding isotype, ratios of median fluorescence intensity are indicated in the right corner.

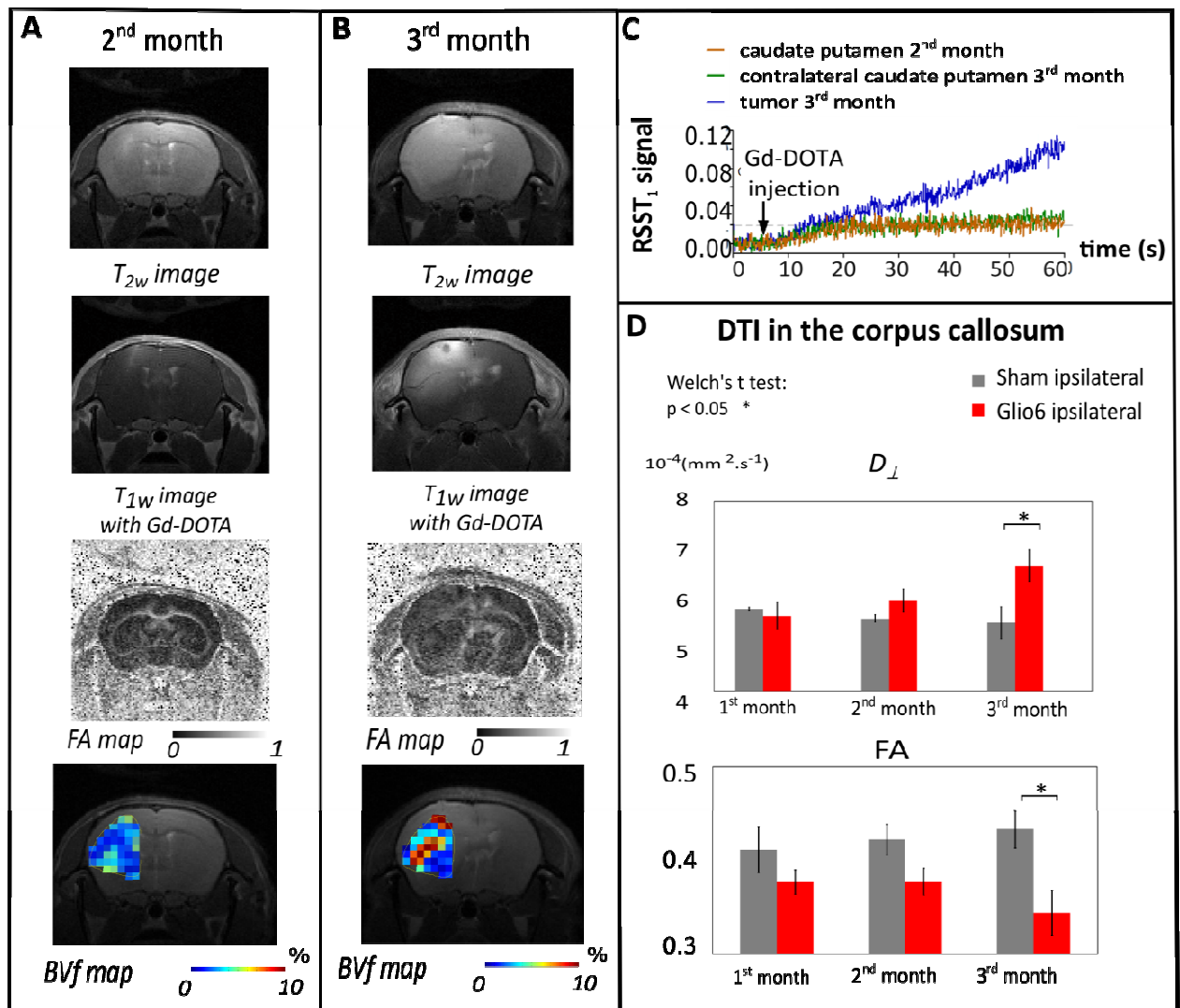


Figure 2. In vivo MRI of Glioblastoma model. (A-B) Typical coronal T_{2w}, contrast enhanced T_{1w}, FA and BVf images of the same brain at two and three months of growth. BVf maps for tumor ROI (outline) are overlaid on T_{2w} images. In comparison to standard animal models, a slow tumor growth is observed. (C) Typical RSST₁ signal behaviour after Gd-DOTA injection. Continuous signal increase is only detected at the 3rd month while the signal reaches constant amplitude before showing a delayed BBB leakage. (D) D_⊥ and FA bars from ipsilateral corpus callosum in vivo: Glioblastoma (n=6) versus Sham (n=3).

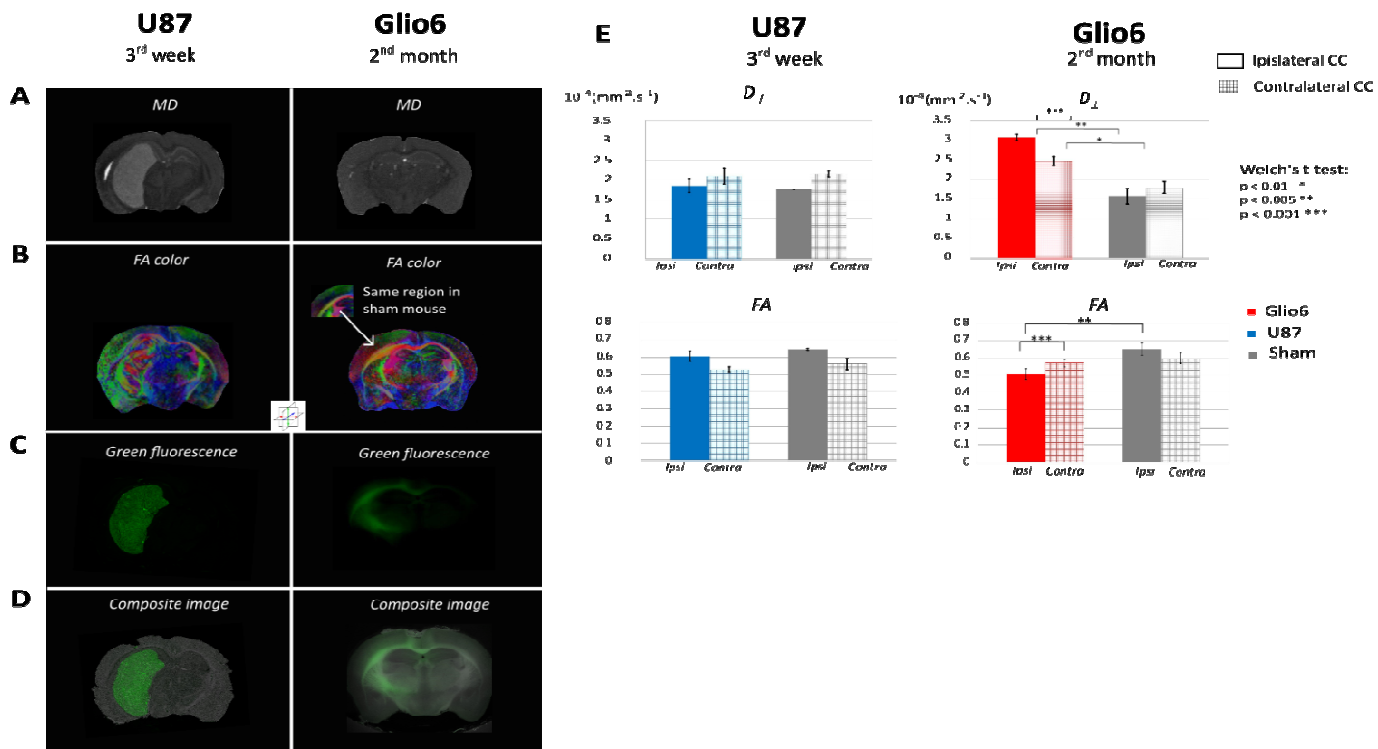


Figure 3. Comparison of Gliob6 model to U87-MG using DTI parameters (MD, D_{\perp} and FA) and wide-field fluorescence microscopy on fixed-brains. (A) In opposite to U87, the MD image clearly shows that the Gliob6 model doesn't develop a solid tumor. (B) In the Gliob6 model, the FA-color map shows an enlargement of the CC in ipsilateral hemisphere compared to sham mouse (white arrow). (C)-(D) Optical images confirm an infiltrative Gliob6 model with migrating glioma cells detected in the CC, while the U87-MG model exhibits a solid tumor. (E) Significant DTI parameters changes are found in the Gliob6 model (n=6) but not in the U87-MG (n=6). Compared to sham mice (n=3), FA decrease and D_{\perp} increase in Gliob6 model are more pronounced in the ipsilateral hemisphere compared to the contralateral hemisphere.

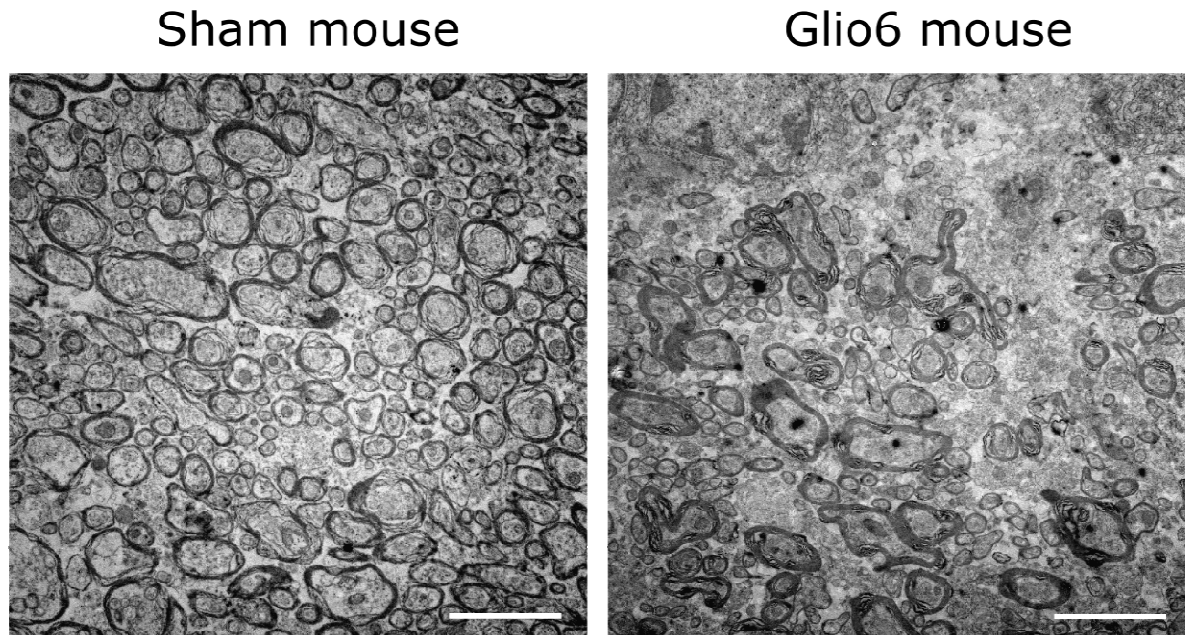


Figure 4. Electron microscopy pictures of the corpus callosum of sham and Gli06 bearing mice. Transversal sections of this tract show the regular and compact organization of myelinated axons in sham mouse. Such organization is lost in Gli06 model since axons are disorganized, spread, resulting in an increase of extra-axonal volume. Scale bars: 5 μ m.

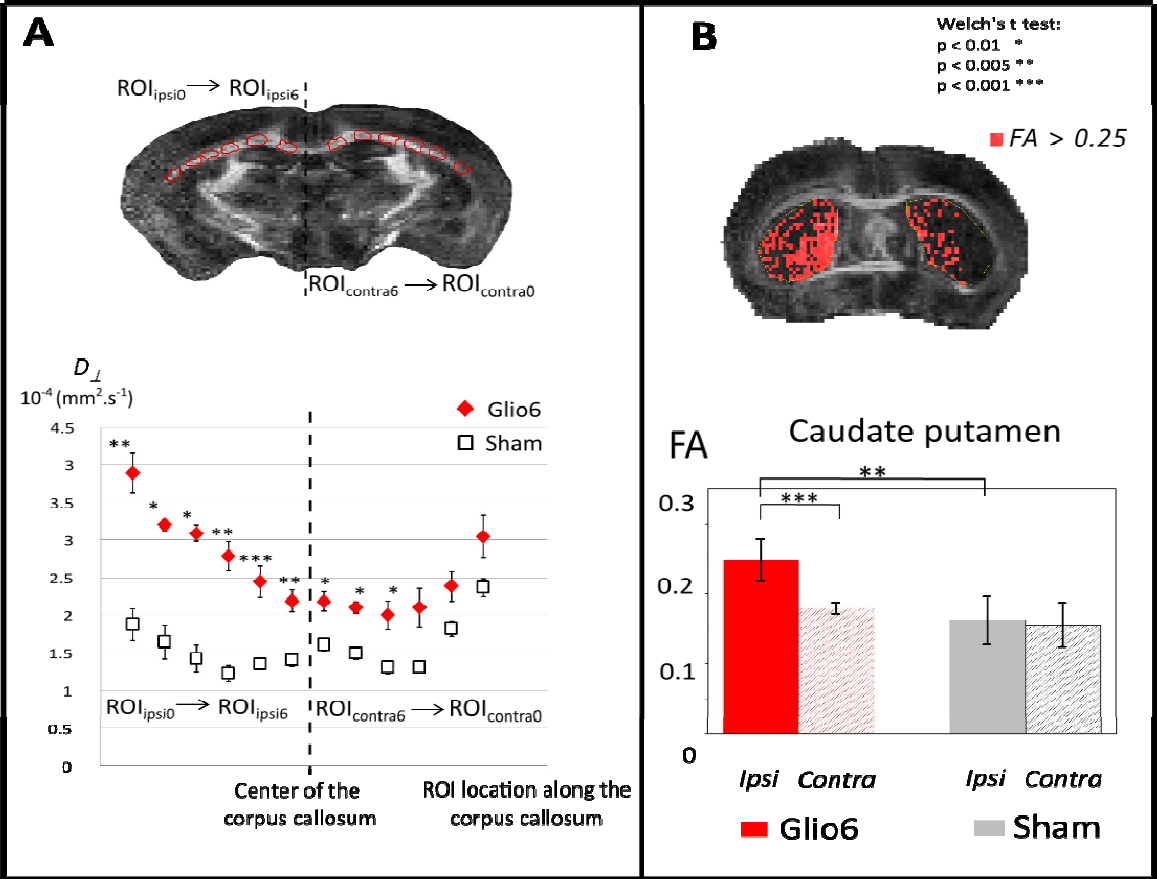


Figure 5. Variations of DTI parameters in Gliob6 model. (A) Regional perpendicular diffusivity (D_{\perp}) analysis along the CC. D_{\perp} versus ROI position from the ipsilateral to contralateral hemisphere is plotted. (B) FA bars from ipsilateral and contralateral caudate putamen: Gliob6 (n=6) versus Sham (n=3). ROI positions are shown in typical coronal FA images.

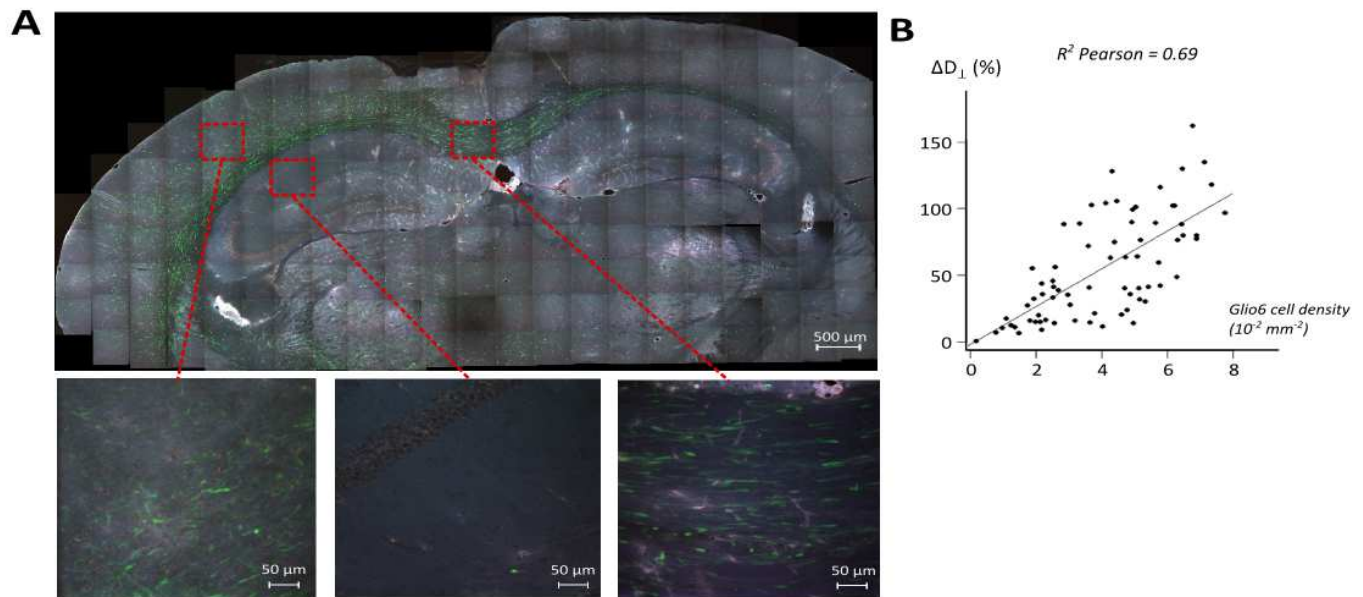


Figure 6. $\Delta D_{\perp}\%$ compared to Gliob6 cell density obtained by two-photon microscopy. (A) Two-photon microscopy images (such as the three at the bottom) compose the top mosaic image. Individual Gliob6 cells are detected principally along the CC and in the cortex but not in the hippocampal region. (B) $\Delta D_{\perp}\%$ is plotted versus Gliob6 cell density in ROI along the CC in all mice. Each point corresponds to a given ROI. The Pearson coefficient of 0.69 ($p < 0.001$) indicates a good correlation confirming that $\Delta D_{\perp}\%$ are predominantly due to the Gliob6 cells along the CC.

CHAPITRE 3

APPLICATION DE L'IMAGERIE DTI SUR LE MODELE MAP6-KO

Structural and connectivity brain defects in MAP6-KO mice- a model of psychiatric diseases- using multimodal magnetic resonance imaging

Contribution au travail

Ce travail est le fruit de collaboration entre notre équipe et l'équipe « Physiopathologie du cytosquelette » dirigée par Annie Andrieux. Ce travail est la continuité d'un travail initié il y a 5 ans et qui vient d'être publié (Deloulme et al., 2015) dans le prestigieux journal Nature Communications.

Je suis le porteur du projet côté IRM alors que Jean-Christophe Deloulme est le porteur côté biologie et modèle de souris MAP6, un modèle apparenté à la schizophrénie. L'étude a commencé par le traitement de données de diffusion DTI 3D acquises avant mon arrivée dans l'équipe. Les résultats se sont avérés prometteurs et ont initiés de nouvelles expériences (IRM volumétrique, histologie, microscopie sur cerveau transparent) dans le but de décrire au mieux l'anatomie cérébrale du cerveau des souris MAP6-KO.

La rédaction de l'article a été faite en collaboration avec Jean-Christophe Deloulme, qui a apporté son expertise en biologie, et sous l'expertise de ma directrice de thèse.

	Conception et design des expérimentations	Mise en place, préparation de l'expérimentation	Acquisition des données	Traitement des données
Figure 1	*			***
Figure 2				**
Figure 3	*			
Figure 4	**			***
Figure 5				**
Figure 6	**	*	***	***
Figure 7				*

*** travail équivalent à d'autres auteurs**

**** principal acteur du travail**

***** seul participant**

L'article est destiné à être soumis à BIOLOGICAL PSYCHIATRY.

Contexte scientifique

L'utilisation de l'IRM de diffusion 3D à haute résolution spatiale a permis de mettre en place plusieurs collaborations avec des équipes travaillant sur les modèles animaux de maladies neurologiques (Annexe 2). Le travail le plus abouti a été conduit avec l'équipe d'Annie Andrieux, sur les thématiques du modèle de souris schizophrène MAP6 portées par Jean-Christophe Deloulme (Deloulme et al., 2015). Le potentiel de l'IRM de diffusion 2D pour détecter des défauts neuroanatomiques a été démontré dans le cadre de la thèse de Franck Mauconduit, sous la direction d'Hana Lahrech. Dans cet article, la disparition de la post-commissure du fornix chez les souris MAP6-KO est détectée.

L'étude du modèle MAP6 s'est approfondie, et l'utilisation de l'IRM de diffusion 3D à haute résolution spatiale a permis de révéler de nombreux détails supplémentaires, présentés dans ce travail. La tractographie (alors impossible avec les acquisitions 2D) de l'ensemble des tracts du cerveau confirme et complète les résultats obtenus précédemment (notamment concernant le fornix), et permet une évaluation globale des inhomogénéités de déficits de matière blanche dans le cerveau des souris MAP6-KO. La tractographie est validée par deux autres modalités : la microscopie sur cerveau transparent, et l'histologie.

Combiné à des résultats de volumétrie des structures du cerveau obtenus à partir d'IRM anatomique haute résolution spatiale, ce travail met en évidence de nouvelles anomalies dans le cerveau des souris MAP6-KO comme la disparition des projections du tract pyramidal vers la capsule interne. Ces défauts de la matière blanche, non détectés en DTI 2D, suggèrent un rôle primordial de la protéine MAP6 lors du neurodéveloppement.

Ce travail confirme l'énorme potentiel de l'IRM de diffusion pour apporter des informations précieuses dans les modèles animaux de maladies neurologiques. L'IRM permet de sonder grâce à une acquisition non invasive l'intégrité de l'ensemble des tracts de la matière blanche, structures clés dans le cerveau, et apporte un confort et un gain de temps considérable en comparaison aux analyses histologiques. Notre étude utilise les stratégies d'acquisition DTI pour étudier les anomalies de la matière blanche dans le cerveau de souris.

Structural and connectivity brain defects in MAP6-KO mice- a model of psychiatric diseases- using multimodal magnetic resonance imaging

Ulysse Gimenez^{1,2}, Franck Mauconduit^{1,2}, Benoit Boulan^{3,4}, Fanny Taurel^{1,2}, Eric Denarier^{3,4,5}, Jacques Brocard^{3,4}, Sylvie Gory-Fauré^{3,4}, Annie Andrieux^{3,4,5}, Hana Lahrech^{1,2*}, Jean Christophe Deloulme^{3,4*}

¹INSERM, U1205, Clinatéc Translational Technology Lab, F-38000, Grenoble, France

²Univ. Grenoble Alpes, Clinatéc Translational Technology Lab, F-38000, Grenoble, France

³INSERM, U836, Grenoble Institut des Neurosciences (GIN), F-38000, Grenoble, France

⁴Univ. Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences (GIN), F-38000, Grenoble, France

⁵Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), iRTSV-GPC, F-38000, Grenoble, France

*These authors equally shared the supervision of this study.

Univ. Grenoble Alpes, GIN, F-38000, Grenoble, France

INSERM, GIN, F-38000 Grenoble, France

Corresponding authors: Jean Christophe Deloulme and Hana Lahrech

Jean-christophe.deloulme@ujf-grenoble.fr (+33 4 56 52 05 39)

hana.lahrech@ujf-grenoble.fr (+33 4 38 78 45 39)

Highlights:

The microtubule-associated protein 6 (MAP6) is involved in neuro-morphogenesis

MAP6 knockout mouse, a model of psychiatric disorders, exhibits specific alterations of brain anatomy

MRI and DTI techniques efficiently detect and quantify the overall neuroanatomy defects in MAP6-KO mice

Keywords

MAP6, MRI, DTI, tractography, MRI volumetry, cleared brains

Abbreviations

DTI: diffusion tensor imaging

HARDI: High Angular Resolution Diffusion Imaging

KO: knock out

MAP: microtubule-associated protein

MRI: magnetic resonance imaging

WT: wild type

WM: white matter

Acknowledgments

The authors acknowledge the excellent technical support of the MRI Facility of Grenoble (IRMaGe). We thank Andrieu, S., Lapierre M. Mehr F., and Rimet F. for animal care and Corrao C., Vossier F., for mouse genotyping. Part of this work was supported by the French National Research Agency Awards 2010 Blanc 120201 CBioS (to A.A.) and by La Ligue contre le cancer comité Isère 2013 (to H. L). U. G received a stipend from the French Minister.

ABSTRACT

MAP6 is a microtubule-associated protein highly expressed in the central nervous system and crucial for cognitive abilities. In particular, MAP6 has been shown to be crucially involved in the establishment of semaphorin3E-dependent brain connectivities including the formation of the fornix, an axonal tract connecting the hippocampus to the hypothalamus. MAP6-KO mice display a large spectrum of social and cognitive impairments that positively respond to chronic treatment with antipsychotics. These features are reminiscent of some symptoms observed in psychiatric diseases and MAP6-KO mice have been proposed to be a useful animal model for the study of some aspects of the pathophysiology of psychiatric diseases including schizophrenia. Here, using magnetic resonance imaging (MRI) approaches, including 3D MRI volumetry and high spatial resolution 3D Diffusion Tensor Imaging tractography, we obtain a comprehensive view of MAP6-KO brain organization. Overall MAP6-KO mice present severe neuro-anatomical defects including volumetric reductions of some brain structures and specific alterations of some white matter tracts. The volume of the thalamus or the cerebellum were dramatically reduced while the hippocampal formation, colliculi or the globus pallidus were not affected. Tractography experiments demonstrated that whereas the stria terminalis was found normal, others tracks such as the anterior commissure or the corticospinal track were severely affected. In addition for some tracts such as the fasciculus retroflexus and the mammillary we found abnormal spatial orientations. Altogether, these results show that the absence of MAP6 not only leads to decreased volumes of specific structures and alterations in specific WM tracts but also results in a new structural organization of the brain. This study also clearly illustrates the very powerful abilities of neuro-imaging tools to generate data allowing a better understanding of development and maintenance of neuronal connectivity

INTRODUCTION

Microtubule effectors regulate microtubule organization and can play key roles during brain development. In neurons, microtubule effectors contribute to a variety of neuronal functions involved in brain wiring such as migration and neuronal polarization, elongation and axonal guidance (Tischfield et al., 2011). Mutations of genes encoding microtubule effectors including Microtubule Associated Proteins (MAPs) such as Disrupted-In Schizophrenia1, the lissencephaly protein, Doublecortin cause dysfunctional neuronal connectivity that lead to a large spectrum of neurological and psychiatric illness including schizophrenia, bipolar disorders, lissencephaly, double cortex syndrome or microcephaly (Bradshaw and Porteous, 2012; Friedman et al., 2010; Guizetti et al., 2011; Jaglin and Chelly, 2009; Kuijpers and Hoogenraad, 2011). In accordance with the involvement of MAPs in brain disorders, mice deleted for the microtubule-associated proteins 6 (MAP6-KO) display severe behavioral disorders including locomotor hyperactivity, severe social withdrawal, defective sensorimotor gating (Pre Pulse Inhibition) and cognitive deficits (Andrieux et al., 2002; Begou et al., 2008; Vincent Fournet et al., 2012; Fradley et al., 2005; Powell et al., 2007; Volle et al., 2013). They also exhibit abnormalities of glutamatergic, dopaminergic, acetylcholinergic/nicotinic, serotonergic and noradrenergic neurotransmissions, deficits of neuronal and synaptic plasticity and sensorimotor gating impairment (Andrieux et al., 2002; Bouvrais-Veret et al., 2007; Brenner et al., 2007; Brun et al., 2005; Fournet et al., 2010; Fradley et al., 2005). Altogether these impairments recapitulate some of the clinical features observed in psychiatric diseases including schizophrenia. Interestingly some behavioral and biological defects of MAP6-KO have been shown to be partially alleviated by chronic treatment with neuroleptics or antidepressants (Andrieux et al., 2002; Begou et al., 2008; Delotterie et al., 2010; V Fournet et al., 2012).

Small animal connectivity mapping techniques are particularly relevant for identifying aberrant connectivity in disease models. DTI tractography has been used to characterize mouse models of neuropathology (Kerbler et al., 2012; Ren et al., 2007). However, due to the very small volume of the mouse brain, DTI tractography has been limited by low spatial resolution and low signal-to-noise ratio within a single image voxel. Small animal DTI tractography can be substantially improved through the combination of *ex vivo* MRI with exogenous contrast agents (Gimenez et al., 2016; Jiang and Johnson, 2010), advanced diffusion acquisition and robust reconstruction techniques.

Aside from white matter (WM) imaging by DTI, the full characterization of brain anatomy including structures of grey matter is required for a better comprehension of brain disorders.

The MRI volumetry has high spatial resolution and high contrasts allowing the segmentation of brain structures and their volume measurement. MRI volumetry has been applied to several mouse models to evaluate precisely the volume variations of brain structures (Heikkinen et al., 2012; Manninen et al., 2014).

In a previous study, using Magnetic Resonance Imaging (MRI) approaches, in particular Diffusion Tensor Imaging (DTI), we showed that MAP6-KO mice exhibit a reduction in whole brain volume associated with the lack of the post-commissural fornix (Deloulme et al., 2015). This 2D DTI study has also shown that the overall loss of white matter (WM) in MAP6-KO brains was not uniformly distributed among the neural tracts suggesting a disparity of the neuronal connectivity defects. Here, to obtain a comprehensive view of MAP6-KO brain anatomy we developed several neuro-imaging techniques. High spatial resolution 3D DTI acquisition was specifically developed and used for WM tract visualization and quantification. In addition, 3D MRI volumetry, histology, surface analysis of macroscopic images of the brains and fluorescent microscopy on cleared brains were also performed.

Altogether, our results indicate that MAP6 deletion induced a specific decrease in the volumes of some specific tracts; the fornix and the corticospinal tracts being the most severely affected. Moreover our study reveals a new structural organization of MAP6-KO brain as compared to WT brain with a re-orientation of some neuronal tracts.

MATERIAL & METHODS

Mice

For MRI experiments, C57Bl6/129 SvPas-F1 genetic background mice were used. The homogeneous inbred C57BL6/129SvPas-F1 mice were obtained by crossing pure heterozygote 129SvPas MAP6 mice with pure heterozygote C57BL6 MAP6 mice. For histology and cleared brains, C57Bl6/129 SvPas Thy1-eYFP-H F1 mice were obtained by the crossing of heterozygote C57BL6 Thy1-eYFP-H MAP6 mice with heterozygote 129SvPas MAP6 mice. All experiments were conducted on female wild type (WT) and MAP6-KO littermate mice at 3–6 months of age, in compliance with the European Community Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) (permit number 381256 for JCD; Agreement of ethics committee n°004 accredited).

MRI Brain preparation

The brains were fixed by transcardiac perfusion of a 4% paraformaldehyde solution in phosphate buffered saline containing 6.25 mM of Gd-DOTA (Guerbet Laboratories), a paramagnetic MRI contrast agent. After removing surrounding skin and muscles, the skulls containing the intact brains were immersed in the same solution during four days and then conserved in Fomblin-oil (FenS chemicals) for MRI acquisitions performed at least eleven days after fixation. Gd-DOTA was used to reduce the longitudinal relaxation time T_1 in order to accelerate MRI and DTI acquisitions without a loss of the MRI sensitivity. This protocol timing was defined in a preliminary experiment in which we studied the necessary time for a homogeneous distribution of the Gd-DOTA through the whole brain (Gimenez et al., 2016).

3D high spatial resolution volumetry

MRI was performed at 9.4T Bruker Biospec Avance III using homogenous coil for transmission and a head surface coil for reception (Grenoble MRI facility IRMaGE). High spatial resolution 3D echo gradient imaging with high contrast was used for main cerebral regions segmentation and volumetry analysis.

Repetition time and echo time were set to $TR = 27.5$ and $TE = 5.5$ ms. Isotropic spatial resolution of $60 \mu\text{m}^3$ was obtained in a field of view of $10.8 \times 7.44 \times 15.24 \text{ mm}^3$. The number of accumulations NA was equal to 6, and the total acquisition lasted 1h40min / brain. MRI volumetry was performed on fixed brains of WT (n=5) and MAP6-KO (n=6) mice.

3D DTI of fixed-brain

Microscopic 3D DTI was performed at 7T Bruker Biospec Avance III using homogenous coil for transmission and a head surface coil for reception (Grenoble MRI facility IRMaGE). 3D spin-echo DTI sequence with Cartesian K-space sampling was performed on fixed brains of WT (n=4) and MAP6-KO (n=4) mice. This sequence was preferred to the rapid EPI sequence to reach high isotropic spatial resolution of $80 \times 80 \times 80 \mu\text{m}^3$ without geometrical distortions and susceptibility artifacts in a field of view of $20.48 \times 8.5 \times 11.5 \text{ mm}^3$. The repetition time and the echo time were set to $\text{TR} = 90 \text{ ms}$ and $\text{TE} = 16\text{ms}$. The number of accumulation was set to $\text{NA} = 22$. Diffusion gradients with durations of $\Delta = 3.5 \text{ ms}$ and separation duration $\delta = 8 \text{ ms}$, were applied in 6 different orientations [1,1,0]; [0,1,1]; [1,0,1]; [1,-1,0]; [0,1,-1]; [-1,0,1] with a gradient factor (b-value) of 1500 s/mm^2 . The reference image was acquired with a low b-value of 50 s/mm^2 . The total duration scan of the microscopic 3D DTI was 59h.

Histology

WT and MAP6-KO brains from C57BL6/129SvPas/Thy1-eYFP-H or C57BL6/129SvPas mice were fixed by transcardiac perfusion of a 4% PFA solution as described previously (Deloulme et al., 2004). Brains were extracted and stored in the same fixative solution at 4°C . Brains were sliced at $35 \mu\text{m}$ using cryo-microtome (Microm, H560S) and mounted on Superfrost plus slides (Menzel-Gläser). For immunofluorescence experiments, coronal sections and transversal sections were observed with confocal microscope (Zeiss, LSM 710). To analyze the pyramidal tract, coronal sections were stained using the gold method of Schmued (Schmued, 1990). Section was digitized (stereo microscope EZ4 HD, Leica Biosystem, Nanterre, France) and pyramidal tract area measured using the Fiji software (Schindelin et al., 2012).

To analyze inter-hemispheric commissures, fixed brains were trimmed to a standard configuration as described (Wahlsten and Schalomon, 1994) and weighted after 6 days in 4% PFA. Brains were bisected at the midsagittal plane and then both middle-hemispheres were stained *en bloc* using the gold method of Schmued (Schmued, 1990). Each middle-hemisphere was digitized (stereo microscope EZ4 HD, Leica Biosystem, Nanterre, France) and commissural area measured using the Fiji software.

All the neuroanatomical abbreviations used in this study were from Paxinos (George Paxinos, 2008) except for pre-f, precommissural fornix; post-f, postcommissural fornix, AH, anterior hypothalamic; SPT, septum; HF, hippocampal formation; CX, cortex; CB, cerebellum; MB, mammillary bodies; OB, olfactory bulb; TH, thalamus, CC, colliculi; IC, inferior colliculus; SC, posterior colliculus; CU, culmen.

Whole-brain clearing method

To analyze the fornix system, WT (n=2) and MAP6-KO (n=2) fixed brains from C57BL/6/129SvPas/Thy1-eYFP mice were bisected at the midsagittal plane and then both middle-hemispheres were cleared using the CUBIC method (Susaki et al., 2014). Each middle-hemisphere was incubated in Cubic1 reagent containing 25% urea, 25% N,N,N',N'-tetrakis (2-hydroxypropyl) ethylenediamine and 15% Triton X-100 for 10 days at 37°C under gently agitation. Acquisition of the full half-fornix was performed with confocal microscope (Zeiss, LSM 710) using x10 objective. The full half-fornix was reconstructed using Fiji 3D stitching plugin (http://fiji.sc/Stitching_2D/3D).

DATA PROCESSING

Surface & Volumetry

Surfaces of some cerebral structures were manually delineated on macroscopic images of the WT (n = 6) and MAP6-KO (n = 7) fixed brains, photographed in dorsal views. Surfaces were obtained from the software ImageJ.

Volumes of some cerebral structures were delineated manually on the high spatial resolution 3D MR images. For each structure, the regions of interest (ROI) were drawn on coronal orientation, every five slices. The Segmentation editor plugin (http://fiji.sc/Segmentation_Editor) builds the whole volume by interpolation between ROI. At the end, the ROI were corrected slice by slice based on brain mouse atlas (George Paxinos, 2008). This method was applied for the whole brain of each mouse for the following structures: the cortex (CX), the hippocampal formation (HF), the caudate putamen (CPU), the cerebellum (CB), the globus pallidus (GP), the hypothalamus (HP), the thalamus (TH) and the olfactory bulb (OB). Each structure was color-encoded, and its 3D representation and its volume were obtained using Fiji software.

DTI tractography

The 3D high spatial resolution diffusion data were analyzed with MedInria software (<http://med.inria.fr/>). For each acquisition, the diffusion tensors were computed, and the eigenvalues ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$) and their corresponding eigenvectors (V_1, V_2, V_3) were obtained. The principal eigenvector V_1 corresponds to the maximum of eigenvalues λ_1 . The fractional anisotropy (FA) was calculated according to:

$$FA = \sqrt{\frac{3}{2}} \sqrt{\frac{(\lambda_1 - MD)^2 + (\lambda_2 - MD)^2 + (\lambda_3 - MD)^2}{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}}$$

With MD the mean diffusivity given by:

$$MD = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3}$$

The 3D tractography of WM fibers was computed with the Tensor Tool Kit after a background noise suppression using the following parameters: initial value of $FA_1=0.4$, and a cutoff value of $FA_2=0.28$. WM structures were selected by drawing restricting ROI.

Fibers were represented with a directional-color code: blue for the lateral direction, green for the dorso-ventral direction and red for the anterior-posterior direction. Fiber statistics were also obtained from MedInria software.

MRI and optical data correlation

The 3D reconstructions of the fornices were obtained from the high spatial resolution 3D DTI tractography and from microscopy on cleared brains. For accurate comparison of these two 3D imaging modalities, images were set to the same spatial resolution and registered using rigid transformations with Nyfti Reg software (<http://sourceforge.net/projects/niftyreg/>).

Due to the brain swelling during clearance, brain volume correction was performed using a coefficient of 0.85, which was found to be the more appropriate for brain volume compensation. It was chosen on the criteria of mutual information (data not shown).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R software (<https://www.r-project.org/>), p values were obtained from the Welch's t and data were represented as means \pm SEM (standard error of means). Values were considered significant when * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$.

RESULTS

MAP6 deletion affects brain anatomy

MAP6-KO mouse brain was first described as grossly normal (Andrieux et al., 2002) but subsequent findings indicated some anatomical anomalies (Deloulme et al., 2015; Powell et al., 2007). We performed a comprehensive analysis of the macroscopic aspect of MAP6-KO brain using several techniques.

At first, we used stereo-microcopy to analyse MAP6-KO brain as compared to WT brain. Figure 1A represents dorsal macroscopic views of WT and MAP6-KO brains surface where important disparities can be observed. MAP6-KO whole brain surface was significantly decreased by 8.40% (Figure 1B, $p < 0.001$), with a reduction of the cerebellum (Figure 1B, CB, -17.20%, $p < 0.001$), the cortex (Figure 1B, CX, -6.20%, $p < 0.001$) and a drastic surface decrease of the culmen (Figure 1B, CU, -52.90%, $p < 0.001$); but, the most striking variation was the large increase of the superior and inferior colliculi surface (Figure 1B, SC and IC, +47% and +38.6%, $p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively).

We then performed brain volume analysis using segmentation of the main cerebral regions by high spatial resolution 3D MRI (Figure 1C). Volumetric quantifications are given in Figure 1D. Firstly, the whole brain volume is decreased by 15.6% ($p = 3.1 \cdot 10^{-4}$) in accordance with previous results (Deloulme et al., 2015). The volumes of the cerebral structures are differently affected with a severe volume reduction for the cerebellum (CB, up to 31%, $p = 5 \cdot 10^{-7}$) and the thalamus (TH, up to 30 %, $p = 1.3 \cdot 10^{-6}$), whereas other structures are less affected such as the cortex (CX, up to 11%, $p = 2.0 \cdot 10^{-3}$), the striatum (CPU, up to 14%, $p = 3.5 \cdot 10^{-3}$), the hypothalamus (HP, up to 18%, $p = 2.1 \cdot 10^{-5}$) and the olfactory bulbs (OB, up to 13%, $p = 1.3 \cdot 10^{-4}$) or unaffected such as the hippocampal formation and the globus pallidus (GP and HF, $p = 0.45$ and $p = 0.15$ respectively). Regarding the colliculi (including the superior and the inferior colliculi), we observe a major difference between their volumes showing a small reduction in MAP6-KO mice (CC, up to 8%, $p = 0.014$) versus their surfaces showing a strong apparent enlargement (figure 1A). This difference is probably the result of the combined reduction of the cerebellum and cortex, thereby uncovering the colliculi and changing their external surface appearance (figure 1A).

MAP6 deletion affects callosal and anterior commissures but not the hippocampal commissure

To analyze possible relationships between the brain size and neuronal tract size, we analyze by histology the surface of inter-hemispheric commissures such as the corpus callosum (cc)

and the anterior commissure (ac) and the ventral hippocampal commissure (vhc) in relation with the size of whole brain (Figure 2). In normal adult mice, the relationship between commissure surface and brain size is nearly linear (Bishop and Wahlsten, 1999). The surface of the corpus callosum, the ventral hippocampal commissure and the anterior commissure could be express as a combination of their intrinsic variations and a correcting index computed from the mouse's brain weight differences using a linear regression equation on data of a large sample of mice with no commissure defects (Livy et al., 1997). The mean of brain weight and commissural area before and after index correction are presented in figure 2D. In accordance with whole cerebral volume reduction, the brain weight was reduced by 17% ($p = 5.0 \cdot 10^{-5}$) and the corpus callosum, the ventral hippocampal commissure and the anterior commissure area are reduced by -26% ($p = 2.10^{-6}$), -11% ($p = 0.007$) and -32% ($p = 5.10^{-5}$), respectively (figure 2D). Commissure index that takes into account the linear regression of brain size shows the persistence of reduction of the anterior commissure (-16%, $p = 9 \cdot 10^{-4}$) and, to a lesser extent, the reduction of the corpus callosum (-9%, $p = 0,006$). However, the MAP6 deletion did not impact on the ventral hippocampal commissure size (+1%, $p = 0.82$) in accordance with the unchanged volume observed for the hippocampal formation (Fig 1D, HF). Thus from these data we conclude that the corpus callosum and the anterior commissure ac size reduction does not come from a global reduction of the size of the whole brain. They also revealed heterogeneous alterations neuronal tracts.

Development of 3D DTI tractography

We then developed 3D-DTI tractography in order to obtain a full characterization of neuronal tracts in MAP6-KO mice. Neuronal tracts reconstruction from 3D-DTI images allowed us to visualize and quantified almost major neuronal tracts. At first we validate our DTI tractography by analysing the fornix tract defined from 3D-DTI reconstruction images with the 3D image obtained from fluorescence microscopy acquisition on Thy-eYFP-H cleared brains, where the full fornix is visible (Porrero et al., 2010). The fornix tract was preferentially used since in our previous work, we found that MAP6 is required for the development of the post-commissural fornix (Deloulme et al., 2015). This neuronal tract is the major output of the subiculum belonging to the hippocampal formation (Figure 3A). The fornix divides into two major efferent tracts: the pre-commissural fornix (pre-f) which is rostral to the anterior commissure (ac) and projects into septal regions (SPT); the post-commissural fornix (post-f) which passes behind the anterior commissure, innervates the anterior hypothalamus (AH) and terminates at the posterior hypothalamus in the mammillary

body (MB) (Ishizuka, 2001; Kishi et al., 2000; Namura et al., 1993; Swanson and Cowan, 1977; Wright et al., 2010). Figure 3B and 3C compare tractography reconstruction of the fornix system using high spatial resolution DTI acquisitions and fluorescence microscopy of cleared brains. Confocal acquisition of cleared middle-hemispheres of both WT and MAP6-KO are shown in Figure 3B; the terminal part of the post-commissural fornix being truncated in MAP6-KO (arrowhead in figure 3B). In figure 3C, DTI tractography of fornices of both WT and MAP6-KO mice are found similar to those obtained by microscopy (arrowhead in figure 3C). Thus, the fluorescence microscopy on cleared brain validates the accuracy of our 3D-DTI tractography imaging of mouse brain.

To superpose the images obtained by DTI and fluorescence imaging (Figure 1D) we had to reduce the fluorescence image by a factor of 0.85 to counter balance the swelling occurring during the clearing process. After this correction, superposition of images of the fornices obtained by these two techniques show a very strong correlation for WT as well as MAP6-KO mice.

DTI tractography reveals heterogeneous alterations of neuronal tracts

We then reconstructed the whole brain tractography from pictures obtained with a high spatial resolution of ($80\ \mu\text{m} \times 80\ \mu\text{m} \times 80\ \mu\text{m}$), allowing analysis of individual neural tracts. Figure 4 summarizes WM volume for different brain structures.

In accordance with 2D DTI data (Deloulme et al., 2015), the total WM volume, derived from the whole brain DTI tractography, was reduced by 33.7% ($p = 7.7 \cdot 10^{-4}$) in MAP6-KO mice compared to WT mice (Figure 4A). The volume of the mammillary tract (mt, $p = 0.008$), anterior commissures (ac, $p = 5.9 \cdot 10^{-5}$), the stria medularis (sm, $p = 1.5 \cdot 10^{-5}$) and the corpus callosum (cc, $p = 1.9 \cdot 10^{-5}$) were severely reduced whereas the stria terminalis (st, $p = 0.08$) and the fasciculus retroflexus (fr, $p = 0.08$) were almost normal. The volume reductions of the internal capsule (ic, $p = 1.5 \cdot 10^{-5}$), the optical tract (opt, $p = 2.3 \cdot 10^{-4}$), the fornix (fx, $p = 6.7 \cdot 10^{-4}$), the intrabulbar anterior commissure (aci, $p = 0.03$), the cerebral peduncle (cp, $p = 5.8 \cdot 10^{-5}$) were found significantly reduced in the same range as that of the whole brain. Representative reconstructions of each neuronal tract are shown in figure 4B and supplemental Figure 1. A closer examination of some tracts reveals specific alteration of some tracts. In accordance with commissural area investigation (Figure 2), the anterior commissure appears much thinner in MAP6-KO than in WT mice (Figure 4B, ac, arrowheads). The fasciculus retroflexus showed a significant reduction in the length of its rectilinear portion (26%, $p = 8.3 \cdot 10^{-5}$, Figure 4B, fr, arrowheads) but also a shift in its dorso-ventral position in MAP6-KO mice. Indeed,

the angle of the fasciculus retroflexus decreased significantly in MAP6-KO mice (13° , $p= 1.7 \cdot 10^{-5}$) detected as a color shift in its rectilinear portion from red to orange (Figure 4B, fr, α angle). Similarly, the angle of the mammillary tract was significantly decreased (14%, $p= 4.8 \cdot 10^{-4}$, Figure 4B, mt, arrows). For these specific tracts, results clearly indicated changes of their spatial position.

Finally, the most striking observation is a severe disruption of the pyramidal tract in MAP6-KO mice. Indeed reconstructions of fibers going through the internal capsule and the cerebral peduncle toward the brainstem and forming the pyramidal tract within the brainstem were clearly visible in WT brain (figure 4B, cp and ic) whereas only very few of them were visible in MAP6-KO brain (Figure 4B, ic, cp, arrows).

MAP6 is required for corticospinal tract integrity.

The pyramidal tract belongs to the corticospinal tract mostly composed by the axonal projections of layer V neurons of the motor cortex (see schema Figure 6B). The corticospinal tract projects through the internal capsule and the cerebral peduncle toward the brainstem to end-up in the spinal cord. At the boundary between the medulla and the spinal cord, pyramidal axons tract turns dorsally and crosses the midline, forming the pyramidal decussation.

We then analyzed the cortical projections of the pyramidal tract (Figure 5). ROIs were delineated on the pyramidal tract at brainstem level on coronal slices (Figure 5A, red arrow) and reconstruction of the whole tracks was obtained (visible on coronal and sagittal figure 5A). In WT brains, fibers can be seen until the internal capsule through the cerebral peduncle. In MAP6-KO mice, the pyramidal tract although visible was altered with strong reduction at the level of the cerebral peduncle and internal capsule (white arrows). Interestingly, when combining two ROIs, one delineated on the brainstem and one on the internal capsule (Figure 5B and not shown), the pyramidal tract was still clearly visible on WT brain whereas only few fibers can be seen in MAP6-KO brain. Quantification of the tract volumes using one ROI (brainstem) or the two ROI (brainstem and internal capsule) indicated a strong decrease (Figure 5C) with a reduction of -56%, $p = 1.9 \cdot 10^{-4}$ and -83.1%, $p=5.5 \cdot 10^{-5}$, respectively. These results strongly suggest that corticospinal projections passing through the internal capsule are disrupted in MAP6-KO mice.

We further analyzed the pyramidal tract at the brainstem level. The full pyramidal tract can be visualized in Thy-eYFP-H which expresses eYFP protein mostly in the cortical neurons of layer V allowing epifluorescence imaging of the full pyramidal tract (Figure 6B)(Porrero et

al., 2010). We thus examined the general appearance of the pyramidal tract on sagittal sections of both WT and MAP6-KO mice (n=4 for each genotype). MAP6-KO mice showed a much thinner tract than WT mice (case of F119, F20 in Figure 6A and not shown) or a dramatic reduction of the pyramidal tract restrained to a few scarce projections (case of F21 in Figure 6A indicated by arrow heads). We also assayed the pyramidal tract diameter and observed a reduction of its size of about 45% in MAP6-KO mice (Figure 6C and D). Confocal examination of coronal sections shows disorganization of the tract in MAP6-KO mice; many axons splitting abnormally from the pyramidal pathway probably reflecting a defasciculation (observed on 3/4 MAP6-KO mice and 0/4 for WT mice, Figure 6D, arrows).

DISCUSSION

For the first time, the anatomy of the MAP6-KO mice brain is characterized precisely. For this purpose, MRI multimodal approaches were developed and used and results were validated and/or completed by histology and cleared brain microscopy analysis.

Heterogeneous alterations of WM tracts and brain structure volumes were robustly demonstrated. The post-commissural fornix disruption, the reduction of corpus callosum, the anterior commissures and cerebral structures such as the thalamus and the cortex were confirmed in accordance to our previous work (Deloulme et al., 2015; Powell et al., 2007). Using 3D DTI tractography and 3D microscopic MRI, we describe new major alterations, as a mammillary tract hypoplasia, a strong volume reduction of the stria terminalis, the corticospinal tracts and the cerebellum. These altered structures may become of interest for a better understanding of the functions of MAP6 in development and maintenance of the neuronal connectivity.

MR neuroimaging as powerful tools to investigate neuro-anatomical defects in psychiatric mouse models

Due to the very small volume of the mouse brain, DTI tractography remains challenging since high spatial resolution is required. DTI acquisitions were performed *ex vivo* on fixed brains containing exogenous contrast agent, used here to speed up the scanning process, to reach 3D high spatial resolution ($80 \mu\text{m}^3$) with a high signal to noise ratio (SNR = 104), avoiding geometric artifacts. HARDI (High Angular Resolution Diffusion Imaging) acquisitions, with a better sampling of the diffusion sphere that can resolve crossing fibers (Behrens et al., 2007), was considered but not employed in this study. In a preliminary study (data not shown), HARDI acquisitions, DTI and WM reconstructions were found comparable for WT mice as well as for MAP6-KO mice. In fact, as it was already mentioned (Behrens et al., 2007), HARDI which requires longer scan time is relevant for complex tissues with crossing tracts only. This is not the case of our study essentially focused on main WM structures having simple geometries. Thus, using DTI with 6 diffusion magnetic gradient directions was appropriate, successfully leading to the reconstruction of the tracts as validated by histology and by fluorescent microscopy of cleared brains. Choosing 6 diffusion gradients directions, 3D DTI with high spatial resolution and high signal to noise ratio was possible.

In this study, the 3D tractography demonstrates its capacity to visualize in one single acquisition the whole mouse brain WM structures and to detect their abnormalities. The method has a great potential, not only to detect major defects in brain connections, but also to

quantify tract volumes and detect connectivity changes. Combined to MRI volumetry, we have an imaging tool able to cover the main anatomical abnormalities of psychiatric mouse models. This technique is direct and extensive compared to existing techniques such as histology. The global view of neuroanatomical defects given by MRI guides the experimenter to target specific regions of interest for histological investigations; here it allowed us to highlight corticospinal projections defects.

DTI tractography and cleared brain methods matched together revealing the absence of the post-commissural fornix in MAP6-KO mice.

Tractography reconstructions using 3D-DTI were validated by fluorescence microscopy of cleared brain by comparing the reconstruction of the fornix system. This WM structure was preferentially used for two major reasons. Firstly, knowing that the post-commissural fornix is disrupted in MAP6-KO mice (Deloulme et al., 2015), it is used here as a criteria for the validation of both methods. Secondly, the fluorescent protein YFP is expressed in the hippocampal formation in our transgenic mouse strain, allowing the fornix visualization by fluorescence microscopy. In accordance with our previous results (Deloulme et al., 2015), both methods show a disruption of the post-commissural fornix occurring just after the anterior commissure.

Heterogeneous effects of MAP6 deletion in the brain anatomy

First macroscopic observations showed that the MAP6 deletion impacted the general appearance of the whole brain. 3D volumetry of brain structures was performed on anatomical high-resolution 3D MRI acquisitions. These results draw a complete phenotypical statement of the integrity of brain structures in MAP6-KO mice, exhibiting altered structures such as thalamus, cerebellum and cerebral cortex and unchanged structures such as the hippocampal formation or colliculi. It is noteworthy that despite the small number of animals analyzed (n = 4 to 6), the S.E.M and p values are generally small attesting to a high penetrance of phenotypic changes in MAP6-KO mice. The severe volume decrease of the cerebellum and the thalamus and, in less extend, of the cerebral cortex certainly contributes on the general organization of MAP6-KO whole brain including the increase of colliculi surface and changes observed in spatial positioning of mammillary and retroflexus tracts.

These results suggest a direct relation between anatomical changes and the behavioral and cognitive impairments observed in MAP6-KO mice. A defect in circuitry connecting the thalamus, which plays a key role in information processing, to the cortex and the cerebellum

could explain a wide range of schizophrenic-like symptoms observed in MAP6-KO mice as has been widely documented in schizophrenic patients (Nenadic et al., 2012; Pergola et al., 2015; Rasser et al., 2010; Walther, 2015).

Our results showed that MAP6 deletion affects the cortical volume and cortical commissures while it has no effect on the hippocampal formation volume nor on its commissure. However, these two brain structures express MAP6 during developing and in the adult brain (Couegnas et al., 2007) indicating that MAP6 did not contribute strongly to the establishment of the hippocampal structure and commissure formation. It might indicate that MAP6 is rather involved in the establishment of long range projections such as the post commissural fornix or the corticospinal projection rather than in short range projections. The strong effect of MAP6 deletion on long-range axonal tract formation might arise from the additional contribution of MAP6 in the stabilization of microtubules and in signaling pathways such as semaphorins.

Impairment of corticospinal projections in MAP6-KO mice.

In this study, DTI tractography showed that the axonal projections of the pyramidal tract through a ROI positioned at the internal capsule are strongly diminished in MAP6-KO mice. Similarly, axonal projections of the internal capsule selected from a ROI positioned in pyramidal tracts are almost non-existent in the MAP6-KO mice. This result strongly suggests a disruption of corticospinal projections passing through the internal capsule and pyramidal tract. The corticospinal tract is one the major descending pyramidal tract that connects a subset of layer 5 cortical to motor neurons and interneurons in the spinal cord. This tract controls voluntary body movement and fine motor functions of the limbs. Fradley et al. reported that MAP6-KO mice had motor coordination deficit associated with a poor performance on the rotarod task (Fradley et al., 2005). The disruption of corticospinal tract could explain these motor defects observed in MAP6-KO mice.

The embryonic development of the corticospinal tract is complex and relies upon the coordinated regulation of a collection of molecular guidance cues including the ephrins, slits, netrins and semaphorins (Canty and Murphy, 2008). We recently demonstrated that MAP6 plays a pivotal role downstream of semaphorin 3E-signaling pathway that contributes to the formation of the internal capsule (Chauvet et al., 2007; Deloulme et al., 2015). In the forebrain, axons in descending pathways follow complex trajectories to reach lower brain centers. These include the corticofugal, corticospinal and striatonigral tracts which grow through the internal capsule and cerebral peduncle to innervate distinct targets at the midbrain, brainstem, and spinal cord levels (Chauvet et al., 2007; Ehrman et al., 2013).

Sema3E can act as a bifunctional ligand *in vivo*, depending on the composition of the receptor complex. For subpopulations of corticofugal and striatonigral neurons, Sema3E acts as a repellent while for the subicular neurons whose axonal projections form the post-commissural fornix, acts as an attractant (Chauvet et al., 2007). In Sema3E-KO mice, corticofugal, striatospinal and post-commissural fornix tracts are misguided and defasciculate during development and in adult stages (Chauvet et al., 2007; Ehrman et al., 2013). It will be very interesting to investigate sema3E-dependant function of MAP6 on the corticospinal motor neurons (CSMN) development. Indeed, this cortical neuron subpopulation is located in the cortical layer V that expresses the receptor binding-subunit Plexin D1 of Sema3E (Molyneaux et al., 2007, 2005). The axonal projections of CSMN mainly composed the corticospinal tract that project toward the pyramidal tract. The loss of these projections probably impacts the size of the pyramidal tract in MAP6-KO mice.

CONCLUSION

Thanks to the development of high spatial resolution 3D DTI tractography at microscopic scale we identified major changes in WM tracts and in their volumes within MAP6-KO brains. Overall this tractography analysis indicates connectivity defects in MAP6-KO brain which most probably underline cognitive defects exhibited by the mutant mice. The study also very clearly identified a severe defect of the pyramidal tract. This track is mostly composed by the axonal projections of layer V neurons of the motor cortex which navigates to through the internal capsule and the cerebral peduncle toward the brainstem to end-up in the spinal cord. This finding reveals the possible contribution of MAP6 in the control motor functions and in depth analysis of MAP6-KO motors abilities will be of major interest.

Figures

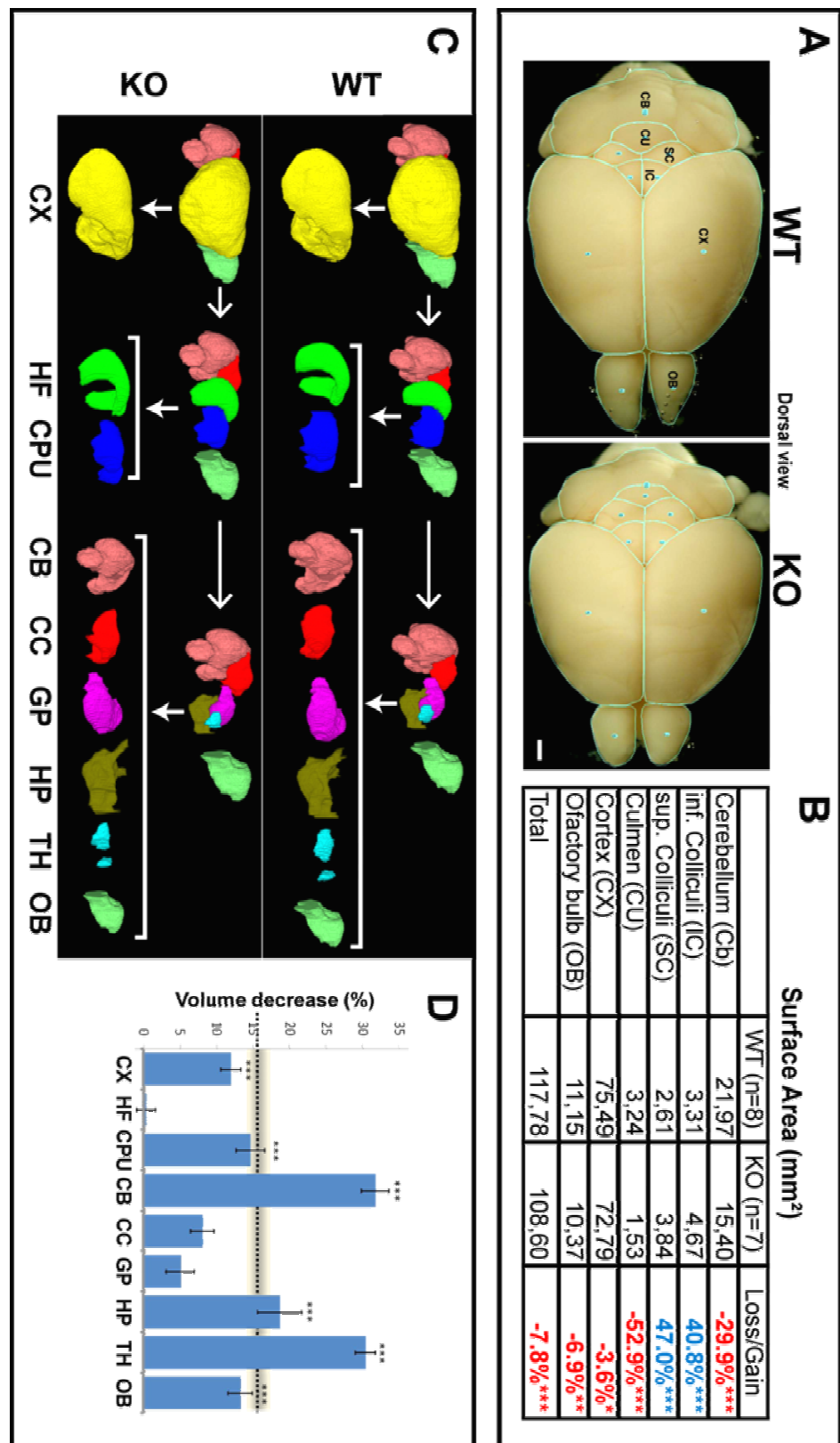


Figure 1: Morphological macroscopic defects associated with MAP6 deletion. (A) Fixed brains were photographed on dorsal views. Each structure was manually delimited in blue. (B)

Table shows the gain or the loss in % of brain surface structures. In MAP6-KO mice, the global surface of the brain was decreased. Inferior and superior colliculi (IC and SC respectively) surface is significantly increased while surfaces of the cerebellum (CB), the cortex (CX) and the culmen (CU) were significantly decreased. $n= 8$ WT; $n= 7$ KO; the value are the mean \pm SEM (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$). Scale bar: 1 mm. (C) High resolution MRI revealed heterogeneous volumetric alterations of the cerebral structures in MAP6-KO mice. 3D reconstructions were obtained from high resolution MRI acquisitions ($60 \mu\text{m}^3$), and each structure was represented with a specific a color. (D) Histogram shows the volume of each reconstructed tract of WT and KO. Variations between WT and KO are indicated in %. The global brain volume decrease (grey bar/dotted black line) is displayed. The cerebellum (CB), the thalamus (TH) and the hypothalamus (HP) are more affected than the whole brain, the cortex (CX), the caudate putamen (CPU) and the Olfactory Bulb (OB) exhibit a significant volume decrease, the colliculi (CC) and the globus pallidus (GP) volume decrease were lower, and the hippocampal formation (HF) volume remains constant despite the overall decline. $n= 5$ WT; $n= 5$ KO; the value are the mean \pm SEM (*** $p<0.001$).

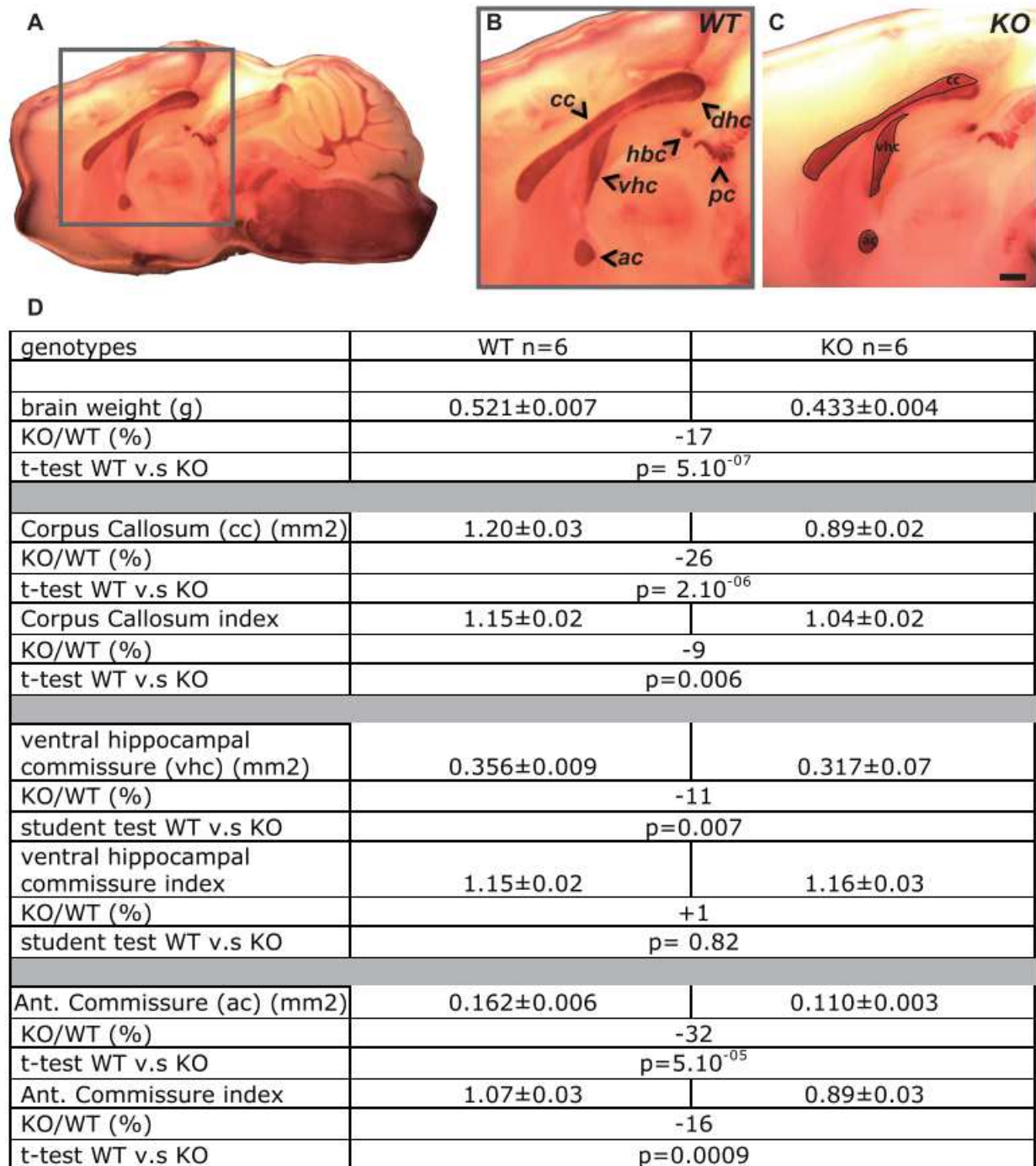


Figure 2: MAP6 deletion affects callosal and anterior commissures but not the hippocampal commissure. (A) Gold staining was performed on midsagittal brain. (B) Interhemispherical commissures were indicated in WT midsagittal brain. (C) ROI delineations for the corpus callosum (cc), the anterior commissure (ac) and the ventral hippocampal commissure (vhc) were indicated on MAP6-KO midsagittal brain. (D) Table indicating the brain weight, the surface and the calculated index for each commissure. The anterior commissure and the corpus callosum (cc) were found largely decreased in MAP6-KO mice before and after specific correction due to relative brain sizes/weight differences. Conversely, the slight

decrease observed for ventral hippocampal commissure was due to brain size variations. Thus, after correction, the ventral hippocampal commissure shows similar size in both WT and MAP6-KO mice. Equations used to obtain expected commissure areas from brain weight decreases (BR) were as follows. Adult mice, 50 days old: $E(cc) = -0.1 + 2.2BR$; $E(vhc) = 0.1 + 0.4BR$; $E(ac) = -0.02 + 0.33BR$. E= index; n= 5 WT; n= 5 KO; the value are the mean \pm SEM.; cc = corpus callosum; vhc = ventral hippocampal commissure; ac = anterior commissure; dhc = dorsal hippocampal commissure; pc = posterior commissure; hbc = habenular commissure.

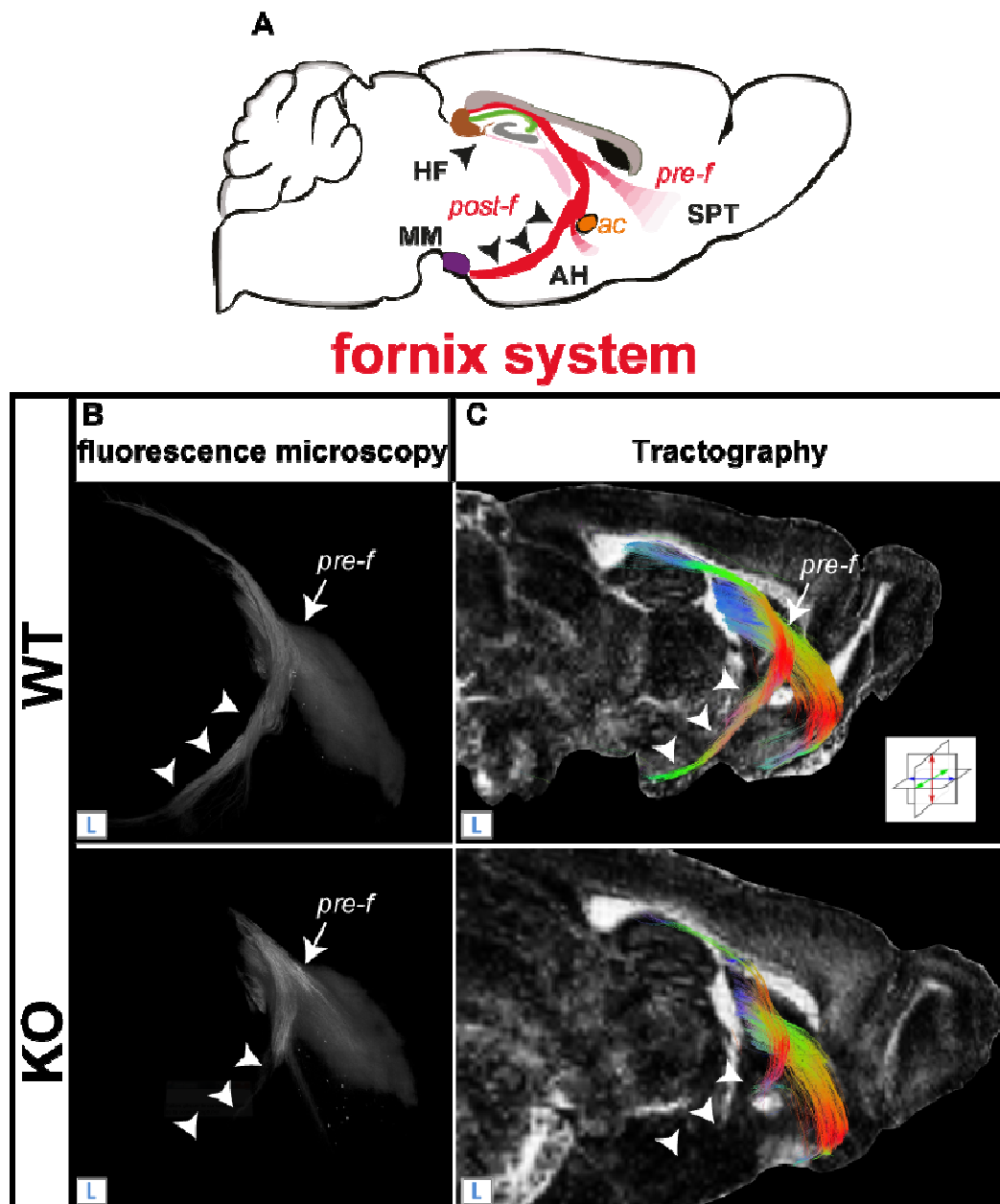


Figure 3: Comparison of fornix system reconstructions using cleared brain method and DTI-tractography. (A) Schematic representation of the fornix system (in red) on a sagittal diagram. (B) The 3D reconstructions obtained by fluorescent microscopy on cleared brains show a disruption of the post-commissural fornix in MAP6-KO mice (arrowheads) and of the pre-commissural projections toward the septal region (arrow) (C). The DTI-tractography reconstruction displayed on sagittal FA map shows the absence of the post-commissural fornix in MAP6-KO mice (arrowheads). HF: hippocampal formation; MM: mammillary fornix; AH: anterior hypothalamus; SPT: septum; pre-f: pre-commissural fornix; post-f: post-commissural fornix and ac: anterior commissures.

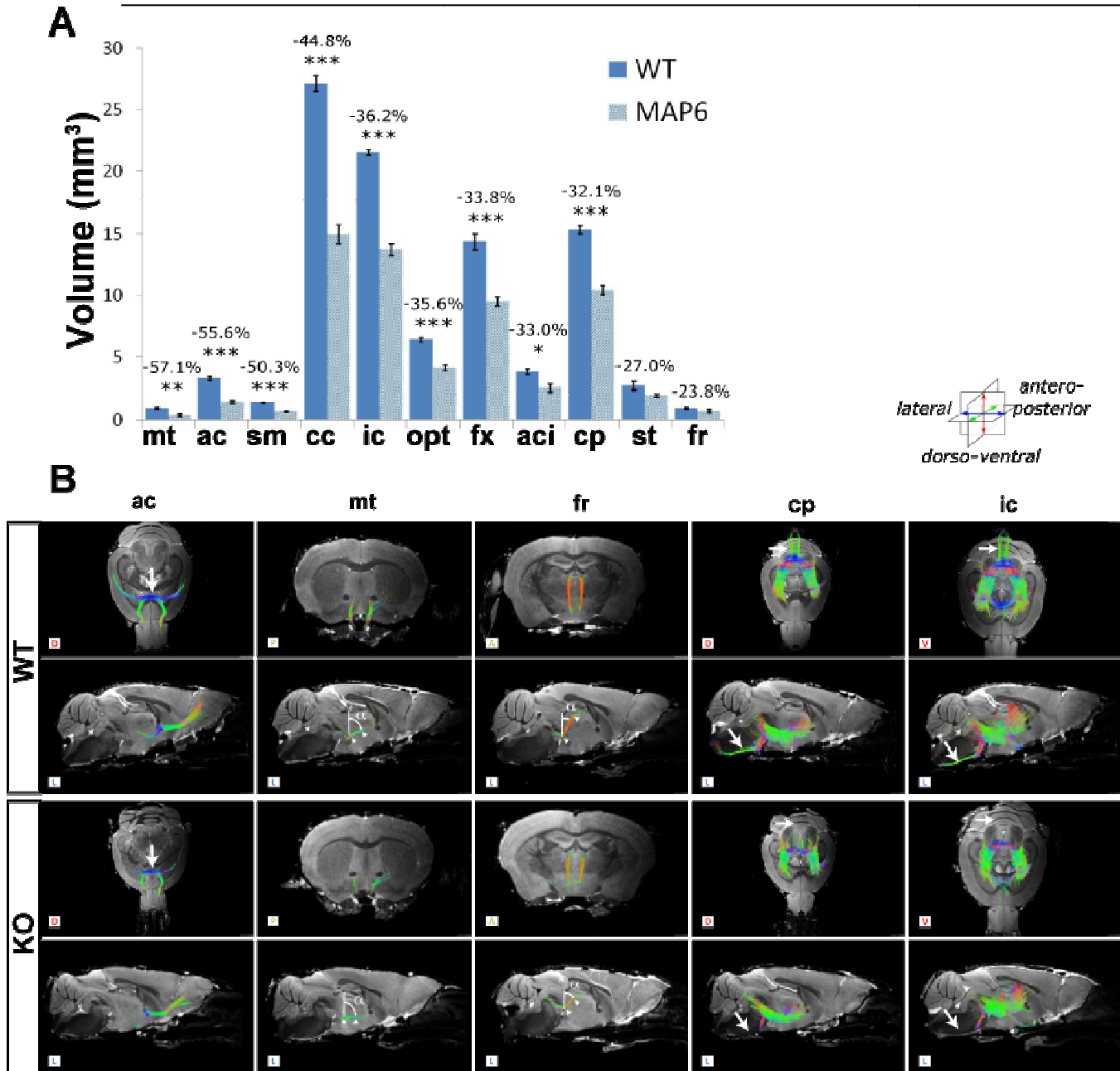


Figure 4: DTI tractography reveals an inhomogeneous alteration of neuronal tracts in MAP6-KO mice. (A) Neuronal tract volume of WT and MAP-KO mice. Percentages of reduction in MAP-KO mice are indicated. (B) Tractography reconstructions performed on 3D high spatial resolution DTI acquisitions ($80 \mu\text{m}^3$) were displayed on coronal, sagittal or axial orientations. The mammillary tract (mt), the anterior commissure (ac), the corpus callosum (cc), the internal capsule (ic), the cerebral peduncle (cp), and the fasciculus retroflexus (fr) were shown for representative WT and MAP6-KO mice. The ac is thinner in KO than in WT (arrows). The mt and the fr exhibit structural modifications. Arrowheads indicate their straight parts and inclination angle (α) are showed. The pyramidal projections of the ic and the cp are dramatically affected in KO mice (arrows, see figure 5 for more details). The color code of

fibers spatial direction is indicated with medial-lateral (blue), dorso-ventral (red) and antero-posterior (green). Squares with the letter L (lateral), D (dorsal), V (ventral), P (posterior) and A (anterior) indicate the view position on the display screen. n= 4 WT; n= 4 KO; the value are the mean \pm SEM (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

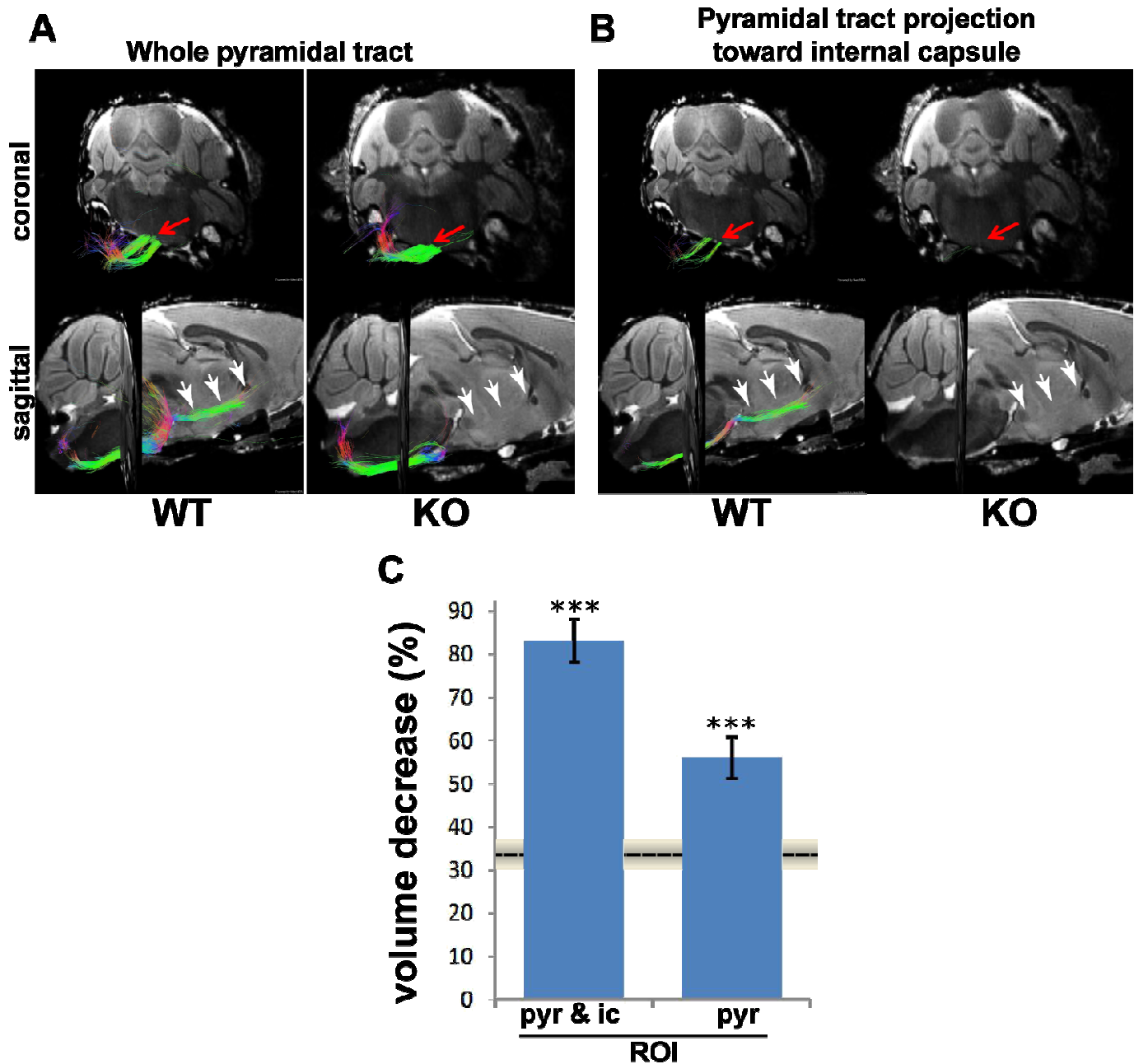


Figure 5: Tractography reconstructions of the pyramidal tract and its projection on the internal capsule. (A) The whole pyramidal tract was obtained with ROI selection defined on coronal slice (red arrow). The pyramidal tract shows a general decrease in MAP6-KO mice, with altered projections toward the internal capsule (white arrow). (B) The specific projections of the pyramidal tract toward the internal capsule were obtained by combining pyramidal tract ROI (red arrow) and a ROI delineating the internal capsule (not shown). In the case of MAP6-KO mice, the pyramidal tract was severely altered (white arrow). (C) Quantification of the volume of the pyramidal tract. $n = 4$ WT; $n = 4$ KO; the values are the mean \pm SEM *** $p < 0.001$; pyr: pyramidal tract; pyr & ic=pyramidal projection on internal capsule.

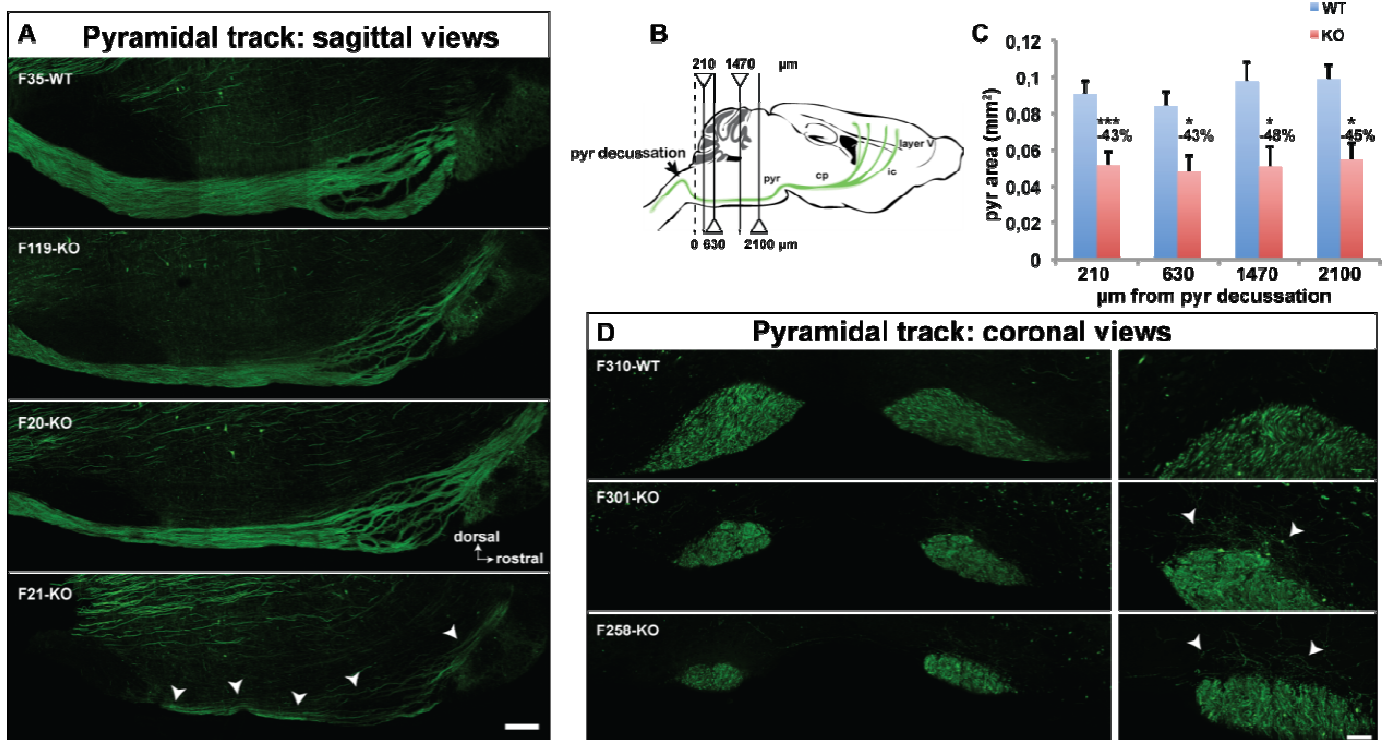
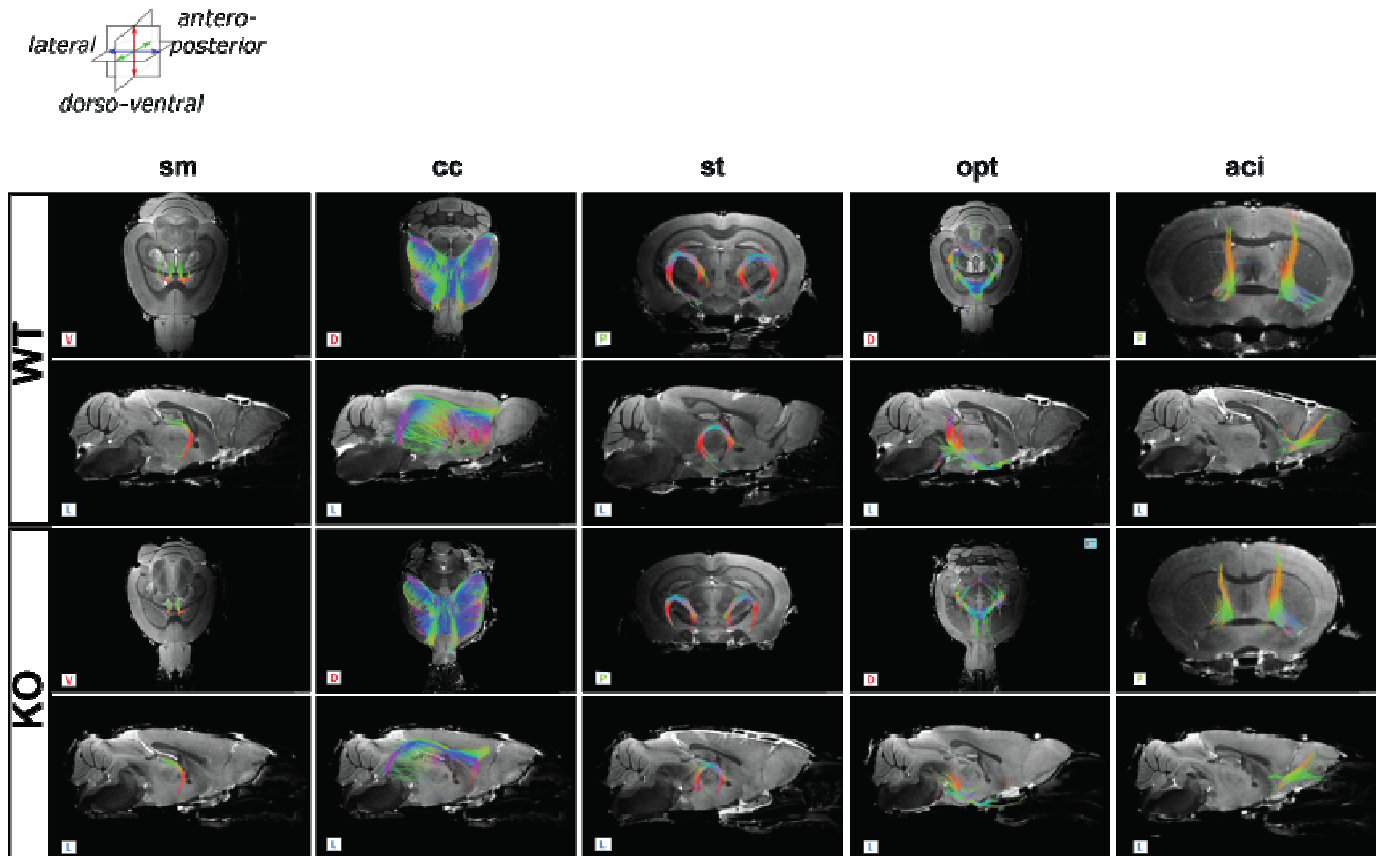


Figure 6: MAP6 deletion affects the pyramidal tract integrity. (A) Sagittal view of the pyramidal tract within the brainstem in wild type mouse (F35) and 3 different MAP6-KO mice (F119, F20 and F21). The pyramidal tract was much thinner in the posterior part of MAP6-KO mice (F119 and F20) and almost nonexistent in F21, only few projections were seen (arrowheads). (B) Schematic representation of the corticospinal pathway (in green) on a sagittal diagram. The four planes used to quantify the area of pyramidal tract (210, 630, 1470 and 2100 μm from decussation) are indicated. (C) Histogram of pyramidal area quantification in WT and MAP6-KO mice. (D) Coronal views of pyramidal tract at 210 μm from the decussation showing the reduction of the tract with axonal dispersion in two MAP6-KO mice (F301 and F258). Note that the pyramidal tract of F258 is strongly reduced. n= 4 WT; n= 4 KO; the value are the mean ± SEM (*p<0.05;***p<0.001) Scale bar: 400μm, ic: internal capsule; cp: cerebral peduncle; pyr: pyramidal tract.



Supplemental Figure 1: Tractography reconstructions of neuronal tracts. Tractography reconstructions performed on 3D high spatial resolution DTI acquisitions ($80 \mu\text{m}^3$) were displayed on coronal, sagittal or axial orientations. The stria medularis (sm), the corpus callosum (cc), the stria terminalis (st), the optical tract (opt) and the intrabulbar anterior commissure (aci) and were shown for representative WT and MAP6-KO mice. A general decrease of WM tracts can be assessed in MAP6-KO brain (see figure 2A). The color code of fibers spatial direction is the same than in Figure 2B with medial-lateral (blue), dorso-ventral (red) and antero-posterior (green). Squares with the letter L (lateral), D (dorsal), V (ventral), P (posterior) and A (anterior) indicate the view position on the display screen. $n=4$ WT; $n=4$ KO; the value are the mean \pm SEM (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).

REFERENCES

- Andrieux, A., Salin, P.A., Vernet, M., Kujala, P., Baratier, J., Gory-Fauré, S., Bosc, C., Pointu, H., Proietto, D., Schweitzer, A., Denarier, E., Klumperman, J., Job, D., 2002. The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev.* 16, 2350–64. doi:10.1101/gad.223302
- Begou, M., Volle, J., Bertrand, J.B., Brun, P., Job, D., Schweitzer, A., Saoud, M., D'Amato, T., Andrieux, A., Suaud-Chagny, M.F., 2008. The stop null mice model for schizophrenia displays [corrected] cognitive and social deficits partly alleviated by neuroleptics. *Neuroscience* 157, 29–39. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.07.080
- Behrens, T.E.J., Berg, H.J., Jbabdi, S., Rushworth, M.F.S., Woolrich, M.W., 2007. Probabilistic diffusion tractography with multiple fibre orientations: What can we gain? *Neuroimage* 34, 144–55. doi:10.1016/j.neuroimage.2006.09.018
- Bishop, K.M., Wahlsten, D., 1999. Sex and species differences in mouse and rat forebrain commissures depend on the method of adjusting for brain size. *Brain Res.* 815, 358–366. doi:10.1016/S0006-8993(98)01088-9
- Bouvrais-Veret, C., Weiss, S., Andrieux, A., Schweitzer, A., McIntosh, J.M., Job, D., Giros, B., Martres, M.-P., 2007. Sustained increase of alpha7 nicotinic receptors and choline-induced improvement of learning deficit in STOP knock-out mice. *Neuropharmacology* 52, 1691–700. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.03.015
- Bradshaw, N.J., Porteous, D.J., 2012. DISC1-binding proteins in neural development, signalling and schizophrenia. *Neuropharmacology* 62, 1230–1241. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.12.027
- Brenner, E., Sonnewald, U., Schweitzer, A., Andrieux, A., Nehlig, A., 2007. Hypoglutamatergic activity in the STOP knockout mouse: a potential model for chronic untreated schizophrenia. *J. Neurosci. Res.* 85, 3487–3493. doi:10.1002/jnr.21200 [doi]
- Brun, P., Bégou, M., Andrieux, A., Mouly-Badina, L., Clerget, M., Schweitzer, A., Scarna, H., Renaud, B., Job, D., Suaud-Chagny, M.-F., 2005. Dopaminergic transmission in STOP null mice. *J. Neurochem.* 94, 63–73. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03166.x
- Canty, A.J., Murphy, M., 2008. Molecular mechanisms of axon guidance in the developing corticospinal tract. *Prog. Neurobiol.* 85, 214–35. doi:10.1016/j.pneurobio.2008.02.001
- Chauvet, S., Cohen, S., Yoshida, Y., Fekrane, L., Livet, J., Gayet, O., Segu, L., Buhot, M.-C., Jessell, T.M., Henderson, C.E., Mann, F., 2007. Gating of Sema3E/PlexinD1 signaling by neuropilin-1 switches axonal repulsion to attraction during brain development. *Neuron* 56, 807–22. doi:10.1016/j.neuron.2007.10.019
- Couégnas, A., Schweitzer, A., Andrieux, A., Ghandour, M.S., Boehm, N., 2007. Expression pattern of STOP lacZ reporter gene in adult and developing mouse brain. *J Neurosci Res* 85, 1515–1527. doi:10.1002/jnr.21278
- Delotterie, D., Ruiz, G., Brocard, J., Schweitzer, A., Roucard, C., Roche, Y., Suaud-Chagny, M.-F., Bressand, K., Andrieux, A., 2010. Chronic administration of atypical antipsychotics improves behavioral and synaptic defects of STOP null mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 208, 131–41. doi:10.1007/s00213-009-1712-3
- Deloulme, J.-C., Gory-Fauré, S., Mauconduit, F., Chauvet, S., Jonckheere, J., Boulan, B., Mire, E., Xue, J., Jany, M., Maucler, C., Deparis, A. a, Montigon, O., Daoust, A., Barbier, E.L., Bosc, C., Deglon, N., Brocard, J., Denarier, E., Le Brun, I., Pernet-Gallay, K., Vilgrain, I., Robinson, P.J., Lahrech, H., Mann, F., Andrieux, A., 2015. Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. *Nat. Commun.* 6, 7246. doi:10.1038/ncomms8246
- Deloulme, J.C., Raponi, E., Gentil, B.J., Bertacchi, N., Marks, A., Labourdette, G., Baudier, J., 2004. Nuclear expression of S100B in oligodendrocyte progenitor cells correlates

- with differentiation toward the oligodendroglial lineage and modulates oligodendrocytes maturation. *Mol. Cell. Neurosci.* 27, 453–465. doi:10.1016/j.mcn.2004.07.008
- Ehrman, L.A., Mu, X., Waclaw, R.R., Yoshida, Y., Vorhees, C. V., Klein, W.H., Campbell, K., 2013. The LIM homeobox gene *Isl1* is required for the correct development of the striatonigral pathway in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E4026–35. doi:10.1073/pnas.1308275110
- Fournet, V., de Lavilleon, G., Schweitzer, A., Giros, B., Andrieux, A., Martres, M.P., 2012. Both chronic treatments by epothilone D and fluoxetine increase the short-term memory and differentially alter the mood status of STOP/MAP6 KO mice. *J Neurochem* 123, 982–996. doi:Doi 10.1111/Jnc.12027
- Fournet, V., Jany, M., Fabre, V., Chali, F., Orsal, D., Schweitzer, A., Andrieux, A., Messanvi, F., Giros, B., Hamon, M., Lanfumey, L., Deloulme, J.-C., Martres, M.-P., 2010. The deletion of the microtubule-associated STOP protein affects the serotonergic mouse brain network. *J. Neurochem.* 115, 1579–1594. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07064.x
- Fournet, V., Schweitzer, A., Chevarin, C., Deloulme, J.C., Hamon, M., Giros, B., Andrieux, A., Martres, M.P., 2012. The deletion of STOP/MAP6 protein in mice triggers highly altered mood and impaired cognitive performances. *J. Neurochem.* 121, 99–114. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07615.x
- Fradley, R.L., O'Meara, G.F., Newman, R.J., Andrieux, A., Job, D., Reynolds, D.S., 2005. STOP knockout and NMDA NR1 hypomorphic mice exhibit deficits in sensorimotor gating. *Behav. Brain Res.* 163, 257–64. doi:10.1016/j.bbr.2005.05.012
- Friedman, J.R., Webster, B.M., Mastronarde, D.N., Verhey, K.J., Voeltz, G.K., 2010. ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J. Cell Biol.* 190, 363–75. doi:10.1083/jcb.200911024
- George Paxinos, K.F., 2008. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 3th Edition [WWW Document]. Elsevier. URL <http://store.elsevier.com/Paxinos-and-Franklins-the-Mouse-Brain-in-Stereotaxic-Coordinates/George-Paxinos/isbn-9780123910578/> (accessed 11.20.15).
- Gimenez, U., Triquet, A., Deloulme, J.C., Lahrech, H., 2016. High resolution 3D DTI and tractography of brain mouse using Super Resolution Reconstruction. submitted.
- Guizetti, J., Schermelleh, L., Mäntler, J., Maar, S., Poser, I., Leonhardt, H., Müller-Reichert, T., Gerlich, D.W., 2011. Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science* 331, 1616–1620. doi:10.1126/science.1201847
- Heikkinen, T., Lehtimäki, K., Vartiainen, N., Puoliväli, J., Hendricks, S.J., Glaser, J.R., Bradaia, A., Wadel, K., Touller, C., Kontkanen, O., Yrjänheikki, J.M., Buisson, B., Howland, D., Beaumont, V., Munoz-Sanjuan, I., Park, L.C., 2012. Characterization of neurophysiological and behavioral changes, MRI brain volumetry and 1H MRS in zQ175 knock-in mouse model of Huntington's disease. *PLoS One* 7, e50717. doi:10.1371/journal.pone.0050717
- Ishizuka, N., 2001. Laminar organization of the pyramidal cell layer of the subiculum in the rat. *J. Comp. Neurol.* 435, 89–110. doi:10.1002/cne.1195
- Jaglin, X.H., Chelly, J., 2009. Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. *Trends Genet.* 25, 555–66. doi:10.1016/j.tig.2009.10.003
- Jiang, Y., Johnson, G.A., 2010. Microscopic diffusion tensor imaging of the mouse brain. *Neuroimage* 50, 465–71. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.12.057
- Kerbler, G.M., Hamlin, A.S., Pannek, K., Kurniawan, N.D., Keller, M.D., Rose, S.E., Coulson, E.J., 2012. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging detection of basal forebrain cholinergic degeneration in a mouse model. *Neuroimage* 66C, 133–141. doi:10.1016/j.neuroimage.2012.10.075
- Kishi, T., Tsumori, T., Ono, K., Yokota, S., Ishino, H., Yasui, Y., 2000. Topographical

- organization of projections from the subiculum to the hypothalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 419, 205–222. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(20000403)419:2<205::AID-CNE5>3.0.CO;2-0
- Kuijpers, M., Hoogenraad, C.C., 2011. Centrosomes, microtubules and neuronal development. *Mol. Cell. Neurosci.* 48, 349–358. doi:10.1016/j.mcn.2011.05.004
- Livy, D.J., Schalomon, P.M., Roy, M., Zacharias, M.C., Pimenta, J., Lent, R., Wahlsten, D., 1997. Increased axon number in the anterior commissure of mice lacking a corpus callosum. *Exp. Neurol.* 146, 491–501. doi:10.1006/exnr.1997.6564
- Manninen, O., Laitinen, T., Lehtimäki, K.K., Tegelberg, S., Lehesjoki, A.E., Gröhn, O., Kopra, O., 2014. Progressive volume loss and white matter degeneration in *Cstb*-deficient mice: A diffusion tensor and longitudinal volumetry MRI study. *PLoS One* 9, 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0090709
- Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Hirata, T., Hibi, M., Macklis, J.D., 2005. Fezl is required for the birth and specification of corticospinal motor neurons. *Neuron* 47, 817–831. doi:10.1016/j.neuron.2005.08.030
- Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R.L., Macklis, J.D., 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 427–37. doi:10.1038/nrn2151
- Namura, S., Takada, M., Kikuchi, H., Mizuno, N., 1993. Topographical organization of subicular neurons projecting to subcortical regions. *Brain Res. Bull.* 35, 221–231. doi:0361-9230(94)90126-0 [pii]
- Nenadic, I., Gaser, C., Sauer, H., 2012. Heterogeneity of brain structural variation and the structural imaging endophenotypes in schizophrenia. *Neuropsychobiology* 66, 44–9. doi:10.1159/000338547
- Pergola, G., Selvaggi, P., Trizio, S., Bertolino, A., Blasi, G., 2015. The Role of the Thalamus in Schizophrenia from a Neuroimaging Perspective. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1–19. doi:10.1016/j.neubiorev.2015.01.013
- Porrero, C., Rubio-Garrido, P., Avendaño, C., Clascá, F., 2010. Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing *Thy1-eYFP-H* transgenic mice. *Brain Res.* 1345, 59–72. doi:10.1016/j.brainres.2010.05.061
- Powell, K.J., Hori, S.E., Leslie, R., Andrieux, A., Schellinck, H., Thorne, M., Robertson, G.S., 2007. Cognitive impairments in the *STOP* null mouse model of schizophrenia. *Behav Neurosci* 121, 826–835. doi:10.1037/0735-7044.121.5.826
- Rasser, P.E., Schall, U., Peck, G., Cohen, M., Johnston, P., Khoo, K., Carr, V.J., Ward, P.B., Thompson, P.M., 2010. Cerebellar grey matter deficits in first-episode schizophrenia mapped using cortical pattern matching. *Neuroimage* 53, 1175–80. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.07.018
- Ren, T., Zhang, J., Plachez, C., Mori, S., Richards, L.J., 2007. Diffusion tensor magnetic resonance imaging and tract-tracing analysis of Probst bundle structure in *Netrin1*- and *DCC*-deficient mice. *J. Neurosci.* 27, 10345–9. doi:10.1523/JNEUROSCI.2787-07.2007
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–82. doi:10.1038/nmeth.2019
- Schmued, L.C., 1990. A rapid, sensitive histochemical stain for myelin in frozen brain sections. *J. Histochem. Cytochem.* 38, 717–720. doi:10.1177/38.5.1692056
- Susaki, E. a., Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T.M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., Yamaguchi, S., Abe, T., Kiyonari, H., Shimizu, Y., Miyawaki, A., Yokota, H., Ueda, H.R., 2014. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* 157, 726–739. doi:10.1016/j.cell.2014.03.042

- Swanson, L.W., Cowan, W.M., 1977. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 172, 49–84. doi:10.1002/cne.901720104
- Tischfield, M.A., Cederquist, G.Y., Gupta, M.L., Engle, E.C., 2011. Phenotypic spectrum of the tubulin-related disorders and functional implications of disease-causing mutations. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 286–94. doi:10.1016/j.gde.2011.01.003
- Volle, J., Brocard, J., Saoud, M., Gory-Faure, S., Brunelin, J., Andrieux, A., Suaud-Chagny, M.-F., 2013. Reduced expression of STOP/MAP6 in mice leads to cognitive deficits. *Schizophr. Bull.* 39, 969–78. doi:10.1093/schbul/sbs113
- Wahlsten, D., Schalomon, P.M., 1994. A new hybrid mouse model for agenesis of the corpus callosum. *Behav. Brain Res.* 64, 111–7.
- Walther, S., 2015. Psychomotor symptoms of schizophrenia map on the cerebral motor circuit. *Psychiatry Res.* 233, 293–298. doi:10.1016/j.psychresns.2015.06.010
- Wright, N.F., Erichsen, J.T., Vann, S.D., O'Mara, S.M., Aggleton, J.P., 2010. Parallel but separate inputs from limbic cortices to the mammillary bodies and anterior thalamic nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 518, 2334–2354. doi:10.1002/cne.22336

CHAPITRE 4

IN VIVO SRR ET APPLICATION SUR LE CERVEAU MAP6-KO

**High resolution 3D DTI tractography of mouse brain
using Super Resolution Reconstruction method**

Contribution au travail

Pour ce travail, je suis le porteur du projet, et à l'origine de l'ensemble des expériences. L'algorithme de Super-Résolution (SR) a été amélioré par Antoine Trique, stagiaire de 2^{ème} année d'école d'ingénieur que j'ai encadré. Jean Christophe Deloulme m'a donné la possibilité de travailler sur le modèle de souris MAP6-KO (déjà caractérisé dans le chapitre 3) pour valider ce travail méthodologique IRM.

J'ai rédigé l'article en profitant de l'expertise de ma directrice de thèse dans le travail méthodologique IRM.

	Conception et design des expérimentations	Mise en place, préparation de l'expérimentation	Acquisition des données	Traitement des données
Figure 1	***	***	***	***
Figure 2	**	*	***	**
Figure 3	***	***	***	***
Figure 4	***	***	***	***
Figure 5	***	***	***	***
Figure 6	***	***	***	***
Figure 7	***	***	***	***

Etant donné que cet article se base sur les résultats obtenus dans le chapitre 3 pour valider le principe de la technique IRM, nous attendons que l'article «High resolution 3D DTI tractography of mouse brain using Super Resolution Reconstruction method» soit accepté pour publication avant de soumettre ce travail au journal NMR IN BIOMEDICINE.

Contexte scientifique

Comme expliqué précédemment (chapitre 1, 4.1.3), la SR a été choisie pour diminuer les temps d'acquisition nécessaires pour l'obtention d'une image de diffusion 3D à haute résolution spatiale *in vivo* à 9.4T installé au début de ma thèse. En effet, jusqu'à maintenant les seules applications DTI *in vivo* effectuées avec une haute résolution spatiale ont profité d'un plus grand champ magnétique B_0 (Alomair et al., 2015) et /ou d'une cryosonde (Wu et al., 2013).

Le terme de Super-Résolution est générique et il a été utilisé pour d'autres méthodes de traitement de données : le TDI (Track Density Imaging) qui utilise la tractographie pour augmenter la résolution spatiale de l'image, et une autre méthode de Super-Résolution qui utilise le principe d'autosimilarité de l'image. Ces méthodes sont discutées dans cet article. La SR présentée ici est inspirée de (Scherrer et al., 2012) et consiste à reconstruire, à partir d'un ensemble d'images de basse résolution spatiale 2D, une image à haute résolution spatiale 3D.

Etant donné que les performances de la SR ont largement été décrites (voir discussion du papier), nous nous sommes concentrés sur l'évaluation de l'apport de la SR en tractographie. Afin d'évaluer la performance de la SR en tractographie, nous avons utilisé le modèle de souris MAP6-KO car nous connaissons ses caractéristiques, étudiées auparavant (Chapitre 3). Les résultats obtenus s'avèrent très cohérents, tant pour la qualité de reconstruction des tracts que pour la quantification des diminutions de volume de matière blanche chez la souris MAP6-KO.

Etant donné que la tractographie *ex vivo* 3D a suscité de l'intérêt et ouvert de nombreuses collaborations, nous pensons que le SR serait une valeur ajoutée qui facilitera des études *in vivo*, et permettrait par exemple d'évaluer le neurodéveloppement des modèles animaux, ou encore les effets de nouvelles stratégies thérapeutiques.

High resolution 3D DTI tractography of mouse brain using Super Resolution Reconstruction method

Ulysse Gimenez¹, Antoine Triquet¹, Jean Christophe Deloulme² and Hana Lahrech¹

¹Clinattec Translational Technology Lab, INSERM U1205, CEA Grenoble, France

²INSERM, U836, Equipe Physiopathologie du Cytosquelette, Grenoble, France

Corresponding authors: Ulysse Gimenez

ulyссе.gimenez@grenoble-inp.org (+33 4 38 78 94 36)

Key words: super-resolution, 3D-DTI, in vivo tractography, white matter, mouse brain

Abstract

Diffusion Tensor Imaging (DTI) for fiber tractography has great interest in neurosciences to visualize and assess the integrity of white matter structures. However, its use in preclinical studies on mice and rats is challenging since 3D high spatial resolution imaging is required, necessitating longer scan time. Here in order to drastically reduce the total acquisition time (not more than one hour) making *in vivo* DTI of mouse brain possible, we develop rapid microscopic 3D DTI using Super Resolution Reconstruction (SRR) method at high field.

The method is based on 2D DTI acquisitions in multiple slice orientations. 2D acquisitions were obtained at 9.4T, on coronal, sagittal and axial orientations using EPI k-space scheme with an in plane resolution of $120 \times 120 \mu\text{m}^2$ and a slice thickness of $360 \mu\text{m}$. Since DTI with EPI acquisitions suffer from severe distortions due to B_0 inhomogeneities, reverse gradient correction was used. It applies on two acquisitions wherein the phase magnetic field gradient is inversely incremented. The application of the Super Resolution method on accurate corrected 2D images leads to 3D high spatial resolution image of $120 \times 120 \times 120 \mu\text{m}^3$ in a total time of one hour. Compared to initial anisotropic acquisition or simple interpolation of the data, 3D DTI tractography of the mouse brain, obtained from SRR images, showed significant improvements with fiber bundles which were accurately reconstructed by comparison to those obtained with *ex vivo* acquisitions.

Since we have already reported and validated the alteration of major white matter structures in MAP6-KO mice in a previous study, the SRR method was applied on this schizophrenia mouse model. The white matter defects were successfully reported, and the quantification of individual tract volume decrease was performed. Thus, the SRR combined to reversed gradient corrections represent a promising tool to evaluate the integrity of mouse white matter tracts *in vivo*.

Introduction

Diffusion weighted (DW) imaging probes the microarchitecture of the brain (Basser and Pierpaoli, 1996) and allows the examination of microstructures integrity. Diffusion Tensor imaging (DTI) has been used in several neuropathologies to assess their impact on both white and grey matter. In particular, DTI-tractography is a unique technique able to reconstruct white matter tracts non-invasively. It is commonly used in clinic, in pre-surgical imaging (Buchmann et al., 2011, Dimou et al., 2013), diagnosis (Dumas et al., 2012, Iwata et al., 2011) or for brain connectivity mapping (Honey et al., 2009, Behrens et al., 2003, Lazar et al., 2003). Since many neuropathological disease are correlated with white matter defects (Abhinav et al., 2014), tractography applications on animal models have a huge potential (Kerbler et al., 2013, Brennan et al., 2013). It has been largely applied in ex vivo studies, and has highlighted major defects in white matter structures of mouse model of schizophrenia (Gimenez et al. in redaction). However, in vivo tractography, in particular on small animals like mice and rats, is still challenging since it requires high spatial resolution diffusion acquisitions in a time window suitable to in vivo requirements.

To enhance the sensitivity, i.e the signal to noise ratio (SNR) within an image voxel, one solution consists in using very high magnetic fields (Alomair et al., 2015, Brennan et al., 2013) which can indirectly allow acquisition accelerations. However, in addition to the expensive cost of such magnets, many artefacts of magnetic susceptibility may occur and are especially more pronounced for diffusion imaging. In addition, T_1 longitudinal relaxation parameter becomes longer necessitating longer repetition time. The development of cryoprobes which enhance the SNR of the MRI image is also a solution with promising results as it was shown at 11.7T (Wu et al., 2013) for the whole mouse brain high resolution DTI characterization.

The implementation of innovative data processing to improve image resolution has been widely developed in clinic. It has the advantage to be easily implemented among research centers. Super resolution (SR) algorithms which consist in using a set of low spatial resolution 2D acquisitions to obtain a 3D high spatial resolution volume affords major improvement in final spatial resolution (Scherrer et al., 2012, Gholipour et al., 2010, Van Reeth et al., 2012). The enhancement of the spatial resolution clearly demonstrated in clinical

applications the higher image quality of the 3D DTI tractography reconstructions (Scherrer et al., 2012).

This study aims to demonstrate the potential of SR post-processing applied to *in vivo* DTI applications in preclinical applications on mice.

However, as *in vivo* DTI acquisitions on mouse brain are performed at higher magnetic fields than in clinic, usual rapid sequences like echo planar imaging (EPI) are highly sensitive to B_0 inhomogeneities and time fluctuations at the origin of severe distortions. These distortions are incompatible with the use of SR processing that requires the registration of undistorted low resolution images to avoid misinterpretations. For this purpose, as the reverse gradient method (Morgan et al., 2004) was proved to correct severe distortions contrary to usual correction methods, it was here combined to SR post-processing. The term ‘reverse gradient’ refers to an acquisition of two sets of echo-planar images with phase encoding gradients of opposite polarity.

In order to increase high spatial resolution images, different methods of SR post-processing were developed. The track density imaging is based on diffusion tractography and consists in a gathering of DTI images with tractography reconstructions. The track density imaging gives impressive results and reaches an *in vivo* isotropic resolution of $250\mu\text{m}^3$ in clinic (Calamante et al., 2010). However, these techniques do not better sample the high frequency of the k-space (Scherrer et al., 2012), and are based on tractography, which uses interpolation between pixels to smooth and optimize the fibers reconstruction fibers. Another SR post-processing was described by (Manjon et al., 2010, Rousseau and Alzheimer's Dis, 2010), and was applied to diffusion weighted images (Coupe et al., 2013). It does not require specific acquisition scheme and consists in using the self-similarity property of images to reconstruct images with higher resolution. This post-processing shows interesting results with a major increase in the spatial resolution of reconstructed image and an enhancement of the quality of DTI tractography (Coupe et al., 2013), and may be combined to the method used in this study.

In this study, SR post-processing was applied to 2D DTI-EPI acquisitions of mouse brains at 9.4 T with in-plane pixel size of $120 \times 120 \mu\text{m}^2$ and a slice thickness of $360 \mu\text{m}$. Reverse gradient correction method was performed to get rid of severe B_0 inhomogeneity distortions that especially appear at high magnetic field. A 3D DTI super resolution reconstruction (SRR) volume with isotropic resolution of $120 \mu\text{m}^3$ was obtained. Tractography was performed using SRR-DTI data and the quality of DTI parameters and

tractography were compared to those obtained from ex vivo acquisition, characterized by a stable signal since the k-space sampling was Cartesian, and for each repetition time, each line is acquired with a novel RF excitation.

As in our previous work (Gimenez et al., in redaction) we have characterized the alterations of major white matter structures in MAP6-KO mice and validated these data using histology and fluorescent microscopy of cleared brains, here we evaluate the feasibility of the SRR method and its accuracy on this schizophrenia model comparing the results to wild type mice *in vivo*.

Material and Methods

Mice

All acquisitions were performed on a C57Bl6/129 SvPas-F1 genetic background. The homogeneous inbred C57BL6/129SvPas-F1 mice were obtained by crossing pure heterozygote 129SvPas MAP6 mice with pure heterozygote C57BL6 MAP6 mice. Female wild type (WT) (n=4) and MAP6-KO (n=4) littermate mice at 6 months of age were used in compliance with the European Community Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC)

Fixed-brain preparation

The brains were fixed by transcardiac perfusion of a 4% paraformaldehyde solution in phosphate buffered saline containing 6.25mM of Gd-DOTA (Guerbet Laboratories), and preserved in the same solution as already described (Gimenez et al, submitted). Brains were maintained in the skulls, and placed in Fomblin oil (FenS chemicals, Netherlands) for MRI imaging.

MRI acquisition

MRI was performed at 9.4T Bruker Biospec Avance III using homogenous coil for transmission and a head surface coil for reception (Grenoble MRI facility IRMaGE).

In vivo acquisitions were performed under isoflurane anesthesia (2%). A second order shimming was calculated in an ellipsoidal region contained in the brain, based on B_0 map acquisition. Single shot spin-echo EPI sequences were acquired in coronal, sagittal and axial orientations. For each orientation, the acquisition was firstly performed with “blip up” phase gradient scheme and repeated with opposite “blip down” phase gradient scheme as shown in figure 1. The six EPI acquisitions were acquired with a repetition time/echo time of: TR/TE = 4000/26 ms, a number of accumulation NA = 20. Diffusion gradient duration and separation were set to $\delta = 4\text{ms}$ $\Delta = 8.5\text{ms}$ respectively, and a gradient factor b-value of 1000s/mm². Six directions of gradient diffusion were applied according to [(-0.298 0.136 0.945), (0.618 -0.326 0.715), (0.484 0.700 0.526), (-0.979 -0.095 0.178), (-0.286 -0.817 0.500), (0.503 -0.842 -0.194)] in the (X Y Z) coordinates. The reference acquisition was obtained with a b-value of 50 s/mm². The spatial resolution was set to 120 × 120 × 360 μm^3 . The field of view of 12.24 × 10.08 × 13.68 mm³ was the same for all acquisitions. EPI acquisition duration was 9min20s. TurboRARE acquisitions were acquired with the same spatial resolution and field of view to estimate distortions corrections applied to EPI data. Sequence parameters were adjusted with: TR/TE = /2500/20 ms, NA = 6, RARE factor, which corresponds to the number of k-space

segmentation, i.e. the number of RF pulses for complete k-space acquisition, was set to 4. Each TurboRARE acquisition lasted 5min15s leading to a total duration of SRR MRI protocol of about 75 minutes.

Ex vivo 3D DTI was acquired with spin echo diffusion sequence on fixed brains with the following parameters: TR/TE=90/16 ms, NA = 3, diffusion gradient duration and separation $\delta = 3.5\text{ms}$ $\Delta = 8\text{ms}$ respectively, a b-value of 1500 s/mm^2 . 96 diffusion directions were acquired, supplemented with 14 non-diffusion weighted images. The field of view was set to $20 \times 9 \times 12 \text{ mm}^3$, and the spatial resolution to $100 \times 100 \times 100 \text{ }\mu\text{m}^3$ for a total time of 59h46min. This spin echo sequence was performed with Cartesian trajectory of the k-space which do not suffer from distortions, and with a good SNR. Thus, we considered it as the gold standard 3D DTI acquisition, to evaluate the SR performance.

Image processing

Reverse gradient correction

The processing of corrections obtained from reverse gradient method was performed using the Topup tool from FSL software (Oxford, United Kingdom).

The first step is to calculate the susceptibility-induced off-resonance field from both images characterized by opposite distortions. Some steps are needed. Firstly, calculations are performed on images roughly smoothed with a Gaussian filter to extract large distortions; secondly calculations are applied on images less smoothed in order to gradually reach a degree of details; and finally, the two images are combined into a single corrected image.

These corrections were performed with the same parameter settings in coronal, sagittal and axial directions, and were composed of seven successive steps with the following parameters: the estimated spatial resolution in mm [2, 2, 1, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1], the gaussian smoothings [1, 0.7, 0.4, 0.2, 0, 0, 0], and the relative weight regularizations [$5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-7}$, $2,5 \cdot 10^{-7}$].

SPM registration

Since accurate registration of low spatial resolution images in different orientations are needed for SRR, the undistorted data were loaded in Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA) and the software package SPM was used to rigidly register sagittal and axial volumes to the coronal acquisition.

Super resolution algorithm

The SR algorithm was used on registered coronal, sagittal and axial images for each diffusion weighted experiment. The initial low resolution images ($120 \times 120 \times 360 \mu\text{m}^3$) were combined giving a 3D image with isotropic voxel size of $120 \times 120 \times 120 \mu\text{m}^3$.

The SR algorithm was developed on homemade Matlab software inspired from previously published work (Gholipour et al., 2010, Scherrer et al., 2012). Briefly the SR consists in using information from anisotropic acquisitions to increase spatial resolution in the through plane orientation by a factor 3. In this model, the 2D low resolution image (y_k) is given as:

$$y_k = D_k B_k M_k x + \epsilon_k$$

Where x is the true 3D volume, M_k is the wrapping matrix which projects high volume matrix to low volume matrix orientation, D_k is the down-sampling matrix, B_k is the point spread function (PSF) and, $k = 1, 2$ or 3 for coronal, sagittal and axial acquisitions respectively. Here, the PSF was assumed in the slice direction only and correspond to a Gaussian profile with a constant variance σ_{PSF}^2 (Scherrer et al., 2012).

The calculation of x was performed using maximum a posteriori (MAP) principle (Scherrer et al., 2012) which leads to the minimization of the function J_{MAP} :

$$J_{MAP}(x) = \sum_k^3 \|y_k - D_k B_k M_k x\|^2 + \lambda \|Qx\|^2$$

where the prior term $\lambda \|Qx\|^2$ was added, based on the assumption of continuous signals in the spatial dimension. It consists in the application of a 3D Laplacien high pass filter Q , weighted with the regularization parameter λ .

The resolution of this equation is an ill-posed problem. A steepest descent iterative minimization approach was used until a cutoff value (τ_{stop}) fixed by the experimenter:

$$\|\hat{x}^{n+1} - \hat{x}^n\| < \tau_{stop}$$

with

$$\hat{x}^{n+1} = \hat{x}^n - \alpha \left[\sum_k^3 M_k^T B_k^T D_k^T (D_k B_k M_k \hat{x}^n - y) + \lambda Q^T Q \hat{x}^n \right]$$

The regularization parameter λ was carefully chosen by comparing several reconstructions (data not shown) and set to 0.01. In this study, the dynamical minimization step α was optimized using the Barzilai Borwein algorithm and α was updated for each iteration according to:

$$\alpha = \frac{\Delta J(x)^T \Delta x}{\Delta J(x)^T \Delta J(x)}$$

with:

$$\Delta J(x) = \nabla J_{MAP}(\hat{x}^n) - \nabla J_{MAP}(\hat{x}^{n-1})$$

$$\Delta x = \hat{x}^n - \hat{x}^{n-1}$$

This adjustment exhibits a gain performance in the convergence, with a factor 10.

In order to demonstrate the contribution of SR algorithms in our study, we also reconstruct 3D high resolution volume with a simple interpolation. In this case, a voxel of the high resolution corresponds to the mean intensity of the three corresponding voxels originating from coronal, sagittal and axial acquisitions.

DTI and tractography

Reconstructed 3D isotropic diffusion weighted images were analyzed with Trackvis software (<http://trackvis.org/>). Diffusion tensors were computed, and the eigenvalues ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$) and their eigenvectors (V_1, V_2, V_3), corresponding to the directions of diffusivities, were obtained. V_1 is the principal vector corresponding to the maximum value of the diffusivities noted λ_1 . The fractional anisotropy (FA) and FA-color maps were calculated according to:

$$FA = \sqrt{\frac{3}{2}} \sqrt{\frac{(\lambda_1 - MD)^2 + (\lambda_2 - MD)^2 + (\lambda_3 - MD)^2}{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}}$$

With MD the mean diffusivity given by:

$$MD = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3}$$

Color maps are obtained by using a color code according to the direction of the principal vector pixelwise; red for the lateral direction, green for the dorso-ventral direction and blue for the anterior-posterior direction. In our case it is also weighted by the FA.

Fibers were reconstructed with the Tensorline algorithm (Weinstein et al., 1999) using the cutoff criteria $FA_{cutoff} = 0.25$, determined after several processing (not shown). Regions of interest to select particular white matter structures were manually delineated on anatomical high spatial resolution images. White matter structures volumes were obtained from Trackvis software and statistical analysis were performed with R software. Bars were represented as mean \pm standard error of the mean, and Welch's t test was performed.

Results

Super resolution reconstruction (SRR)

Using the reverse gradient method, distortions of the EPI images were corrected. At the interface between blood vessels and tissue, severe distortions were observed (figure 1 - white arrows) in the phase direction which corresponds to the dorso-ventral direction for both acquisition schemes. While in the “blip down” acquisition (Fig.1A), the image is stretched in the phase direction (red arrow), in the “blip up” acquisition (Fig.1B) the image shows a hyper-intensity (red arrow). In fact, the intensity values of several pixels are contained in this voxel, and the position information is lost in this case. Despite this artefact, the combination of “blip down” and “blip up” acquisitions into the Topup software leads to an undistorted image (Fig.1C). Compared to anatomical T_{2w} (Fig.1D), the correction seems satisfactory.

Once distortion corrections are performed, the three resulting coronal, sagittal and axial 2D images are the input of the SR algorithm and the 3D isotropic high resolution image is the output image (figure 2). The SR algorithm regroups the high frequency information of the k-space for each image orientation and combines it to obtain a reconstruction which fully samples the k-space.

Increased resolution in DTI metric maps

The SRR was obtained for each diffusion gradient separately, and diffusion tensor was computed on the resulting 3D diffusion weighted volume. In figure 3, FA maps obtained from 2D acquisitions in coronal plane and coronal images extracted from 3D SRR images are compared. We can notice that SRR FA maps give much more details in images than coronal FA maps since the through plane resolution is enhanced, and improve the visualization of brain structures. The 3D resolution of 120 μm is unachievable in the through plane direction of 2D acquisitions limited by the gradient system.

Evaluation of SR benefits in vivo

In figure 4, FA-color maps are all presented in coronal plane at the same spatial position, and were obtained from 2D acquisition, simple interpolation of the 2D acquisitions, 3D SRR and 3D high resolution DTI acquired *ex vivo*. The performance of the SRR 3D images is focused on the detection of the side portion of the internal capsule (showed by red arrows in zoomed images). One can remark that SRR FA-color map presents a better contrast, and it is, compared to 2D acquisition and to interpolation reconstruction, the only one which discerns the white matter structure also present on our *ex vivo* reference acquisitions (red arrows).

The tractography is another approach for SRR performance evaluation. In figure 5, fornix tractography was obtained from coronal acquisition, interpolated images, SRR images and ex vivo 3D DTI. The coronal data poorly reconstructs the fornix and shows severe loss of fibers (Fig. 5A –red arrows). Interpolation (Fig.5B) and SR (Fig. 5C) reconstructions seem much more satisfactory, with fornix appearance closed to the reference image ex vivo (Fig. 5D). However, the presence of erroneous fibers in the fornix post-commissure (Fig.5B - blue arrow) and the absence of projections (Fig.5B -white arrows) were detected in interpolated data compared to SRR. The SRR exhibits good tractography performance on the fornix, even if it remains incomplete compared to our reference images ex vivo (Fig.5D – white arrows).

Altogether, these results show an improvement of SRR DTI in comparison to the original acquisitions. The SRR was shown to reveal structures imperceptible with a simple interpolation of the data. The resulting high spatial resolution data can be used to characterize the brain anatomy with more accuracy.

In vivo applications on MAP6-KO mice

Figure 6 focuses on the fiber imaging of the fornix and cerebral peduncle structures which were known to undergo projections atrophy in MAP6-KO mice on the post-commissural fornix and the projection toward the pyramidal tract respectively (Gimenez et al, in redaction). The expected alterations are clearly observed in vivo with SRR, shown with red arrows, and compared to WT mice. The evaluation of the tract integrity is finally proved using SRR method obtained from 2D acquisitions in vivo.

The measures of white matter volumes from 3D SRR tractography for several structures are given in figure 7. In all mice, each structure is successfully reconstructed. The volume variations of MAP6-KO mice compared to those of WT and of the different structures were presented in figure 7B. As expected, the already observed heterogeneity in overall white matter decrease was detected (Gimenez et al, in redaction), and the results were close to those obtained on 3D high resolution images ex vivo. The stria medularis, the corpus callosum, the cerebral peduncle and the internal capsule were the most affected structures while the stria terminalis decrease was limited. Our results led to significant precisions in the measures of volume variations.

Discussion

To apply the SRR method, the 2D images acquired in different plane orientations should not exhibit any artefacts and a special consideration is required to avoid any possible artefacts essentially when using high magnetic fields and rapid acquisitions such as one-shot EPI images which are very sensitive to susceptibility and off resonance effects, gradient instabilities and eddy currents (Holland et al., 2010, Vardal et al., 2014). In our case the more dominant geometrical distortions were those resulting from the application of the gradient phase encoding gradient and we used reversal gradient method for artefact correction.

EPI images provide relatively high spatial resolution images ($120 \times 120 \times 360 \mu\text{m}^3$). For DTI mouse brain investigations, high resolution images are needed to successfully distinguish brain structures. Moreover, in the case of tractography, isotropic 3D images contributed to robust reconstructions since they are independent of the spatial direction of the imaging gradients. *In vivo* 3D high spatial resolution acquisition of mouse brain remains very challenging since it is time-consuming. In the 2D multi-slice acquisitions, the number of slices are limited for a given repetition time and the slice thickness is limited by the maximum intensity of the gradient system and by the spectral width of the selective RF pulses. Taking into account all these technical limitations, the use of the SR algorithm to reach *in vivo* isotropic 3D high spatial resolution imaging seems a very promising alternative method for microscopic MRI of the brain, in particular for DTI acquisitions which require longer time scan.

In-plane SR, which relies on acquisitions with a subvoxel shift in the plane is controversial since it samples the same data points of the k-space (Scheffler, 2002). Interslice SR characterized by subvoxel shift in the slice direction has shown improvements in the resulting reconstructions (Greenspan et al., 2002). However, these techniques appear less efficient than SR algorithm applied to acquisitions with rotated orientations (Plenge et al., 2012) where the k-space is not oversampled (Scherrer et al., 2012).

The ideal number of acquisitions in different plane orientations was explored (Plenge et al., 2012, Poot et al., 2013), but it depends on the anisotropic factor between in plane and through plane spatial resolutions. Perpendicular acquisitions were generally chosen probably because of their common use. SRR with different plane orientations has proved to significantly increase the SNR efficiency (Poot et al., 2013, Greenspan et al., 2002), the PSNR (peak signal to noise ratio) and the Mean Absolute Error (Gholipour et al., 2010, Scherrer et al., 2012) of the image. These methods also showed their usefulness for

tractography (Scherrer et al., 2012, Poot et al., 2013). Our SR protocol was derived from the one used in previous studies (Gholipour et al., 2010, Scherrer et al., 2012) with three perpendicular acquisitions.

The main weakness of our SR post-processing probably comes from the simplified model considered for MRI images y_k . For example, the PSF estimation with a Gaussian profile is an approximation that should be improved, with an estimate of edge effects. Moreover, SRR requires good SNR of the 2D acquired images and compromises of the experimental parameters of imaging (contrast and spatial resolution) and diffusion (b-value and number of gradient diffusion orientations) should favor high SNR within the imaging voxel for a total available acquisition time. The registration of the gradient diffusion orientations between 2D acquisitions is not considered in our model. This would necessitate the combination of SR processing and DTI modeling, and it is under investigation. However, due to the limited motion of mouse head during the acquisition, the results obtained with SRR appear rewarding.

Our SR algorithm was tested on several anatomical acquisitions to prove its efficiency in clinic (data not shown) and in preclinic (data not shown). To our knowledge, this is the first time that SRR is applied on mouse brain *in vivo* to generate high spatial DTI images revealing imperceptible white matter structures (Fig. 4). The accuracy of SRR-DTI tractography was assessed on the basis of our knowledge concerning the MAP6-KO mice which are characterized by major defects in white matter structures (Gimenez et al, in redaction). The method was successfully able to detect the same inhomogeneous decrease of tracts volumes, as expected from our previous findings. These results validate the feasibility of the SRR method for mouse brain investigations *in vivo*. Therefore, the SRR method is of great interest to visualize and quantify microscopic white matter fiber changes during a follow-up of the development of the brain or for the assessments of innovative therapies.

Conclusion

In this study, the SR algorithm allowed the reconstruction of isotropic 3D DTI image with high spatial resolution ($120 \times 120 \times 120 \mu\text{m}^3$) from a set of three 2D DTI anisotropic images ($120 \times 120 \times 360 \mu\text{m}^3$) acquired *in vivo* in coronal, sagittal and axial orientations. The SRR was possible after MRI artefact corrections using reverse gradient correction method. On the basis of our previous white matter characterization of the MAP6-KO mouse model, the SRR 3D DTI tractography imaging was robustly validated. In fact the SRR tractography was successfully able to detect, as expected from our previous findings, the same inhomogeneous decrease of tract volumes. Thus, the SR post-processing is a promising method for microscopic tractography imaging of mouse brain and could be independent on the MRI hardware equipment provided. Since the total DTI scan time is about one hour, the method is suitable for *in vivo* applications in longitudinal studies to detect possible changes of white matter tracts with natural evolution or under therapies.

Acknowledgments

The authors acknowledge the excellent technical support of the MRI Facility of Grenoble (IRMaGe). We thank S. Andrieu, F. Mehr for animal care. U. G received a stipend from the French Ministry.

Figures

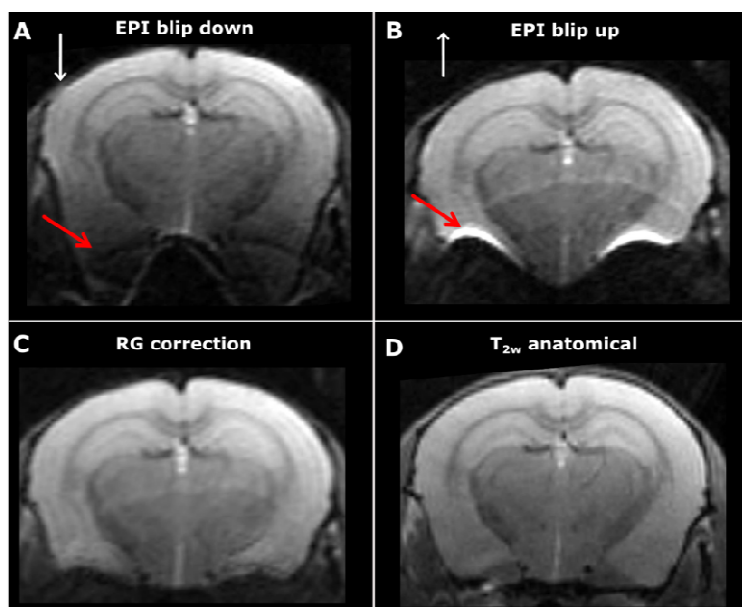


Figure 1. Reverse gradient (RG) method applied to reversed phase-encode blips EPI acquisitions. Coronal one shot EPI images are acquired with “blip down”, and “blip up” (A-B). They exhibit opposed distortions (red arrow), depending on the blip phase direction (white arrows). The opposite distortions are compensated and a corrected image is obtained (C). The corrected image is closely similar to T_{2w} anatomical image acquired with the same geometry parameters (D).

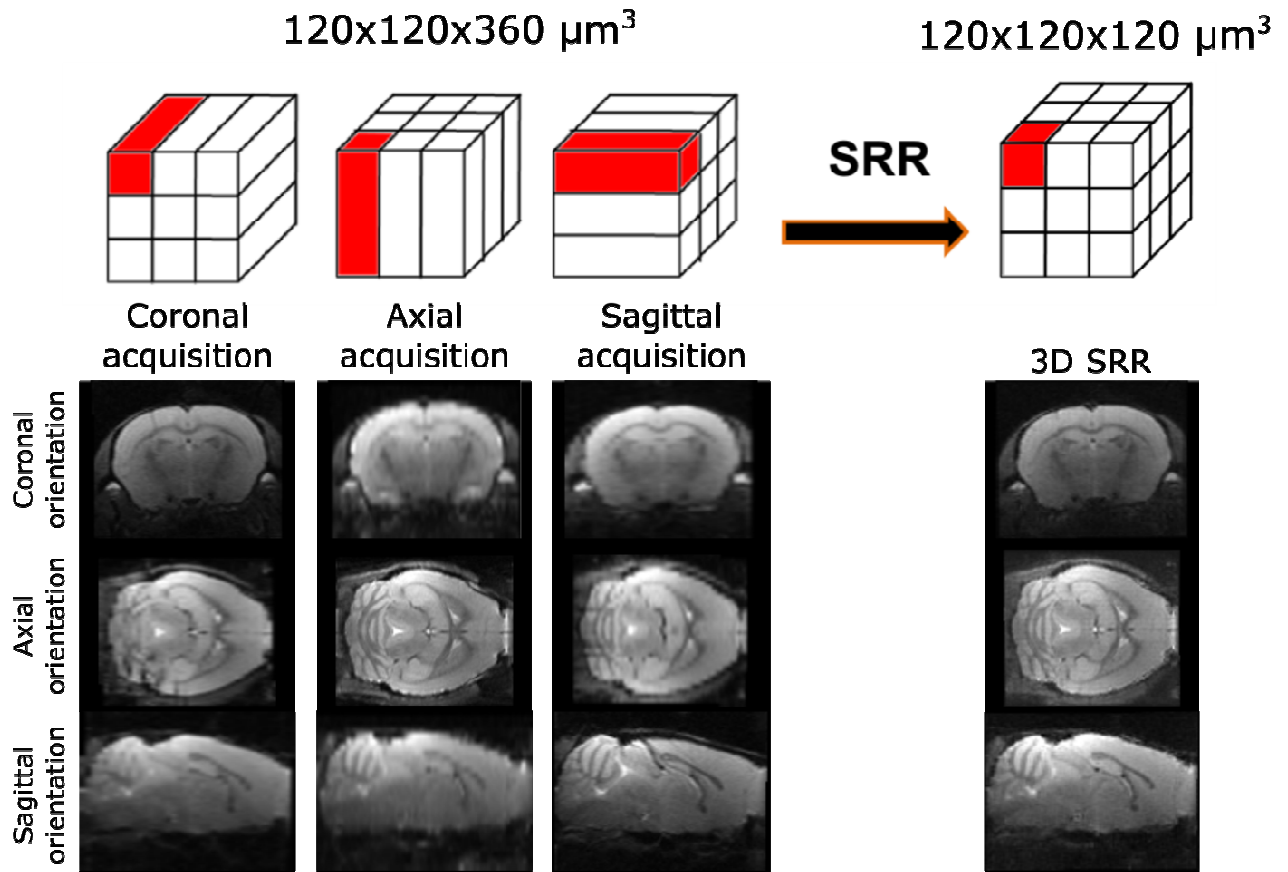


Figure 2. Super resolution reconstruction (SRR) principle. Anisotropic ‘low resolution’ images are acquired in coronal, sagittal and axial orientations, with the same field of view, and a spatial resolution of $120 \times 120 \times 360 \mu\text{m}^3$. The SR uses these acquisitions to build an isotropic 3D image with spatial resolution increased by a factor 3 in the through plane direction, $120 \times 120 \times 120 \mu\text{m}^3$. Information of a given voxel of the 3D image (red) is derived from the three anisotropic voxels (red).

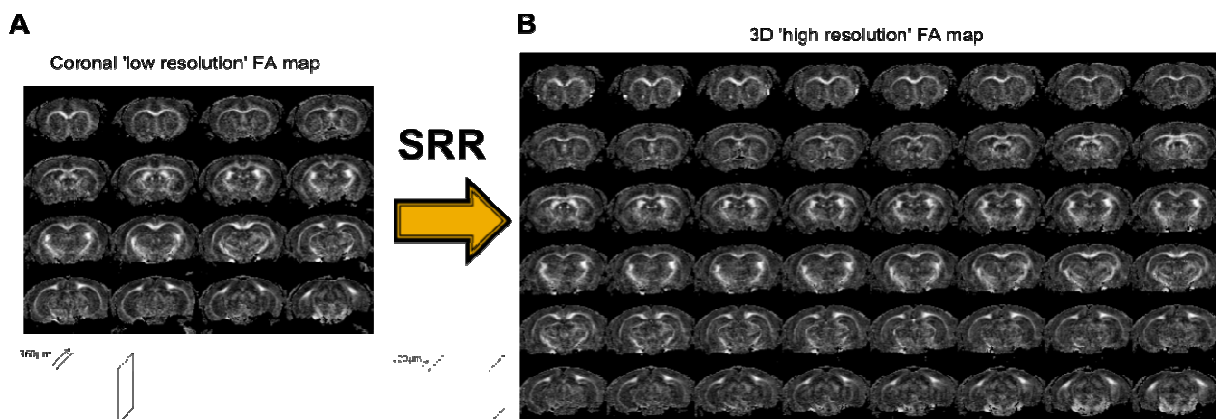


Figure 3. FA maps from the 2D coronal acquisition (A) and from the 3D super resolution reconstruction (B). The SRR leads to a higher spatial resolution in the through plane direction.

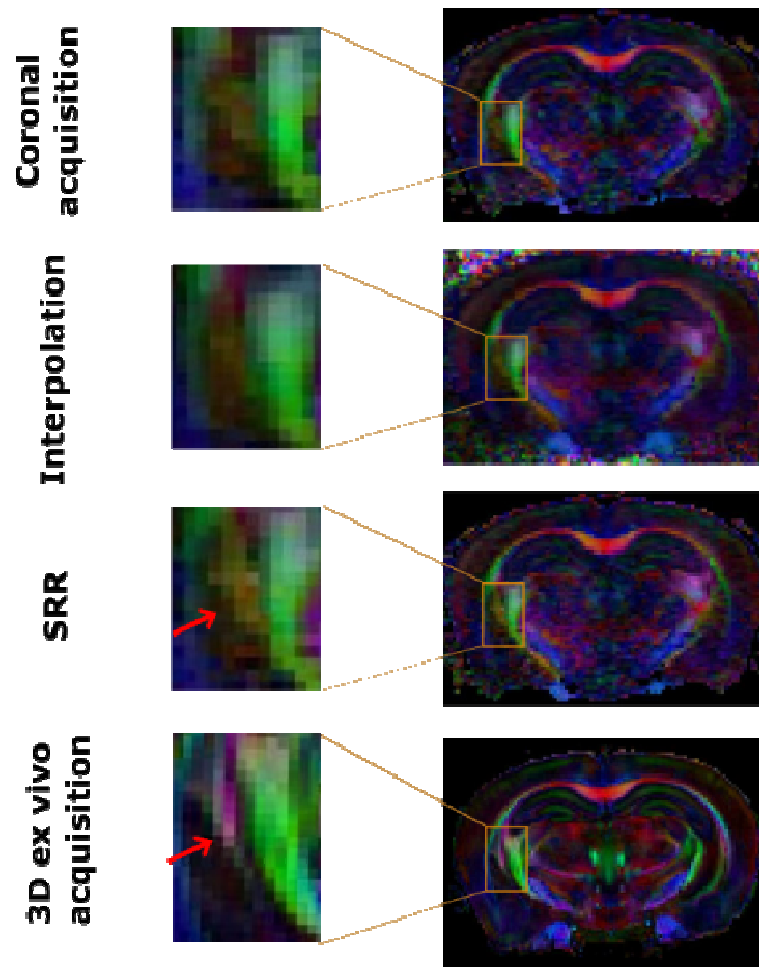


Figure 4. Evaluation of super resolution reconstruction using FA-color maps. The main diffusivity vector is encoded with a directional-color code: red for the lateral direction, green for the dorso-ventral direction and blue for the anterior-posterior direction. coronal slices at the same position were displayed from 2D acquisition ($120 \times 120 \times 360 \mu\text{m}^3$), 3D interpolation reconstruction ($120 \times 120 \times 120 \mu\text{m}^3$), 3D SRR ($120 \times 120 \times 120 \mu\text{m}^3$), and 3D ex vivo acquisition ($100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$). The performance of SRR reconstructions is focused on the detection of the side portion of the internal capsule (showed by red arrows in zoomed images). In both 2D coronal and interpolation reconstruction, the structure looks blurred, whereas it seems highlighted in SRR, and in ex vivo gold standard acquisition.

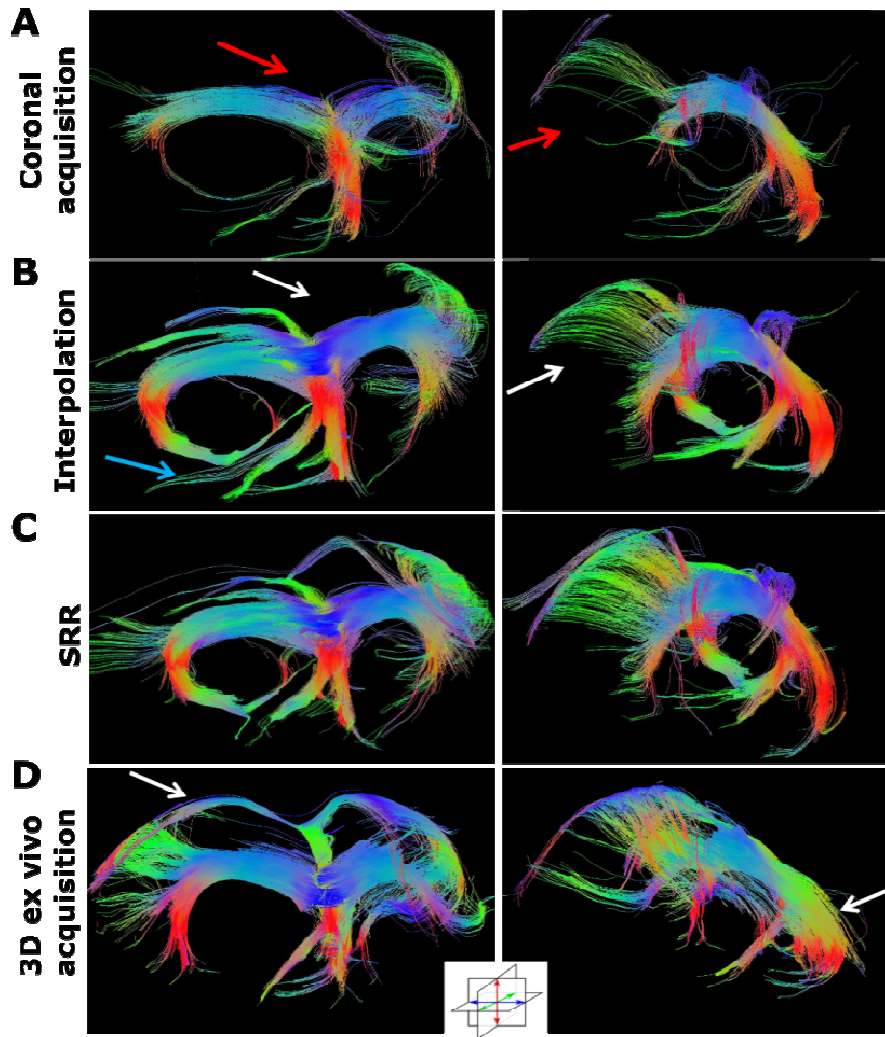


Figure 5. Evaluation of the performance of the SRR method on the basis of the fornix tractography comparison on a WT mouse. Fornix tractography was performed with similar region of interest (not shown) on images directly obtained from coronal 2D DTI acquisition, on 3D DTI images obtained after linear interpolation, on 3D images obtained after SRR and on images of our reference 3D ex vivo acquisition. Fibers were represented with a directional-color code: blue for the lateral direction, green for the dorso-ventral direction and red for the anterior-posterior direction. In the case of coronal acquisition, the fornix is poorly reconstructed, the fiber bundles appear very thin and major projections are missing (red arrow). In the tractography using interpolation reconstruction, the major tracts of the fornix are reconstructed, but some projections are missing (B - white arrow), and other are false (green arrow). The SRR tractography remains complete, but it stills perfectible since some tracts are altered compared to gold standard acquisition (D white arrow).

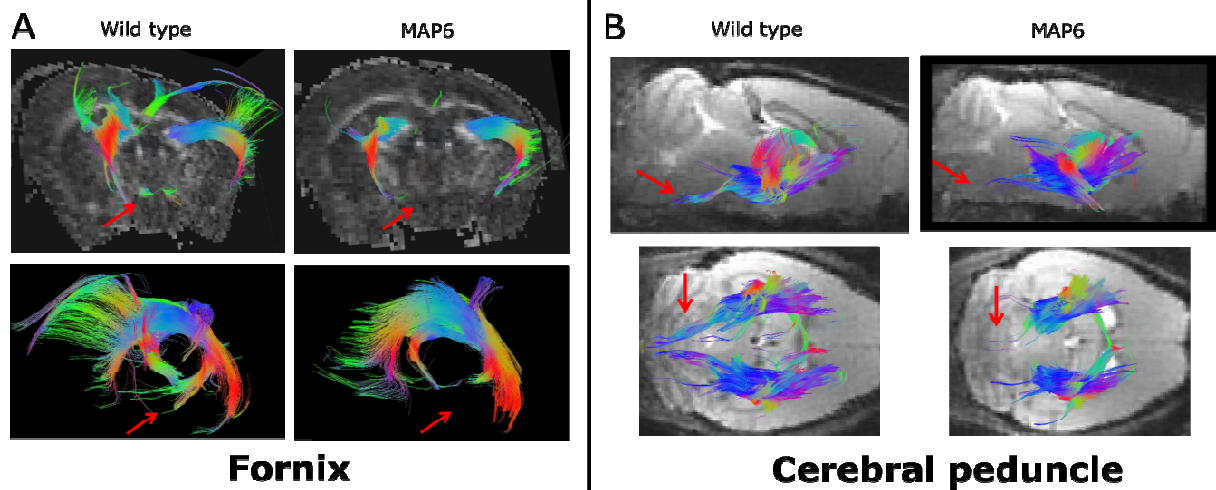


Figure 6. *In vivo* detection of white matter defects in the MAP6-KO mouse. Images are obtained from typical brains. Tractography is performed on 3D DTI SRR for both wild type and MAP6-KO mice. Fibers were represented with a directional-color code: blue for the lateral direction, green for the dorso-ventral direction and red for the anterior-posterior direction. (A) The fornix tractography was displayed on coronal FA map, and in sagittal view. As expected, the post-commissure fornix is clearly absent in the MAP6-KO mice (red arrow). (B) The cerebral peduncle fiber imaging is overlaid on sagittal and axial anatomical images. The data highlight an atrophy of the cerebral peduncle projection toward the pyramidal tract.

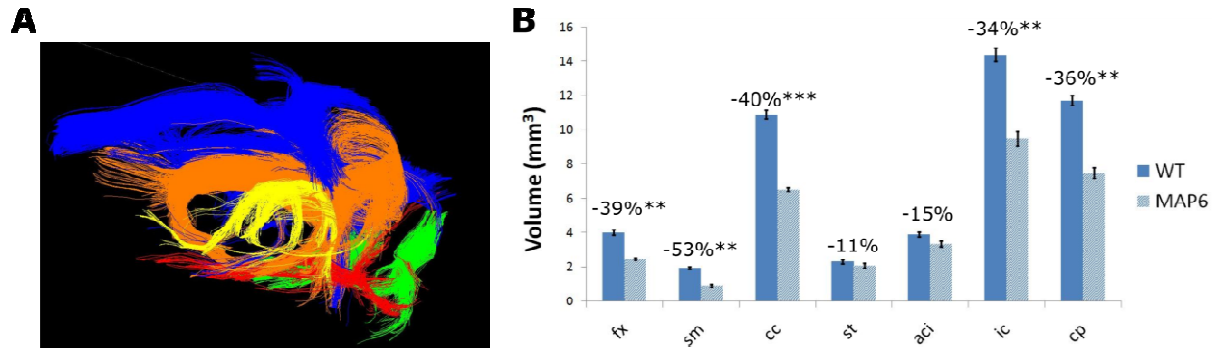


Figure 7. *In vivo* quantification of white matter volumes in the wild type and MAP6-KO mice. Tractography of the whole brain based on 3D DTI SRR was used to quantify the inhomogeneous white matter volume decrease in the MAP6-KO mice (n=4) compared to wild type mice (n=4). The fornix (fx), the corpus callosum (cc), the stria medularis (sm), the stria terminalis (st), the intrabulbar anterior commissure (aci), the internal capsule (ic), and the cerebral peduncle (cp) were selected. Several structures were represented in (A) with specific colors: the cc in blue, the fx in orange, the opt in red, the aci in green and the sm in yellow. The SRR generates accurate white matter tractography representations based on *in vivo* acquisitions. The white matter structure volumes were compared, and show heterogeneity of the volume decrease (B).

References

- Abhinav, K., Yeh, F.-C., Pathak, S., Suski, V., Lacomis, D., Friedlander, R. M. and Fernandez-Miranda, J. C. (2014) 'Advanced diffusion MRI fiber tracking in neurosurgical and neurodegenerative disorders and neuroanatomical studies: A review', *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1842(11), pp. 2286-2297.
- Alomair, O. I., Brereton, I. M., Smith, M. T., Galloway, G. J. and Kurniawan, N. D. (2015) 'In vivo High Angular Resolution Diffusion-Weighted Imaging of Mouse Brain at 16.4 Tesla', *Plos One*, 10(6).
- Basser, P. J. and Pierpaoli, C. (1996) 'Microstructural and physiological features of tissues elucidated by quantitative-diffusion-tensor MRI', *Journal of Magnetic Resonance Series B*, 111(3), pp. 209-219.
- Behrens, T. E. J., Johansen-Berg, H., Woolrich, M. W., Smith, S. M., Wheeler-Kingshott, C. A. M., Boulby, P. A., Barker, G. J., Sillery, E. L., Sheehan, K., Ciccarelli, O., Thompson, A. J., Brady, J. M. and Matthews, P. M. (2003) 'Non-invasive mapping of connections between human thalamus and cortex using diffusion imaging', *Nature Neuroscience*, 6(7), pp. 750-757.
- Brennan, F. H., Cowin, G. J., Kurniawan, N. D. and Ruitenberg, M. J. (2013) 'Longitudinal assessment of white matter pathology in the injured mouse spinal cord through ultra-high field (16.4 T) in vivo diffusion tensor imaging', *Neuroimage*, 82, pp. 574-585.
- Buchmann, N., Gempt, J., Stoffel, M., Foerschler, A., Meyer, B. and Ringel, F. (2011) 'Utility of diffusion tensor-imaged (DTI) motor fiber tracking for the resection of intracranial tumors near the corticospinal tract', *Acta Neurochirurgica*, 153(1), pp. 68-74.
- Calamante, F., Tournier, J. D., Jackson, G. D. and Connelly, A. (2010) 'Track-density imaging (TDI): Super-resolution white matter imaging using whole-brain track-density mapping', *Neuroimage*, 53(4), pp. 1233-1243.
- Coupe, P., Manjon, J. V., Chamberland, M., Descoteaux, M. and Hiba, B. (2013) 'Collaborative patch-based super-resolution for diffusion-weighted images', *Neuroimage*, 83, pp. 245-261.
- Dimou, S., Battisti, R. A., Hermens, D. F. and Lagopoulos, J. (2013) 'A systematic review of functional magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging modalities used in presurgical planning of brain tumour resection', *Neurosurgical Review*, 36(2), pp. 205-214.
- Dumas, E. M., van den Bogaard, S. J. A., Ruber, M. E., Reilman, R. R., Stout, J. C., Craufurd, D., Hicks, S. L., Kennard, C., Tabrizi, S. J., van Buchem, M. A., van der Grond, J. and Roos, R. A. C. (2012) 'Early changes in white matter pathways of the sensorimotor cortex in premanifest Huntington's disease', *Human Brain Mapping*, 33(1), pp. 203-212.
- Gholipour, A., Estroff, J. A. and Warfield, S. K. (2010) 'Robust Super-Resolution Volume Reconstruction From Slice Acquisitions: Application to Fetal Brain MRI', *Ieee Transactions on Medical Imaging*, 29(10), pp. 1739-1758.
- Greenspan, H., Oz, G., Kiryati, N. and Peled, S. (2002) 'MRI inter-slice reconstruction using super-resolution', *Magnetic Resonance Imaging*, 20(5), pp. 437-446.
- Holland, D., Kuperman, J. M. and Dale, A. M. (2010) 'Efficient correction of inhomogeneous static magnetic field-induced distortion in Echo Planar Imaging', *Neuroimage*, 50(1), pp. 175-183.
- Honey, C. J., Sporns, O., Cammoun, L., Gigandet, X., Thiran, J. P., Meuli, R. and Hagmann, P. (2009) 'Predicting human resting-state functional connectivity from structural connectivity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6), pp. 2035-2040.
- Iwata, N. K., Kwan, J. Y., Danielian, L. E., Butman, J. A., Tovar-Moll, F., Bayat, E. and Floeter, M. K. (2011) 'White matter alterations differ in primary lateral sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis', *Brain*, 134, pp. 2642-2655.
- Kerbler, G. M., Hamlin, A. S., Pannek, K., Kurniawan, N. D., Keller, M. D., Rose, S. E. and Coulson, E. J. (2013) 'Diffusion-weighted magnetic resonance imaging detection of basal forebrain cholinergic degeneration in a mouse model', *Neuroimage*, 66, pp. 133-141.

- Lazar, M., Weinstein, D. M., Tsuruda, J. S., Hasan, K. M., Arfanakis, K., Meyerand, M. E., Badie, B., Rowley, H. A., Haughton, V., Field, A. and Alexander, A. L. (2003) 'White matter tractography using diffusion tensor deflection', *Human Brain Mapping*, 18(4).
- Manjon, J. V., Coupe, P., Buades, A., Fonov, V., Collins, D. L. and Robles, M. (2010) 'Non-local MRI upsampling', *Medical Image Analysis*, 14(6), pp. 784-792.
- Morgan, P. S., Bowtell, R. W., McIntyre, D. J. O. and Worthington, B. S. (2004) 'Correction of spatial distortion in EPI due to inhomogeneous static magnetic fields using the reversed gradient method', *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 19(4), pp. 499-507.
- Plenge, E., Poot, D. H. J., Bernsen, M., Kotek, G., Houston, G., Wielopolski, P., van der Weerd, L., Niessen, W. J. and Meijering, E. (2012) 'Super-resolution methods in MRI: Can they improve the trade-off between resolution, signal-to-noise ratio, and acquisition time?', *Magnetic Resonance in Medicine*, 68(6), pp. 1983-1993.
- Poot, D. H. J., Jeurissen, B., Bastiaensen, Y., Veraart, J., Van Hecke, W., Parizel, P. M. and Sijbers, J. (2013) 'Super-resolution for multislice diffusion tensor imaging', *Magnetic Resonance in Medicine*, 69(1), pp. 103-113.
- Rousseau, F. and Alzheimer's Dis, N. (2010) 'A non-local approach for image super-resolution using intermodality priors', *Medical Image Analysis*, 14(4), pp. 594-605.
- Scheffler, K. (2002) 'Superresolution in MRI?', *Magnetic Resonance in Medicine*, 48(2), pp. 408-408.
- Scherrer, B., Gholipour, A. and Warfield, S. K. (2012) 'Super-resolution reconstruction to increase the spatial resolution of diffusion weighted images from orthogonal anisotropic acquisitions', *Medical Image Analysis*, 16(7), pp. 1465-1476.
- Van Reeth, E., Tham, I. W. K., Tan, C. H. and Poh, C. L. (2012) 'Super-resolution in magnetic resonance imaging: A review', *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 40A(6), pp. 306-325.
- Vardal, J., Salo, R. A., Larsson, C., Dale, A. M., Holland, D., Groote, I. R. and Bjornerud, A. (2014) 'Correction of B0-Distortions in Echo-Planar-Imaging-Based Perfusion-Weighted MRI', *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 39(3), pp. 722-728.
- Weinstein, D., Kindlmann, G. and Lundberg, E. (1999) 'Tensorlines: advection-diffusion based propagation through diffusion tensor fields', *Proceedings Visualization '99 (Cat. No.99CB37067)*, pp. 249-530.
- Wu, D., Xu, J., McMahan, M. T., van Zijl, P. C. M., Mori, S., Northington, F. J. and Zhang, J. (2013) 'In vivo high-resolution diffusion tensor imaging of the mouse brain', *Neuroimage*, 83, pp. 18-26.

CHAPITRE 5

IRM CELLULAIRE

***In vivo* quantification of magnetically labelled cells by
MRI relaxometry**

Contribution au travail

Pour ce travail, je suis le porteur du projet, et investigateur principal de l'ensemble des résultats obtenus. Ce travail a été initié par Hélène Lajous, stagiaire M2 dans l'équipe, sous l'impulsion de ma directrice de thèse et moi-même. Les résultats préliminaires ont été encourageants et ont initiés la mise en place et la validation d'une nouvelle méthode d'IRM cellulaire. L'entité biologique de l'équipe a permis de décrire au mieux la viabilité des cellules après leur marquage par des nanoparticules. Dans ce travail, Pascal-Henry Fries nous a apporté son expertise dans la théorie de la relaxométrie.

La rédaction s'est faite en collaboration avec ma directrice de thèse Hana Lahrech.

	Conception et design des expérimentations	Mise en place, préparation de l'expérimentation	Acquisition des données	Traitement des données
Figure 2	**	*	*	*
Figure 3	**	*	**	**
Figure 4	**	***	***	***
Figure 5	**	***	***	***
Figure 6	**	***	***	***
Figure 7	***	***	***	***

Ce travail a été soumis au journal CONTRAST MEDIA and MOLECULAR IMAGING

Contexte scientifique

Des travaux effectués dans l'équipe (Selek et al., 2012) avaient montré le potentiel de thérapies cellulaires dans le cadre du glioblastome. Mais comme les résultats obtenus étaient à la limite de la significativité, nous avons pensé qu'il serait utile de disposer d'une méthode IRM qui permettrait de visualiser la distribution de ces cellules au sein et autour de la tumeur. De plus, le développement d'une méthode quantitative s'imposait car plusieurs projets de l'équipe s'orientaient vers des nouvelles stratégies de thérapies cellulaires anti invasion/migration.

C'est dans ce contexte que nous avons proposé puis développé une nouvelle méthode IRM cellulaire basée sur l'acquisition des paramètres de relaxation T_1 , T_2 , T_2^* mesurés d'abord *in vitro* en fonction de la concentration cellulaire pour extraire les zones de linéarité et calculer la relaxivité cellulaire. Les relaxivités cellulaires étaient ensuite utilisées pour convertir les relaxations *in vivo* en concentration cellulaire. Dans ce protocole, une séquence de « White Marker » a été codée à partir d'une séquence existante de Bruker. Le principe de la séquence (Mani et al., 2006) était d'augmenter ou de diminuer le gradient de refocalisation de coupe afin de ne refocaliser que les spins se trouvant dans les champs de susceptibilités générés par les cellules magnétiques, localisant ainsi la présence de cellules marquées par un signal blanc.

Une étude de caractérisation des cellules *in vitro* a permis d'optimiser les conditions d'internalisation des nanoparticules, et aussi de vérifier que la viabilité des cellules n'était pas affectée par le marquage. D'autre part, les résultats IRM ont été validés par microscopie de fluorescence sur les cerveaux fixés.

***In vivo* quantification of magnetically labelled cells by MRI relaxometry**

Ulysse Gimenez¹, Hélène Lajous¹, Michèle El Atifi¹, Marie Bidart¹, Pascal Henry Fries²,
François Berger¹ and Hana Lahrech^{1*}

¹ CLINATEC Translational Technology Lab INSERM U1205, Centre de recherche Edmond
J.Safra, CEA Grenoble, France
17, rue des Martyrs
38054 Grenoble Cedex 9 - FRANCE

² INAC, CEA Grenoble, France
17, rue des Martyrs
38054 Grenoble Cedex 9 - FRANCE

Short title: Magnetically labelled cells quantification by *in vivo* MRI relaxometry

***Corresponding author:**

Hana Lahrech,
hana.lahrech@ujf-grenoble.fr
Phone: +33438784539 Fax: +33438785355
Clnatec-INSERM UA01
17, rue des Martyrs
38054 Grenoble Cedex 9 - FRANCE

Keywords: cellular MRI, cell labelling, iron oxide nanoparticle, *in vivo* relaxometry,
fluorescent microscopy

Abstract

Cellular MRI, which visualizes magnetically labelled cells, is an active research field for *in vivo* cell therapy and tracking. The combined relaxation rates measurements (R_2^* , R_2 , R_1) is the basis of a quantitative cellular MRI method proposed here.

U937 cells were labelled with Molday-Ion-Rhodamine-B, a bi-functional superparamagnetic and fluorescent nanoparticle. The cell viability and proliferation were not affected *in vitro*. *In vitro* relaxometry was performed for U937 cell concentration range of $[2.5 \cdot 10^4 - 10^8]$. These measurements show the existence of complementary cell concentration intervals where these rates vary linearly. The juxtaposition of these intervals delineate a wide cell concentration range over which one of the relaxation rate in the voxel of an *in vivo* image can be converted into an absolute cell concentration. At high cell concentrations the linear regime was found for R_1 in the range of $[10^6 - 2 \cdot 10^8]$, at intermediate concentrations for R_2 in $[2.5 \cdot 10^5 - 5 \cdot 10^7]$, whereas at low concentrations for R_2^* in $[8 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^6]$. *In vivo* relaxometry measurements were performed in a longitudinal study, with labelled U937 cells injected in U87 glioma mouse model. Using *in vitro* data, maps of *in vivo* magnetically labelled U937 concentrations were obtained by converting one of the *in vivo* relaxation rate to cell concentration maps.

MRI results were compared to the corresponding optical images of the same brains, showing the usefulness of our method to accurately follow therapeutic cell biodistribution.

These results demonstrate the potential of our method to quantify magnetically labelled cells in a longitudinal study which is useful to optimize their action.

Introduction

In cellular and molecular MRI, the use of ultrasmall super-paramagnetic iron oxide nanoparticles (USPIO-NPs) as contrast agents has progressively increased in the non-invasive monitoring of various *in vivo* biological processes. USPIO-NPs were firstly used in diagnostic and are popular for microvasculature assessments (1) and infiltrating macrophage activity imaging (2). Due to the recent advances in the development of novel engineered USPIO-NPs, cellular and molecular MRI methods have been developed, providing rich information at micro and nanometer scales. In particular, cellular MRI was found appropriate to track and test the efficiency of new therapeutic stem cells or immune cells. The principle of the cellular MRI is based on *in vivo* injection of cells that are magnetically labelled; their biodistribution is in general visualized using T_2^* weighted MRI sequences which are highly sensitive. The T_2^* parameter depends not only on the magnetic properties of the USPIO-NPs, but also on their numerous physicochemical interactions with cells in their microenvironment. T_2^* is mainly related to the variation of susceptibility gradients (3) and can be drastically reduced to very low values (towards zero) responsible for NMR signal saturation and susceptibility artifacts that are more pronounced when using RF sequences with long echo times ($TE \gg T_2^*$), thereby preventing accurate cell localization and quantification.

However, T_2^* is not the only parameter affected by the presence of USPIO-NPs. The whole NMR signal (intensity, saturation) depends on the characteristics of the magnetically labelled cells at a given magnetic field B_0 and on the used RF sequence. These characteristics are obviously governed by the magnetic properties of the USPIO-NPs, the kind of cellular line and the experimental protocols. They should be known for accurate interpretations.

In order to be suitable for a longitudinal study, here the follow-up of the fate of the magnetically labelled cells, cellular MRI should provide the quantitative biodistribution of the cells at chosen times after their injection. This quantification is challenging. Numerous methods have already focused on *in vivo* quantification using relaxation parameters (4), ultra-

short echo time acquisition (5), phase gradient images (6) or ‘positive contrast’ sequences (7-10). However, these methods were not validated by independent imaging techniques and/or were limited in the range of cell concentration they can detect.

In this study our aim is to develop and validate a new quantitative cellular MRI relaxometry method based on the measurements of the three relaxation rates R_2^* , R_2 and R_1 . The method is combined with the “White Marker” sequence (11, 12) which detects magnetically labelled cell biodistribution by a positive contrast (8).

The method was applied in a glioma mouse model by using human U937 monocytes labelled with Molday Ion Rhodamine B (MIRB), which is a nanoparticle with superparamagnetic and fluorescent bi-modal properties.

MRI quantification of *in vivo* U937 cell concentration was performed in a follow-up study during tumor growth. Optical images were compared to cellular MRI maps to assess and validate the feasibility and the accuracy of the proposed *in vivo* cellular MRI relaxometry method.

Rationale and theory

The proposed method consists of combined measurements of relaxation rates (R_2^* , R_2 and R_1) when cells are magnetically labelled and injected *in vivo*. Magnetically labelled cells are here denoted by a star superscript as cells^{*}.

“Linear variation” regimes

The *in vivo* quantification is based on the *in vitro* measurements of R_2^* , R_2 and R_1 relaxation rates performed on different concentrations of cells^{*} which are embedded in agarose. The idea is to determine from *in vitro* experiments, the transverse and the longitudinal relaxivities of the cells^{*}, called the cellular-relaxivities, referred by $r_{2\text{cell}^*}$, $r_{2\text{cell}^*}$ and $r_{1\text{cell}^*}$ and reflecting the

power of the cells* to accelerate the R_2^* , R_2 and R_1 relaxation rates, respectively. Since the *in vitro* cellular-relaxivities are used for the *in vivo* determinations, their values should be obtained with experimental protocol mimicking the *in vivo* conditions as closely as possible.

The relaxation rates $R_i = 1/T_i$ ($i = 1, 2, 2^*$) were measured *in vitro*. Each relaxation rate R_i shows two distinct apparent regimes vs cell concentration, below and above a specific critical cell concentration (Fig. 1) (13). In the first regime, below the critical cell concentration, the relaxation rate appears constant. During the second regime, above this critical value, it increases linearly with cell concentration. This second regime is called “linear regime”. It holds in an interval delimited by lower and higher bounds $[cell^*_L]_i$ and $[cell^*_H]_i$ respectively. The lower bound corresponds to the lowest concentration of magnetically labelled cells which give a noticeable variation of the relaxation rate whereas the higher bound is the highest concentration of these cells beyond which the rate is too fast to be measured. Both bounds result from the experimental limits of the MRI technique.

In the linear regime, cellular-relaxivities are averaged values over the various NP payloads of the cells*. They depend on the external magnetic field B_0 which is kept constant for all experiments. The change of relaxation rate R_i due to magnetically labelled cells is proportional to their concentration $[cells^*]$ expressed in (number of cells*)/mL. It is given by Eq.1:

$$\Delta R_i = R_i - R_{i0} = r_{icell^*} \cdot [cells^*]; \quad \text{where } i = 1, 2, 2^* \quad [\text{Eq.1}]$$

In Eq.1, R_{i0} is the relaxation rate of the tissue without cells* and r_{icell^*} represents the related cellular-relaxivity. ΔR_i is delimited by its low and high values ΔR_{i-L} and ΔR_{i-H} , respectively. The critical concentration values of the three relaxation rates, and therefore their linearity intervals, are different and specific, but with possible overlapping regions. Their position and length, from which cellular-relaxivities are derived, depend on the used cell line and the kind

of the USPIO-NPs and their initial used quantity. They also vary with the experimental protocol for which the stability of the USPIO-NPs, in particular in term of number of NPs/cells, must be controlled.

Origin of the R_1 and R_2 changes

The tissue region with magnetically labelled cells can be modelled by two compartments, a compartment where water molecules are in contact with USPIO-NPs, i.e., the intracellular water of the magnetically labelled cells, called here intracellular^{*}-space and a compartment where water molecules are not in contact with USPIO-NPs, i.e., water molecules of both the extracellular spaces and intracellular cells of the tissue, called here for simplification the extracellular^{*}-compartment. Each compartment is characterized by its volume fraction and its specific relaxation parameters. At a given magnetic field B_0 , in the limit of a sufficiently fast exchange of the water molecules between the compartments, the measured relaxation rate corresponds to the weighted sum of the contributions of the two compartments. The relaxation rate change is given by:

$$\Delta R_i = f_{\text{intra}^*} \cdot \Delta R_{i,\text{intra}^*} + f_{\text{extra}^*} \cdot \Delta R_{i,\text{extra}^*} \quad [\text{Eq.2}]$$

where $i = 1, 2$ and f_{intra^*} and f_{extra^*} are the volume fractions of the intracellular^{*}-compartment and extracellular^{*}-compartment respectively, and $\Delta R_{i,\text{intra}^*}$ and $\Delta R_{i,\text{extra}^*}$ are the corresponding relaxation rate changes.

At very low cell concentration, i.e., $[\text{cells}^*] \ll [\text{cells}^*_L]_1$ for R_1 and $[\text{cells}^*] \ll [\text{cells}^*_L]_2$ for R_2 , the contribution of magnetically labelled cells to the relaxation rate can be neglected since $R_{i,\text{intra}^*} = R_{i,\text{extra}^*} = R_{i0}$; where R_{i0} is the relaxation rate without labelled cells. In this case:

$$\Delta R_i = 0 \quad [\text{Eq.3}]$$

At sufficiently high concentration, i.e. $[\text{cells}^*] \gg [\text{cells}^*_L]$, it is assumed that the increase of the relaxation rate R_i of the water proton spins is mainly due to their intermolecular outer-sphere dipolar interactions with the magnetic moments of the NPs (14-16). The dipolar

interaction decreases with the distance r between the water molecule, more precisely the water proton spin and the USPIO-NP center as $1/r^3$. Therefore, it can be shown that the contribution of this interaction to the relaxation rate of the protons of the water molecules in the extracellular^{*}-compartment decreases with the cell^{*} diameter d_{cell} as $1/d_{\text{cell}}^p$ with $1 \leq p \leq 3$, depending on the value of the magnetic field (14). It can be neglected with respect to the much larger intra^{*} contribution in $1/d_{\text{NP}}^p$, where d_{NP} is the NP diameter, since d_{NP} of the order of 10 nm is much smaller than the cell^{*} diameter of the order of 10 μm . Therefore, the relaxation rate change is dominated by the contribution of the intracellular^{*}-compartment and Eq.2 simplifies to:

$$\Delta R_i = f_{\text{intra}^*} \cdot \Delta R_{i,\text{intra}^*} \quad [\text{Eq.4}]$$

The relaxation rate change ΔR_i is proportional to the cell^{*} concentration as f_{intra^*} is.

Origin of the R_2^* change

In the presence of cells^{*}, the origin of the R_2^* change is due to the water diffusion in the gradient of magnetic field due to the difference of magnetic susceptibility of the cells^{*} with respect to their extracellular environment. It is mainly due to water of the extracellular^{*}-compartment (3).

This effect was widely described and recognized proportional to the amplitude ΔB_0 of the local magnetic field variations:

$$\Delta R_2^* = \gamma \cdot \Delta B_0 / 2 \quad [\text{Eq.5}]$$

Equation 5 shows that with increasing magnetic field gradients, ΔR_2^* tends towards a high value which can be responsible of NMR signal saturation. The origin of the signal change is complex since it is not directly due to the signal of the intracellular^{*}-compartment water. However, several studies have shown that R_2^* varies linearly with the concentration of USPIO-NP labelled cells for a particular range of concentration (5, 17).

Results

The *in vitro* characterization of the labelled cells is shown in Fig. 2. The efficiency of the uptake of MIRB USPIO-NPs by U937 cells was measured by flow cytometry (Fig. 2A). It increases with incubation duration and reaches 100 % for labelling duration of 20 hours for MIRB concentration of 15 µg Fe/ml. These conditions were used in the rest of the study. Confocal images of Fig. 2B confirm the presence of the USPIO-NPs inside the cells. The U937* proliferation (Fig. 2C) and cell viability using MTT test (Fig. 2D) are compared between U937* and U937 cells. These two *in vitro* studies do not show any significant perturbation due to USPIO-NPs, demonstrating that the proliferation capacity as well as the cell viability of U937* are both preserved as already observed in other cell lines (18). The MRI relaxation results on agarose phantoms of different cell* concentrations maintained at 37 °C are shown in Fig. 3. A clear increase of the three relaxation rates R_1 , R_2 , and R_2^* is observed for cell* concentration increase with different linearity intervals. For all relaxation rates, the critical concentration values, and therefore the linearity interval, are clearly defined and given by:

$$[[\text{cell}^*_{L}]_1 - [\text{cell}^*_{H}]_1] = [1.10^6 - 2.10^8] \text{ cells/mL, for } R_1$$

$$[[\text{cell}^*_{L}]_2 - [\text{cell}^*_{H}]_2] = [2.5.10^5 - 5.10^7] \text{ cells/mL, for } R_2$$

$$[[\text{cell}^*_{L}]_{2^*} - [\text{cell}^*_{H}]_{2^*}] = [8.10^4 - 5.10^6] \text{ cells/mL, for } R_2^*$$

From these intervals, the cellular* -relaxivities were calculated and found to be equal to $r_{1\text{cell}^*} = 1.39 \cdot 10^{-11} \text{ mL.s}^{-1}$, $r_{2\text{cell}^*} = 1.67.10^{-9} \text{ mL.s}^{-1}$, $r_{2^*\text{cell}^*} = 1.52 \cdot 10^{-8} \text{ mL.s}^{-1}$. The different linearity intervals are reported on the color scrollbar illustrating the U937* cell concentrations. Therefore, the values of R_2^* , R_2 , and R_1 are suitable for the determination of low, intermediate, and high cell* concentrations, respectively.

The method to quantify U937* cells *in vivo* is illustrated in Fig. 4. Typical T_{2w} image, White Marker image, T_2^* , T_2 and T_1 maps used in the experimental protocole (here at day 14 after U937* injection) are presented. As explained in the Experimental section, the region of interest (ROI) containing the U937* cells is delineated on White Marker image. The U937* cell concentration is then quantified on the basis of T_2^* , T_2 or T_1 measurements, and overlaid on anatomical image. This quantification was performed for each mouse in a longitudinal study.

For a typical mouse, Fig. 5 shows a follow-up of U937* biodistribution and quantification before U937* injection and at selected days 1, 4, 8, 11 and 14 after U937* injection. At each selected day, three slices are presented around the U937* cell injection site which is identical to the U87 cell injection site. The progressive dilution and diffusion of U937* cells (from red to blue color) around the U87 tumor is clearly quantified during this longitudinal study. We can observe the behavior of the U937* therapeutic cells during the tumor growth. They tend to surround the tumor as seen at day eleven.

For a typical mouse, the image sum of the U937* cell concentrations is defined in the Experimental section and yields U937* sum maps presented in Fig. 6, showing a general dilution in the brain in the course of time (Fig. 6A). For a given mouse, the image sum of U937* cell concentrations is obtained pixel/pixel by adding , the cell concentrations measured from all slices. Knowing the volume of each voxel, the number of cells is then easily calculated. As a first remark, the mean of the total number of U937* cells decreases versus time (Fig. 6B), this is probably due to cell division or biodistribution dilution, i.e. the existence of pixels with $[U937^*] \ll [U937^*_{L_i}]$, $i = 1, 2, 2^*$, resulting in smaller amounts of UPSIO-NPs which became undetectable with our technique. Just after cell injection, at day 1, the mean of the total number of U937 cells ($n = 4$) is around $5.6 \cdot 10^5$ cells, a value very closed to the quantity of U937* cells injected (5.10^5) validating the measures. Fluorescent microscopy analysis, reported in Fig. 7, confirms the presence of Rhodamine B fluorescence

in areas of U937* cell biodistribution. Results of fluorescent red cell density corroborate those from MRI cell concentration. In fact, high and low U937* concentrations visualized in MRI maps by red and blue colors correspond in optical images to regions of high and low red fluorescence density, respectively. In the region of low and high U937 concentration, the mean estimated concentration equals $2.51 \cdot 10^2$ and $2.55 \cdot 10^4$ cells/mL, respectively, and the mean fluorescence intensity equals 2614 and 7068 (without unit), respectively. This result shows a non-linear behaviour of fluorescence versus the number of U937* cells, and rejects the use of fluorescence as a quantitative validation of the MRI method. However, note that the regions without U937* cells on MRI maps appear without any red fluorescence. Optical analysis qualitatively validates the principle of the cellular MRI relaxometry method proposed here since the regions with high and low U937* cell concentrations clearly match with the intensities of red fluorescence in optical images.

Discussion

In this study, a new *in vivo* MRI method for measuring the concentration of magnetically labeled cells has been described and validated in the case of a glioma model through comparison with fluorescence intensities. The method is based on the measurements of the voxel relaxation rates R_2^* , R_2 or R_1 which are gauged with respect to prior *in vitro* determination of the corresponding relaxivities, *i.e.*, the slopes of these rates as a function of the concentration of the magnetically labelled cells. The U937* cell imaging shows the distribution of therapeutic cells around the tumor. The role of this work is not to evaluate the therapeutic effects of U937* cells on the U87 model, but to show the potential of our method to observe the fate of therapeutic cells in longitudinal monitoring.

The use of ‘Positive contrast’ sequences was largely developed in the last years to track USPIO-NPs labelled cells with the advantage of a better contrast to noise ratio, and to avoid the uncertainty origins of signal loss. These sequences make use of the local magnetic field susceptibilities due to USPIO-NPs (19). Off Resonance imaging (7), Magnetic field perturbations (9) or Quantitative Susceptibility Mapping (10) were used before, but did not demonstrate the ability to quantify USPIO-NPs labelled cells over a wide range of concentration and were not validated by another imaging technique. However, the White Marker sequence gives a positive contrast related to the presence of USPIO-NPs (20) and was used for *in vivo* protocol to delineate areas containing labelled cells and avoid USPIO-NPs overestimation given by T_2^* (21).

Here, optical imaging served to confirm the presence of the USPIO-NPs chosen to be not only super-paramagnetic, but also fluorescent. The fluorescence of the brain regions containing the labelled cells increases with the cell concentration, but cannot give real quantification of these cells. Note that techniques such as ICP-MS (inductively coupled

plasma mass spectroscopy), which are used for cell quantification, cannot be transferred to imaging. However, iron quantification with X-ray fluorescence imaging (22) and Fe-59 activity measurements using radioactivity counter (23) are two modalities which could be considered for robust validation of the present MRI method.

Here, since the cell quantification is indirect, several issues can arise. In the case of cell proliferation during the longitudinal study, U937* cells share their iron load when dividing. In order to compare the relaxivity of cells* before and after a cell division, two *in vitro* measurements are required. The first one on an amount of N cells* having a given q value of iron load/cell* and the second one, repeated 24 hours later when cells were divided, i.e. on 2N cells* with q/2 iron load/cell*. The two experiments were performed for intermediate cell concentrations of [2.5 10⁴, 5 10⁴, 10⁵, 2.5 10⁵, 5 10⁵, 10⁶] cells/mL and focused on the R₂ parameter. Results for both experiments were similar, showing that this parameter is insensitive to cell division. Thus, knowing the period of cell division, cell concentration correction due to cell division is straightforward.

In general, the sum of U937* cells decreases with the time, but we can also observe cell accumulation in typical regions. Therefore, due to the high sensitivity of the proposed method to quantify a large range of cell concentrations, longitudinal study was carried out over two weeks.

The method for *in vivo* cell* concentration quantification proposed here is based on *in vitro* measurements. Here, cell culture, phantom preparations and MRI measurements are factors which may cause uncertainty in the definition of cellular-relaxivities. Experimentally, the differences between two sets of *in vitro* measured values were shown of the order of 15% (data not shown). This uncertainty is transmitted to the *in vivo* quantification.

In a longitudinal study, physicochemical and physiological processes as cell division, exocytose, or USPIO-NPs degradation that can occur *in vivo* should affect the relaxation measurements and thereby the accuracy of cell* quantification. These processes depend on the nature of cells and on the properties of the USPIO-NPs. Here, exocytose process or internalization by host microglial cells as well as USPIO-NPs degradation are assumed negligible, since U937 keeps the nanoparticles because of its high phagocytosis capacity as a macrophage.

Conclusion

We propose a new relaxometry method for quantitative cellular MRI. Based on robust *in vitro* relaxometry measurements at different magnetically labelled cell concentrations, *in vivo* U937* cell concentration quantification was obtained over a large range of cell concentrations from $8 \cdot 10^4$ to $2 \cdot 10^8$ cells/mL. Fluorescence microscopy on the same fixed brains corroborates the MRI results. To conclude, the concentration of magnetically labelled cells, at high, medium, and low cell concentration, can be accurately determined *in vivo* over a large range by using the three relaxation rates R_2^* , R_2 , and R_1 , respectively.

Experimental

Subject and Method

U937 cells: U937 cells a biomedical model of cell line, were used and labelled *in vitro* with the USPIO-NPs Molday ION Rhodamine BTM (MIRB) from Biopal company (Worcester, MA, USA). Due to the presence of the Rhodamine B, MIRB, in addition to their magnetic properties, are also fluorescent and used in optical analysis.

U937 cells were chosen for their ability to easily phagocytose USPIO-NPs and also because they adopt the morphology and characteristics of mature macrophages, which have great potential for treatment of many degenerative diseases.

Cell labelling: U937 cells were incubated 20 hours in culture media (RPMI 1640 with 10% FCS) supplemented with MIRB (15 µg Fe/ml), and collected by centrifugation, 5 minutes at 600 rpm. Then the cells were washed with large volumes of PBS to get rid of all not-internalized particles. Intracellular USPIO-NPs distribution was evaluated with confocal microscopy and labelling efficiency was estimated with flow cytometry analyses. The U937 labelled cells, referred here to U937*, were characterized *in vitro* to evaluate the effects of USPIO-NPs on U937* cells. The viability as well as the proliferative capacity were studied with MTT assay and regular cell counting in comparison with unlabelled U937 cells.

Phantom preparation: The uniform gel suspensions were prepared with 1% agarose low gelling temperature (Sigma St. Quentin Fallavier France) mixed with serum free RPMI culture medium, and then heated up to 50°C. The contents were cooled to a temperature of 37°C just before addition of cells. The resultant mixture was placed in 1.7 mm diameter tubes for NMR and quickly cooled to ambient temperature to the gelling of agarose to prevent the sedimentation of the cells, and then replaced at 37°C. Samples at different U937 and U937* cell concentrations (number of cells/ml) were prepared: {5 10⁴, 10⁵, 5 10⁵, 10⁶, 5 10⁶, 10⁷, 5

10^7 , 10^8 } for T_2 and T_1 measures, and $\{2 \cdot 10^4, 5 \cdot 10^4, 1 \cdot 10^5, 2 \cdot 10^5, 5 \cdot 10^5, 1 \cdot 10^6\}$ for T_2 and T_2^* measures.

Animal model: U87 glioma mouse model was used. Six week old female nude mice ($n = 4$) were injected with $5 \cdot 10^5$ U87 cells which were Green Fluorescent Protein (GFP) encoded (U87-GFP) ($1 \mu\text{L}/\text{min}$, volume = $3\mu\text{L}$) in the right striatum (Bregma level, 2 mm right, 2.5 mm depth) under 3% isoflurane in air. After 2 weeks of tumor growth, intracerebral injection of $5 \cdot 10^5$ U937* cells ($1 \mu\text{L}/\text{min}$, volume = $3\mu\text{L}$) was performed at the site of tumor cell injection. The tumor growth was monitored *in vivo* every week using T_2 -weighted MRI.

MRI acquisitions: Experiments were performed at 4.7 T (Bruker, 600 mT) *in vitro*, and *in vivo* before and after U937* injection and at days 1, 4, 8, 11 and 14. For the *in vitro* study, the phantoms were maintained at 37°C to be similar to *in vivo* conditions. T_2 -weighted images for anatomical contrast were acquired with TurboRARE sequence (TE/TR = 10/2500ms). Quantitative T_2^* , T_2 and T_1 maps were acquired using multi-gradient echo (MGE, TR/TE = 1500/3.7 ms), multi-slice-multi echos (MSME, TE = 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120 ms, TR = 2500 ms) and RARE (TE = 10 ms, TR = 4000, 2700, 1700, 1200, 800, 400 ms) sequences respectively. In addition and in order to accurately delimit regions occupied by U937* cells, White Marker sequence was used; it consists of Gradient Echo sequence (TE = 6 ms, TR = 150 ms) with slice gradient rephasing variation of 30 or -30% from regular intensity based on previous. The mean of both images is the White Marker image. The field of view (FOV) and the spatial resolution were set to $15 \times 15 \times 64 \text{ mm}^3$ and $100 \times 100 \times 700 \mu\text{m}^3$ respectively, with a total acquisition duration of 1 hour. Note that White-Marker imaging applies since the voxel size is significantly larger than the U937 size of about $17 \mu\text{m}$ (24). The data analysis and map reconstructions were achieved using homemade Matlab software.

Fluorescence microscopy As MIRB were fluorescent with Rhodamine B (red color) and U87 cells were GFP encoded (green color), optical analysis were performed to visualize the U937* biodistribution within tumor. After MRI acquisitions, the brains were fixed by transcardiac

perfusion of a 4% paraformaldehyde solution in phosphate buffered saline. They were extracted from the skulls and 350 μm thick coronal brain slices were cut using a vibratome (V1000S, Leica) and stored at 4°C. Images of the whole coronal brain slices were acquired with a multi-zoom AZ100 Nikon microscope using a wide-field CCD camera (Orca R2, Hamamatsu). Images of green fluorescence, red fluorescence, and under oblique light illumination were combined in composite image using ImageJ software.

Cell* relaxivities The sensitivity of the relaxation parameters to a given cell* concentration is assessed *in vitro* by the measure of R_i with $R_i = 1/T_i$, $i = 1, 2, 2^*$. When the relaxation rate variation versus U937* cell concentration is linear, it is the linear regime described previously where cell* relaxivity is defined by $r_{\text{cell}^*} = R_i / [\text{U937}^*]$, where $[\text{U937}^*]$ is the U937* cell concentration in cells/mL. From *in vitro* measurements, cell* relaxivity is measured using a linear fitting applied in the R_i linear intervals. This interval is determined by the user by identifying the two concentration values defined previously: $[\text{U937}^*_{\text{L}}]_i$ and $[\text{U937}^*_{\text{H}}]_i$.

In vivo U937* quantification Thereby, once the ranges of linear relations are defined, *in vivo* maps of cell* concentration can be obtained. Practically, MRI acquisition is registered to the same acquisition performed before U937* cells implantation. A homemade segmentation tool is used on White Marker images to manage severe loss of signal due to USPIO-NPs. Segmented images are registered to the acquisition without U937* cells. The U937* quantification is then calculated with homemade Matlab program, only in the area manually delineated on White Marker images. ΔR_{2^*} , ΔR_2 and ΔR_1 are evaluated for each pixel after a one-pixel-width Gaussian blurring to decrease partial volume effects.

For a given pixel p, if one of the relaxation rate ΔR_i is in the ‘linear interval’, the U937* cell concentration is calculated according to:

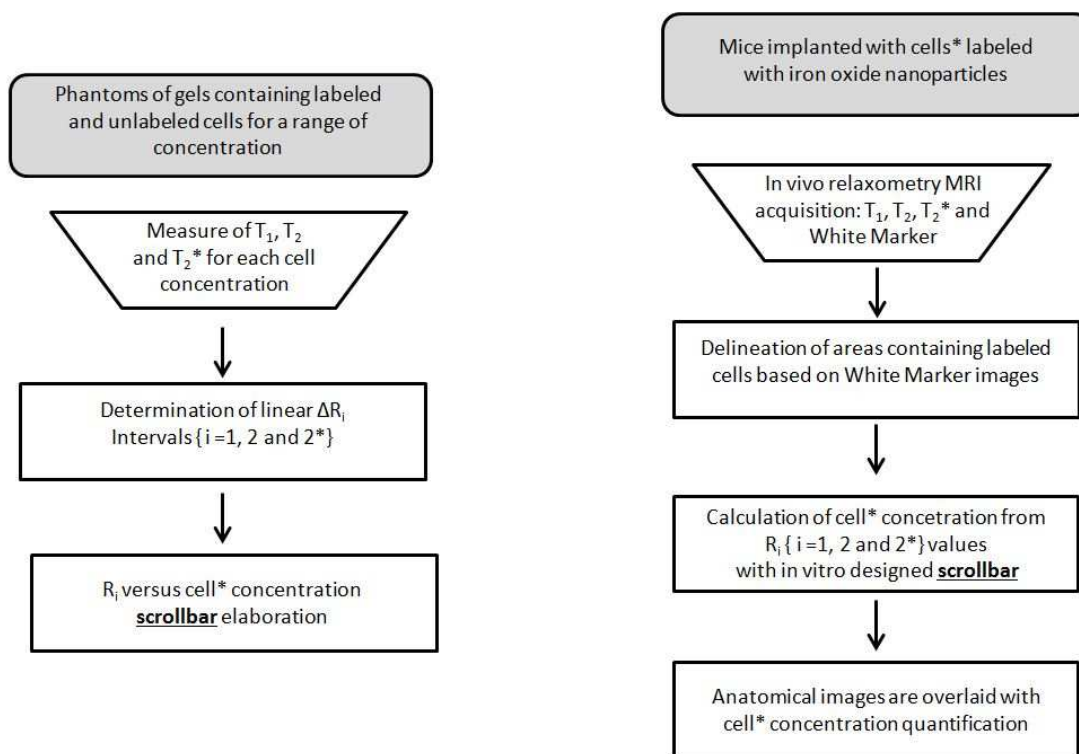
$$[\text{U937}^*]_p = \Delta R_{kp} / r_{k\text{U937}^*}; \quad \text{where } k \text{ is one of } \{1, 2, 2^*\} \quad [\text{Eq. 6}]$$

where ΔR_{kp} is the relaxation rate change ΔR_{1p} , ΔR_{2p} or ΔR_{2^*p} which verifies: $\Delta R_{k-L} < \Delta R_{kp} < \Delta R_{k-H}$ and r_{cell^*} is the corresponding cellular-relaxivity.

Consequently, the value of the calculated $[U937^*]_p$ is of course in the range of $[[U937^*_L]_k - [U937^*_H]_k]$. If two measured relaxations rates fulfill this condition because of the overlap of two linearity intervals, we choose to select the relaxation rate change with the higher cellular-relaxivity. If none fulfills this condition, the $U937^*$ concentration value is set to 0.

The image sum of $U937^*$ cell concentrations is obtained by adding the $U937^*$ concentration values of the various voxels located in the contiguous slices and having the same 2D coordinates. This image sum is represented by a single $U937^*$ coronal map for each mouse. Knowing the volume of each voxel, the total number of $U937^*$ cells for each pixel p is obtained by: $([cell^*]_p \times \text{pixel surface} \times \text{slice tickness})$.

In the Annexe, the flowchart of the method principle is presented. $U937^*$ cells biodistribution is firstly delineated on White Marker image. Then, *in vivo* quantitative $U937^*$ cell concentration mapping consists in checking for each pixel if one of the three relaxation rate changes (ΔR_2^* , ΔR_2 and ΔR_1) matches with at least one of the three linearity interval and to convert its value to $U937^*$ cell concentration allowing to Eq.6 using the corresponding cellular*relaxivities



Annexe. Operating diagram of the cellular MRI method

Acknowledgements

The financial support of the Comité Isère 2013 of the Ligue contre le Cancer is greatly appreciated. The authors are grateful to Vincent Auboiron for technical assistance in the set-up of the *in vivo* MRI experiments. The authors acknowledge the assistance of cytometry platform of Grenoble CHU and Pierre Champelonier for technical assistance in the flow cytometry acquisitions.

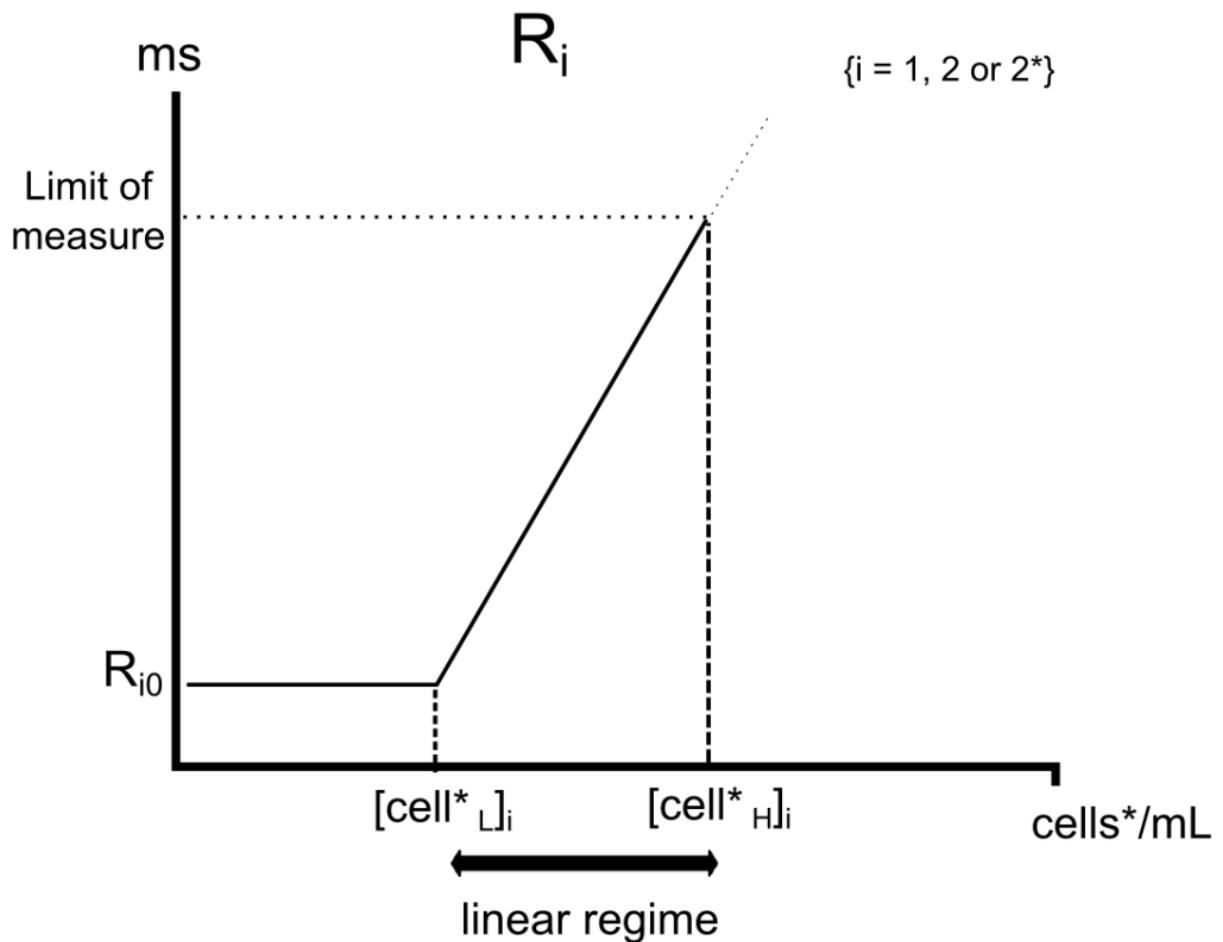
Figures

Figure 1. Schematic relaxometry rate R_i behavior versus magnetically labelled cells ($cells^*$) concentration. For each R_2^* , R_2 and R_1 two apparent regimes exist. In the first one, the relaxation rate appears constant and equals R_{i0} . In this regime, characterized by low $cell^*$ concentration, the relaxation rates R_i are still insensitive. The second regime is linear and starts from $[cell^*_L]_i$ to $[cells^*_H]_i$. Of course for each relaxation rate corresponds a specific range of $[cells^*]$ defining the linear regime.

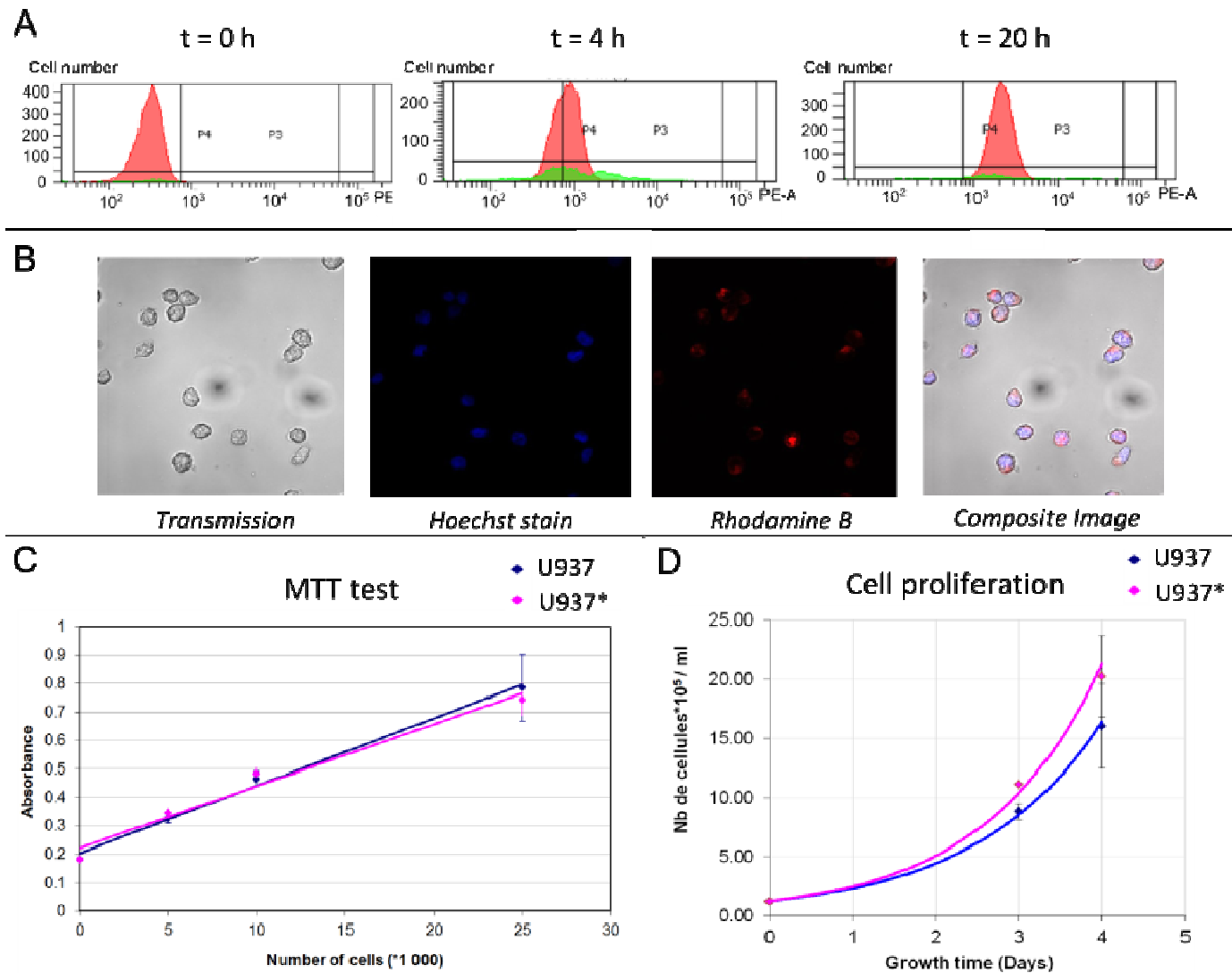


Figure 2. U937 labelling characterization. (A) Histograms of Phycocerythrin (PE) fluorescence intensity versus the number of U937* in logarithmic scale obtained by cytometry for three incubation durations with MIRBat $t = 0$ hour, $t = 4$ hours and $t = 20$ hours, The PE emission spectra corresponds to Rhodamine B emission, and the vertical line is the threshold of U937* cells fluorescence differentiating U937 and U937* cells. The green plot corresponds to cells rejected from the study due to their granularity. (B) Confocal microscopy of U937* cells fixed with 4% PFA, after an incubation of 20 hours. U937* nucleus are labelled with Hoechst stain which is a blue fluorescent dye. The composite image is the overlaid of the three images showing the internalization of MIRB USPIO-NPs by U937 cells. (C) and (D) Comparison between U937 and U937* cells under the same cell culture conditions at 20 hours

incubation with MIRB USPIO-NPs, (D) of cell proliferation (C) and cell viability using the MTT test which was evaluated with a colorimetric assay.

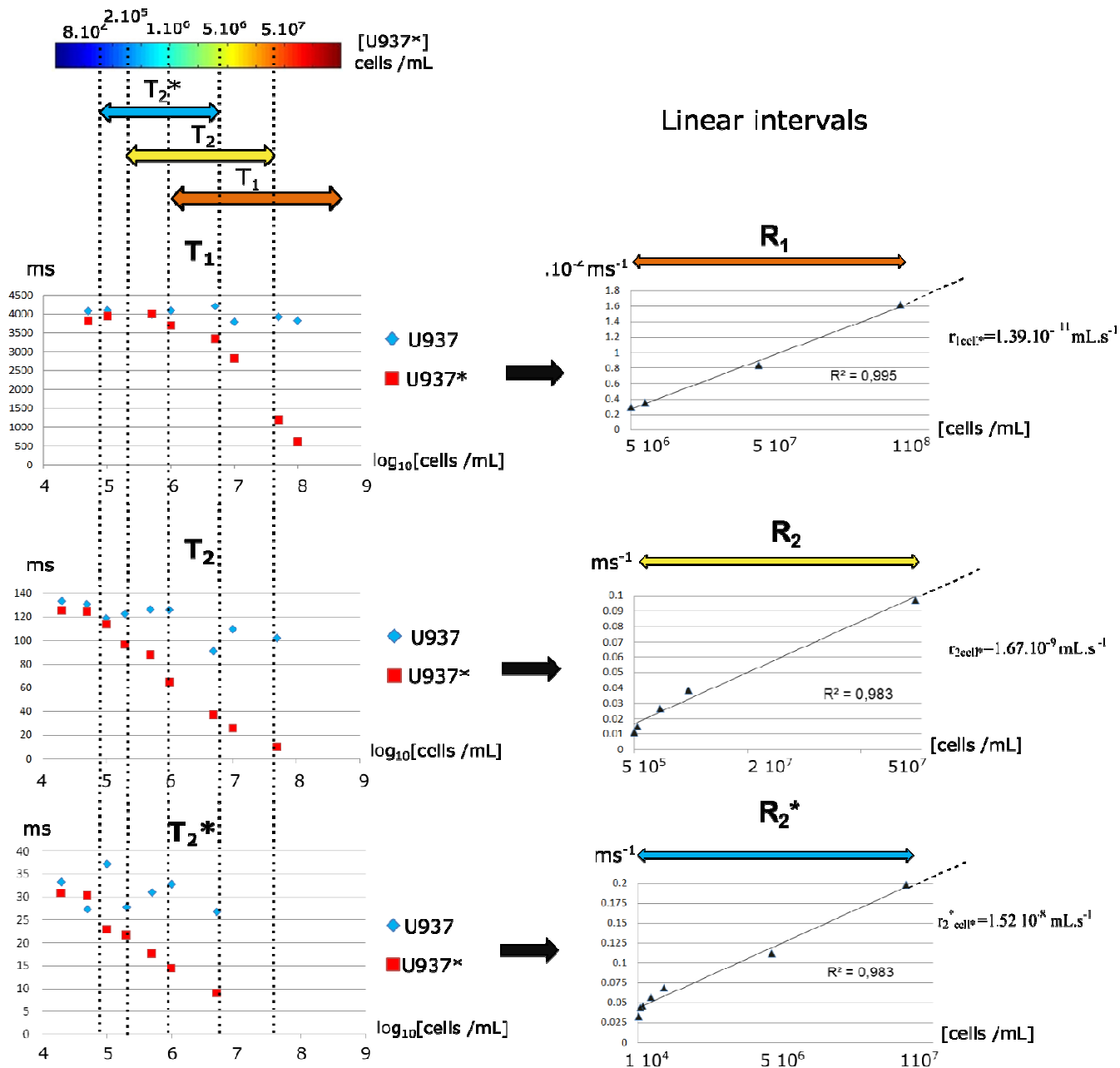


Figure 3. *In vitro* relaxometry of U937 and U937* cells. T_2^* , T_2 and T_1 were plotted versus cell concentrations displayed on a logarithmic scale. Each relaxation rate express a linear behavior for a given range of cell concentration for which the cellular-relaxivities are defined. The exploitation of the relaxation parameters gives a tool to detect and quantify a wide range of cell concentration ($[U937^*]$ from $2 \cdot 10^4$ to $1 \cdot 10^8$ cells/mL). The measurements using agarose gels were performed at 37°C to mimic the *in vivo* conditions.

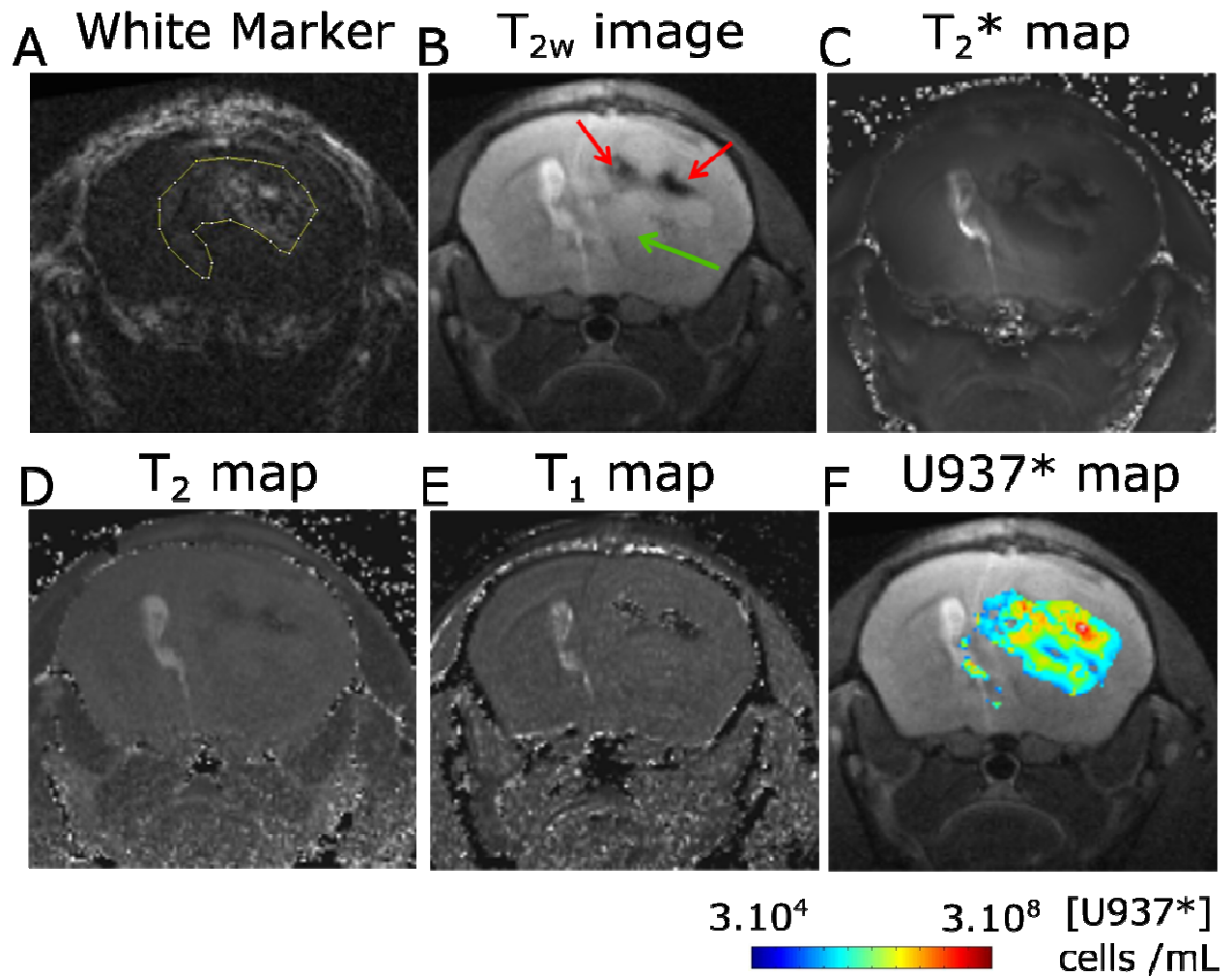


Figure 4. Multiparametric MRI and U937* cell concentration map of a typical mouse 14 days after U937* injection. T₂* map, T₂ map and T₁ map are used to calculate U937* cells concentration in ROIs delineated on White Marker image. T_{2w} anatomical coronal image shows the U87 tumor (green arrow), and the presence of highly concentrated U937* cells (red arrows). The U937* map is overlaid on T_{2w} image.

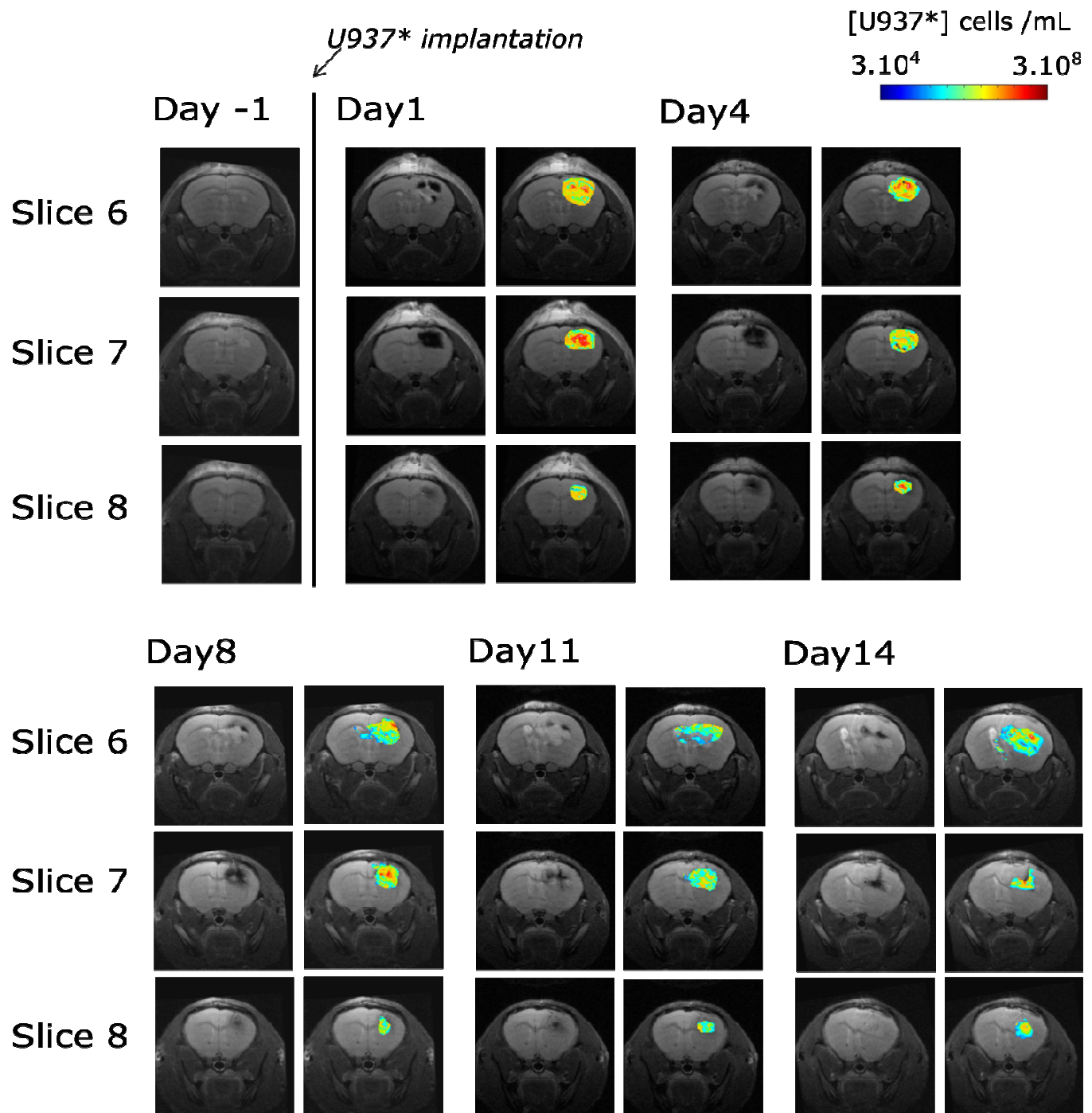


Figure 5. T_{2w} images and U937* maps overlaid on T_{2w} image showing an *in vivo* follow up of U937* cells distributions from one typical mouse. Three consecutive coronal slices around the U87 and U937* cell injections site are shown. We can observe that U937* concentration varies from high value (Day 1) to lower values (Day 14) showing a progressive dilution of U937* cells.

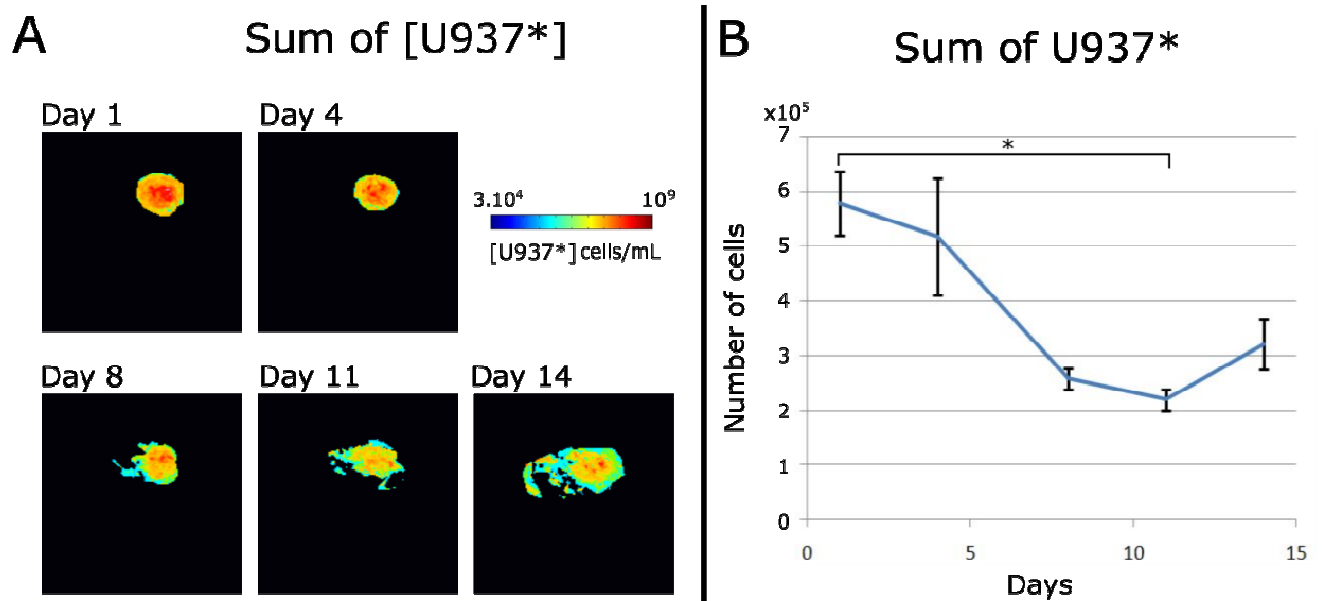
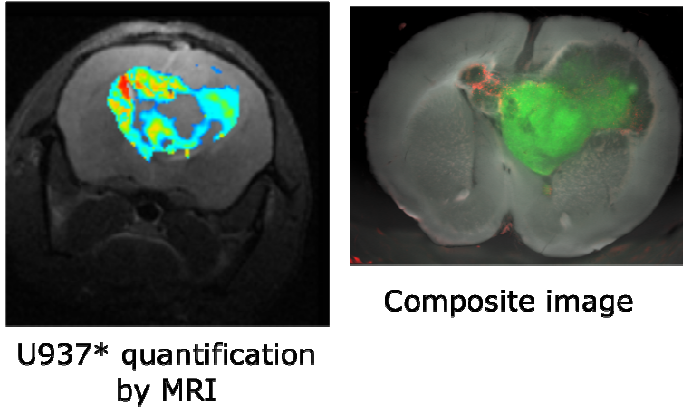


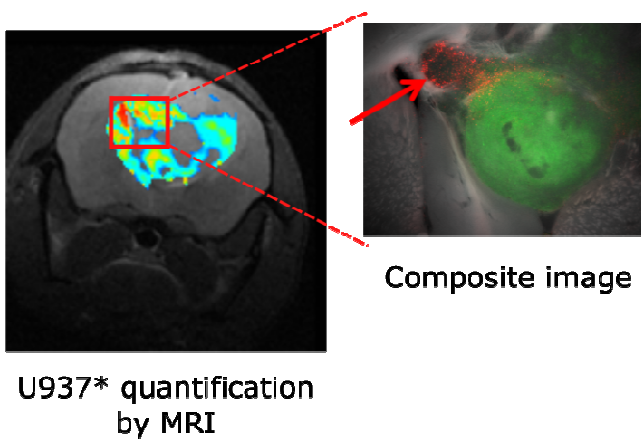
Figure 6. (A) Series of image sum of U937* cell concentration at different days after U937* injection, for one typical mouse. We can see a progressive dilution and diffusion of the U937* cells. (B) The mean of U937* cell sum ($n = 4$). is plotted for each day. As expected, at day 1, the number of U937* correspond to the number of injected U937*. A decrease of the U937* cell number is shown until the half of initial value on the day 14. Error bars represent the standard error of mean, and the U937* cells variations were tested by Welch's t-test (* $p < 0.05$).

$3 \cdot 10^4$ $3 \cdot 10^8$
[U937*] cells /mL

A
whole slice



B
High U937* concentration



C
Low U937* concentration

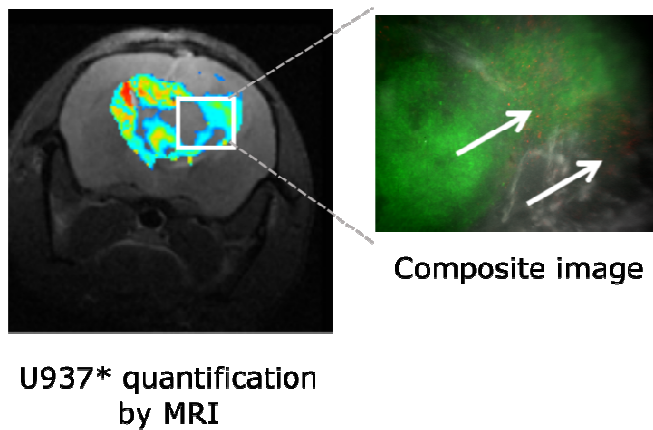


Figure 7. (A) Comparison between U937* cells MRI map and fluorescence microscopy overlaid on image obtained under oblique light illumination. Green fluorescence of U87 GFP cells and red fluorescence of the MIRB USPIO-NPs are displayed on image acquired under white light illumination. In (B) we see that area of high U937* concentration estimation (red box) corresponds to strong red fluorescence (red arrow) whereas in (C) we see that low U937* concentration quantification (white box) corresponds to low red fluorescence (white arrow).

References

1. Kim S-G, Harel N, Jin T, Kim T, Lee P, Zhao F. Cerebral blood volume MRI with intravascular superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Nmr Biomed*. 2013;26(8):949-62
2. Corot C, Robert P, Idee J-M, Port M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58(14):1471-504.
3. Rosen BR, Belliveau JW, Aronen HJ, Kennedy D, Buchbinder BR, Fischman A, et al. SUSCEPTIBILITY CONTRAST IMAGING OF CEREBRAL BLOOD-VOLUME - HUMAN-EXPERIENCE. *Magn Reson Med*. 1991;22(2):293-9
4. Kircher MF, Allport JR, Graves EE, Love V, Josephson L, Lichtman AH, et al. In vivo high resolution three-dimensional imaging of antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte trafficking to tumors. *Cancer Res*. 2003;63(20):6838-46.
5. Liu W, Dahnke H, Rahmer J, Jordan EK, Frank JA. Ultrashort T-2* Relaxometry for Quantitation of Highly Concentrated Superparamagnetic Iron Oxide (SPIO) Nanoparticle Labeled Cells. *Magn Reson Med*. 2009;61(4):761-6.
6. Wang L, Potter WM, Zhao Q. In vivo quantification of SPIO nanoparticles for cell labeling based on MR phase gradient images. *Contrast Media Mol. Imaging*. 2015;10(1):43-50.
7. Suzuki Y, Cunningham CH, Noguchi KI, Chen IY, Weissman IL, Yeung AC, et al. In Vivo Serial Evaluation of Superparamagnetic Iron-Oxide Labeled Stem Cells by Off-Resonance Positive Contrast. *Magn Reson Med*. 2008;60(6):1269-75.
8. Brisset JC, Sigovan M, Chauveau F, Riou A, Devillard E, Desestret V, et al. Quantification of Iron-Labeled Cells with Positive Contrast in Mouse Brains. *Mol. Imaging Biol*. 2011;13(4):672-8.
9. Mills PH, Hitchens TK, Foley LM, Link T, Ye Q, Weiss CR, et al. Automated detection and characterization of SPIO-labeled cells and capsules using magnetic field perturbations. *Magn Reson Med*. 2012;67(1):278-89.
10. Wong R, Chen XY, Wang Y, Hu XB, Jin MM. Visualizing and Quantifying Acute Inflammation Using ICAM-1 Specific Nanoparticles and MRI Quantitative Susceptibility Mapping. *Ann Biomed Eng*. 2012;40(6):1328-38.
11. Seppenwoolde JH, Viergever MA, Bakker CJG. Passive tracking exploiting local signal conservation: The white marker phenomenon. *Magn Reson Med*. 2003;50(4):784-90.
12. Mani V, Briley-Saebo KC, Itskovich VV, Samber DD, Fayad ZA. GRAdient echo Acquisition for Superparamagnetic particles with positive contrast (GRASP): Sequence characterization in membrane and glass superparamagnetic iron oxide phantoms at 1.5T and 3T. *Magn Reson Med*. 2006;55(1):126-35.
13. Girard OM, Ramirez R, McCarty S, Mattrey RF. Toward absolute quantification of iron oxide nanoparticles as well as cell internalized fraction using multiparametric MRI. *Contrast Media Mol. Imaging*. 2012;7(4):411-7.
14. Ayant Y, Belorizky E, Alizon J, Gallice J. CALCULATION OF SPECTRAL DENSITIES FOR RELAXATION RESULTING FROM RANDOM MOLECULAR TRANSLATIONAL MODULATION OF MAGNETIC DIPOLAR COUPLING IN LIQUIDS. *Journal De Physique*. 1975;36(10):991-1004.
15. Gillis P, Roch A, Brooks RA. Corrected equations for susceptibility-induced T-2-shortening. *J Magn Reson*. 1999;137(2):402-7.
16. Fries PH. Two-particle random walk simulation of outer-sphere nuclear relaxation. *J. Chem Phys* 2010;132(22).
17. Schweiger C, Hartmann R, Zhang F, Parak WJ, Kissel TH, Rivera Gil P. Quantification of the internalization patterns of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with opposite charge. *J Nanobiotechnology*. 2012;10.
18. Addicott B, Willman M, Rodriguez J, Padgett K, Han DM, Berman D, et al. Mesenchymal stem cell labeling and in vitro MR characterization at 1.5 T of new SPIO contrast agent: Molday ION Rhodamine-B (TM). *Contrast Media Mol. Imaging*. 2011;6(1):7-18.
19. Vonken E, Schar M, Yu J, Bakker CJG, Stuber M. Direct in vitro comparison of six three-dimensional positive contrast methods for susceptibility marker imaging. *J Magn Reson Imaging*. 2013;38(2):344-57

20. Mani V, Briley-Saebo KC, Hyafil F, Fayad ZA. Feasibility of in vivo identification of endogenous ferritin with positive contrast MRI in rabbit carotid crush injury using GRASP. *Magn Reson Med.* 2006;56(5):1096-106.
21. Terrovitis J, Stuber M, Youssef A, Preece S, Leppo M, Kizana E, et al. Magnetic resonance imaging overestimates ferumoxide-labeled stem cell survival after transplantation in the heart. *Circulation.* 2008;117(12):1555-62.
22. Zheng WL, Nichol H, Liu SF, Cheng YCN, Haacke EM. Measuring iron in the brain using quantitative susceptibility mapping and X-ray fluorescence imaging. *Neuroimage.* 2013;78:68-74.
23. Raabe N, Forberich E, Freund B, Bruns OT, Heine M, Kaul MG, et al. Determination of liver-specific $r(2)^*$ of a highly monodisperse USPIO by Fe-59 iron core-labeling in mice at 3 T MRI. *Contrast Media & Molecular Imaging.* 2015;10(2):153-62
24. Opydo-Chanek M., Stojak M., Mazur L., Niemeyer U. Changes in the size of U937 cells following exposure to new generation oxazaphosphorines. *Acta Biologica.* 2010;52 :25-29

PERSPECTIVES ET FUTURS TRAVAUX

A ce jour, des thérapies anti-invasion/migration n'existent pas en clinique. Leur développement serait une grande avancée dans le traitement du cancer et permettrait de lutter contre la propagation des glioblastomes.

Plusieurs approches sont discutées pour lutter contre la migration des cellules tumorales. Des molécules candidates sont proposées grâce à la recherche fondamentale en biologie, qui peuvent notamment interagir avec les intégrines, des récepteurs d'adhésion cellulaire qui jouent un rôle important dans la migration (Dimitropoulos et al., 2010). Des stratégies de traitement sont aussi imaginées au sein de notre équipe : la modification de la matrice extracellulaire par des matrigels plus ou moins permissifs à la migration permettrait de piéger les cellules tumorales, tandis que l'utilisation de cellules pérycites pourrait entraver les voies de migration et contenir les cellules tumorales dans la zone tumorale.

Ces stratégies auraient besoin d'être testées sur l'animal avant leur transfert en clinique. Or, nous avons montré que grâce aux algorithmes de SR, l'imagerie microscopique 3D DTI, biomarqueur de la migration des cellules tumorales, pourrait être obtenu sur le modèle Glioblastome *in vivo*. Ainsi, notre modèle Glioblastome associé à l'imagerie de diffusion SR constitue un outil pertinent pour répondre à ce type de problématique.

De la même manière, des thérapies développées sur le modèle de souris MAP6-KO au sein de l'équipe « Physiopathologie du cytosquelette » pourront aussi être évaluées *in vivo*, dans un suivi longitudinal, pour étudier leurs effets et impacts sur les structures de la matière blanche.

Comme expliqué auparavant, le développement de la tractographie 3D a permis d'initier de nombreuses collaborations avec des équipes extérieures. Elle a notamment été utilisée dans un modèle d'épilepsie chez le rat, dans un protocole de recherche porté sur des rats irradiés à l'ESRF (Annexe 2). Nous sommes convaincus du grand potentiel de cette application dans la recherche en neurosciences, et pensons poursuivre ces collaborations afin de les rendre les plus fructueuses possibles, et envisageons même d'entamer de nouvelles.

De plus, le développement de la SR apporte la possibilité d'appliquer cette imagerie *in vivo*, ce qui augmente largement le champ d'application de l'imagerie de diffusion dans des modèles chez la souris.

Dans cette thèse, des outils d'imagerie structurelle ont été développés. L'apport de l'imagerie de diffusion dans le diagnostic et le suivi de traitement est indéniable. En particulier, la tractographie montre tout son potentiel, permettant en une seule acquisition de révéler les défauts de matière blanche d'un cerveau. L'exemple du travail sur les souris MAP6-KO l'illustre bien, puisqu'il révèle des problèmes anatomiques grâce à la tractographie, fournissant ainsi aux biologistes des nouvelles pistes d'investigation. Ces outils récents non-invasifs ont un potentiel certain par rapport aux techniques existantes qui elles sont souvent longues, invasives, et restreintes à des informations 2D.

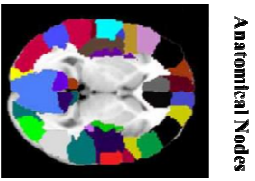
Cependant, ces données ne nous donnent qu'une information structurelle sur la connectivité du cerveau, information partielle concernant le fonctionnement cérébral global. Ainsi, les méthodes d'imagerie récentes (MEG, IRM fonctionnelle, IRM de diffusion...) ont permis d'apporter des informations fonctionnelles et métaboliques avec un grand pas dans la compréhension des maladies neurologiques, mais elles sont rarement utilisées de manière complémentaire. Si l'on veut lever les verrous de la complexité du cerveau, les informations données par toutes ces modalités doivent être assemblées et exploitées simultanément. Cependant la réunification pertinente de toutes ces données est un vrai challenge qui ouvre d'autres perspectives de recherche vers l'espoir de vaincre les maladies neurologiques.

Au cours des dernières années, les améliorations technologiques fournissent des masses de données de plus en plus importantes pour l'imagerie. Par exemple, les progrès en IRM nous permettent aujourd'hui d'avoir des acquisitions de diffusion à très haute résolution spatiale, avec des jeux de données pouvant peser plusieurs Go pour chaque patient. Ainsi, la gestion de données d'imagerie provenant de différentes modalités devient presque impossible avec les méthodes d'analyses classiques et devrait s'orienter vers les méthodologies manipulant de gros volume de données de manière pertinente, connues sous le nom de Big Data.

Un des exemples est la théorie des graphes (Filippi et al., 2013), qui peut s'appliquer sur la multi-modalité. Pour la théorie des graphes, l'approche proposée considère un fonctionnement du cerveau basé sur des connections. Les connections du système neural sont obtenues par imagerie, et regroupées dans le même formalisme de réseau (voir figure 17). Le cerveau est alors considéré comme un réseau représenté par des nœuds, reliés par des connections. La théorie des graphes est capable d'analyser l'architecture du réseau et de fournir des interprétations qui améliorent notre compréhension sur l'organisation du cerveau, et sur le rôle que peuvent avoir les différents sous-réseaux. Dans cette approche, les maladies sont alors assimilées à des modifications du réseau original du cerveau. Cette approche connaît un intérêt grandissant dans la recherche médicale. Elle est souvent utilisée sur une approche multidisciplinaire et multimodalité chez l'homme (Filippi et al., 2013, Fornito et al., 2013,

Bullmore and Bassett, 2011, Zhao et al., 2015), mais aussi chez la souris (Oh et al., 2014). Elle a déjà fait ses preuves dans maladies neurologiques (Filippi et al., 2013).

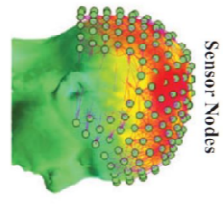
Beaucoup de maladies neurologiques échappent toujours à notre compréhension, une des principales causes étant probablement la complexité du cerveau. Celui-ci est composé de centaines de milliards de connexion et son fonctionnement normal est loin d'être compris dans sa totalité. C'est pourquoi la compréhension de maladies affectant ce fonctionnement déjà mal connu semble ardue. Nos méthodes d'analyse actuelles restent incapables de gérer des modèles aussi complexes. Il est donc logique de se diriger vers de nouvelles stratégies d'analyse de données, compatibles avec ce genre de problématique. Tout comme l'imagerie 3D a permis d'affiner notre compréhension du cerveau par rapport aux résultats 2D, je pense que le domaine du traitement « intelligent » des données (smart data) nous fera faire un grand bond en avant dans la compréhension du fonctionnement des maladies neurologiques, et nous fournira de nouvelles approches de thérapies.



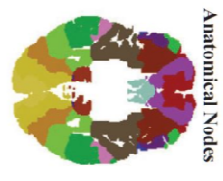
Anatomical Nodes



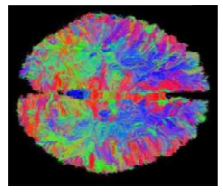
Anatomical Nodes



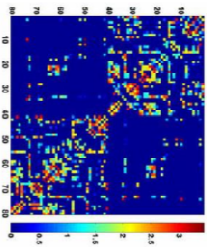
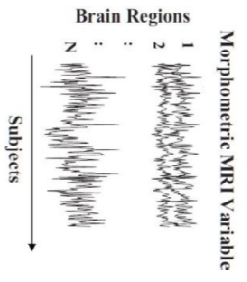
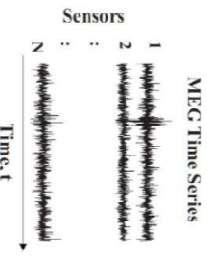
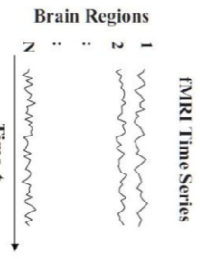
Sensor Nodes



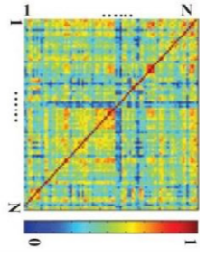
Anatomical Nodes



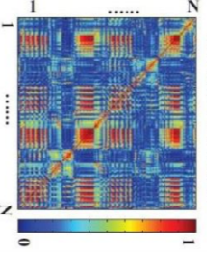
Tractography



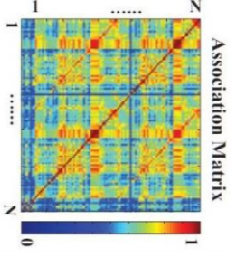
Association Matrix



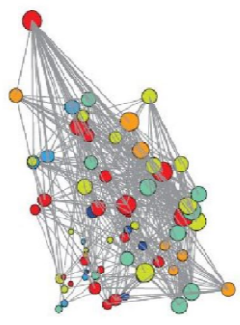
Association Matrix



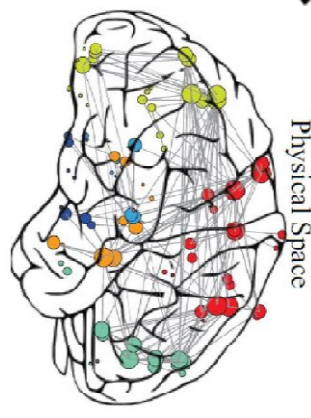
Association Matrix



Association Matrix



Topological Space



Physical Space

Définition des noeuds du réseau

Mesure du signal et reconstruction

Construction de la matrice d'association

Représentation du réseau global

Figure 17. Reconstruction du réseau d'un cerveau à partir d'acquisitions multimodales : tractographie IRM, IRM fonctionnelle, magnétoencéphalographie (MEG) et volumétrie IRM. Les nœuds sont d'abord définis : des régions anatomiques sont délimitées sur les images IRM alors que la MEG utilise ses capteurs. Les mesures spécifiques de chaque modalité sont effectuées, les connections entre les régions sont évaluées avec une matrice d'association. L'ensemble de ces données est formalisé sur un réseau, dont un exemple est montré. Ici, les couleurs représentent l'appartenance à un lobe cérébral, la taille des ronds la taille des nœuds. La représentation topologique transcrit les distances entre les nœuds. Figure inspirée de (Zhao et al., 2015, Wang et al., 2009).

CONCLUSION

Durant ce travail de thèse, le travail méthodologique a été majeur, avec la mise en place et la comparaison de techniques d'imagerie de diffusion avancées, ainsi que l'optimisation du traitement des données. Cette thèse a aussi abouti à des innovations, avec l'élaboration d'un protocole complet d'imagerie cellulaire, combinant les techniques de relaxométrie et les séquences dites de « positive contrast ». D'autre part, le développement de la SR en imagerie préclinique a permis une imagerie microscopique 3D DTI *in vivo* pour la première fois (résolution isotropique de $120 \mu\text{m}^3$). Cet outil d'imagerie ouvre la voie vers le suivi précis de traitements sur des modèles animaux du glioblastome et de schizophrénie, qui sont caractérisés dans ce travail. Il peut aussi s'appliquer à de nombreux autres modèles animaux liés à des défauts de la matière blanche, et débloque un verrou technologique fort en neuroanatomie.

Cependant, cette thèse n'est pas uniquement portée sur un travail méthodologique d'imagerie, mais elle comprend aussi un aspect multidisciplinaire prononcé. La problématique n'était pas centrée sur des problèmes techniques d'imagerie, mais plutôt sur une problématique biologique. Il a été nécessaire de comprendre ces problématiques afin d'adapter et de développer les techniques d'IRM.

Tout au long du travail de thèse, je me suis attaché à faire l'interface entre les différents domaines et expertises du laboratoire, et j'ai développé des capacités dans des domaines multiples et éloignés de la physique de l'IRM. Cette préoccupation, et cette méthode de travail ont permis à mon avis d'obtenir une plus grande richesse dans les diagnostics obtenus avec nos résultats, mais aussi une plus grande facilité pour valider et interpréter nos résultats avec d'autres techniques. Cependant, cette stratégie peut parfois paraître fastidieuse car elle nécessite de s'adapter à des domaines qui divergent de nos champs de spécialisation initiaux.

Ce travail à l'interface médecine, physique et technologie pour étudier les tissus vivants est fastidieux et demande une persévérance et un goût pour la multidisciplinarité qui nécessitent un investissement pour s'adapter à des domaines qui divergent de nos champs de spécialisation.

Communications :

Communication internationales

U. Gimenez, A. Perles-Barbacaru, B. van der Sanden, F. Appaix, D. Wion, M.F. Nissou, F. Berger, H. Lahrech. *Tumor cell migration as detected by microscopic 3D-DTI and two-photon microscopy in a novel mouse model of glioma*. ESMRMB 2012, Lisbonne, Portugal. (E-Poster)

T.A. Perles-Barbacaru, F. Tiar, **U. Gimenez**, L. Pelletier, D. Wion, F. Berger, H. Lahrech. *In vivo multiparametric MRI for the characterization of a novel glioma model*. ISMRM 2013, Salt Lake City, USA (e-poster)

U. Gimenez, D. Wion, F. Appaix, F. Mauconduit, A. Perles-Barbacaru, M-F Nissou, F. Berger, B. van der Sanden, H. Lahrech. *Microscopic 3D-DTI of tumor cell migration, numerical modeling and two-photon microscopic imaging*, ISMRM 2013, Salt Lake City, USA (Oral)

Award :



F. Mauconduit, **U. Gimenez**, F. Berger and H. Lahrech. *Numerical models of brain microstructures and Monte-Carlo simulations of NMR diffusion: comparison to data from animal models*. ESMRMB 2013, Toulouse, France (Oral)

U. Gimenez, F. Mauconduit, F. Taurel, F. Berger, A. Andrieux, J.-C. Deloulme, H. Lahrech. *White-matter deficit detection by microscopic 3D-DTI: application to STOP null mouse - an animal model of schizophrenia*, ESMRMB 2013, Toulouse, France (Oral).

U. Gimenez, F. Cavarec, A. Depaulis, H. Lahrech and C. Deransart. *A pathophysiological wiring defect in epileptic animals as depicted by DTI fiber tracking*, ISMRM 2014, Milan, Italie (Poster).

U. Gimenez, M. El Atifi, H. Lajous, V. Auboiroux, M. Bidart, P.-H. Fries, F. Berger, H. Lahrech. *In vivo quantitative cellular MR imaging guided by in vitro relaxation parameter measurements of magnetic labeled cells*, ISMRM 2014, Milan, Italie (Poster).

U. Gimenez and H. Lahrech. *In vivo rapid 3D Microscopic DTI combining Super Resolution Reconstruction and Reverse Gradient correction method*, ISMRM 2015, Toronto, Canada (Poster)

U. Gimenez and **H. Lahrech**. *Fiber tracking imaging of brain mouse: in vivo 3D Super Resolution Reconstruction*, ESMRMB 2015, Edinburgh, United Kingdom (Oral)

U. Gimenez, F. Mauconduit, B. Boulan, F. Taurel, E. Denarier, J. Brocard, S. Gory-Fauré, A. Andrieux, H. Lahrech, J-C. Deloulme. *Microscopic DTI for quantitative tractography of MAP6-KO mice: validation by fluorescent microscopy on cleared brains*, ISMRM 2016, Singapore, (Oral)

Communications nationales

U. Gimenez, A. Perles-Barbacaru, B. van der Sanden, F. Appaix, D. Wion, M.F. Nissou, F. Berger, H. Lahrech. *Migration des cellules tumorales : détection par imagerie du tenseur de diffusion et microscopie bi-photon*. XIII eme journée Rhône-Alpes de RMN (Poster)

U. Gimenez, T.-A. Perles-Barbacaru, B. van der Sanden, D. Wion, M.F. Nissou, F. Appaix, F. Berger, H. Lahrech. *Tumor cell migration as detected by microscopic 3D-DTI and 2-photon microscopy in a new mouse model of glioblastoma*. Nouvelles méthodologies Imagerie du vivant 2012, Lyon, France. (Poster)

T.-A. Perles-Barbacaru, F. Tiar, **U. Gimenez**, D. Wion, F. Berger and H. Lahrech. *In vivo multiparametric quantitative MRI for the characterization of a novel glioma model RITS* 2013, Bordeaux, France. (Poster).

U. Gimenez, D. Wion, F. Appaix, F. Mauconduit, A. Perles-Barbacaru, M-F. Nissou, F. Berger, B. van der Sanden, H. Lahrech. *Microscopic 3D-DTI and two-photon microscopy imaging of cell tumor migration and numerical modeling*, RITS 2013, Bordeaux, France. (Oral).

U. Gimenez, H. Lahrech. *Détection de la migration des cellules tumorales dans le cerveau par IRM*, Neurodocs 2013 – GIN, Grenoble, France (Oral)

U. Gimenez, H. Lahrech. *IRM de la migration des cellules tumorales*, Journées des doctorants DTBS et CLINATEC 2014, Grenoble, France (Oral)

U. Gimenez, H. Lahrech. *MRI of the tumor cell migration*, Neurodocs 2014 – GIN, Grenoble, France (Oral)

U. Gimenez, H. Lahrech. *IRM de la migration des cellules tumorales*, Journée scientifique de l'EDISCE 2014, Grenoble, France (Poster)

U. Gimenez, A-T. Perles-Barbacaru, A. Millet, F. Appaix, F. Mauconduit, M. El-Atifi, K. Pernet-Gallay, D. Wion, B. van der Sanden, F. Berger, H. Lahrech. *Multimodal imaging of glioma cell migration*, journée CLARA 2015, Lyon, France (Poster)

U. Gimenez and H. Lahrech. *DTI-3D à haute resolution spatiale et tractographie in vivo chez la souris*, SFRMBM 2015, Grenoble, France (Oral)

Références

- Alexander, D. C., Barker, G. J. and Arridge, S. R. (2002) 'Detection and modeling of non-Gaussian apparent diffusion coefficient profiles in human brain data', *Magnetic Resonance in Medicine*, 48(2), pp. 331-340.
- Alomair, O. I., Brereton, I. M., Smith, M. T., Galloway, G. J. and Kurniawan, N. D. (2015) 'In vivo High Angular Resolution Diffusion-Weighted Imaging of Mouse Brain at 16.4 Tesla', *Plos One*, 10(6).
- Awasthi, R., Kumar-Verma, S., Haris, M., Singh, A., Behari, S., Jaiswal, A. K., Rajput, D., Pandey, R., Rathore, R. K. S., Pandey, C. M. and Gupta, R. K. (2010) 'Comparative Evaluation of Dynamic Contrast-Enhanced Perfusion With Diffusion Tensor Imaging Metrics in Assessment of Corticospinal Tract Infiltration in Malignant Glioma', *Journal of Computer Assisted Tomography*, 34(1), pp. 82-88.
- Balchandani, P., Yamada, M., Pauly, J., Yang, P. and Spielman, D. (2009) 'Self-Refocused Spatial-Spectral Pulse for Positive Contrast Imaging of Cells Labeled with SPIO Nanoparticles', *Magnetic Resonance in Medicine*, 62(1), pp. 183-192.
- Basser, P. J., Pajevic, S., Pierpaoli, C., Duda, J. and Aldroubi, A. (2000) 'In vivo fiber tractography using DT-MRI data', *Magnetic Resonance in Medicine*, 44(4), pp. 625-632.
- Behrens, T. E. J., Berg, H. J., Jbabdi, S., Rushworth, M. F. S. and Woolrich, M. W. (2007) 'Probabilistic diffusion tractography with multiple fibre orientations: What can we gain?', *Neuroimage*, 34(1), pp. 144-155.
- Berman, J. (2009) 'Diffusion MR Tractography As a Tool for Surgical Planning', *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America*, 17(2), pp. 205-+.
- Boretius, S., Wuerfel, J., Zipp, F., Frahm, J. and Michaelis, T. (2007) 'High-field diffusion tensor imaging of mouse brain in vivo using single-shot STEAM MRI', *Journal of Neuroscience Methods*, 161(1).
- Brisset, J. C., Sigovan, M., Chauveau, F., Riou, A., Devillard, E., Desestret, V., Touret, M., Nataf, S., Honnorat, J., Canet-Soulas, E., Nighoghossian, N., Berthezene, Y. and Wiart, M. (2011) 'Quantification of Iron-Labeled Cells with Positive Contrast in Mouse Brains', *Molecular Imaging and Biology*, 13(4), pp. 672-678.
- Bucci, M., Mandelli, M. L., Berman, J. I., Amirbekian, B., Nguyen, C., Berger, M. S. and Henry, R. G. (2013) 'Quantifying diffusion MRI tractography of the corticospinal tract in brain tumors with deterministic and probabilistic methods', *Neuroimage-Clinical*, 3, pp. 361-368.
- Buchmann, N., Gempt, J., Stoffel, M., Foerschler, A., Meyer, B. and Ringel, F. (2011) 'Utility of diffusion tensor-imaged (DTI) motor fiber tracking for the resection of intracranial tumors near the corticospinal tract', *Acta Neurochirurgica*, 153(1), pp. 68-74.
- Bullmore, E. T. and Bassett, D. S. (2011) 'Brain Graphs: Graphical Models of the Human Brain Connectome', *Annual Review of Clinical Psychology*, 7, pp. 113-140.
- Callaghan, P. T. 1993. Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy.
- Campbell, J. S. W., Siddiqi, K., Rymar, V. V., Sadikot, A. F. and Pike, G. B. (2005) 'Flow-based fiber tracking with diffusion tensor and q-ball data: Validation and comparison to principal diffusion direction techniques', *Neuroimage*, 27(4), pp. 725-736.
- Cantillon-Murphy, P., Wald, L. L., Zahn, M. and Adalsteinsson, E. (2009) 'Measuring SPIO and Gd contrast agent magnetization using 3 T MRI', *Nmr in Biomedicine*, 22(8), pp. 891-897.
- Chao, Y.-P., Chen, J.-H., Cho, K.-H., Yeh, C.-H., Chou, K.-H. and Lin, C.-P. (2008) 'A multiple streamline approach to high angular resolution diffusion tractography', *Medical Engineering & Physics*, 30(8), pp. 989-996.
- Chien, L.-Y., Hsiao, J.-K., Hsu, S.-C., Yao, M., Lu, C.-W., Liu, H.-M., Chen, Y.-C., Yang, C.-S. and Huang, D.-M. (2011) 'In vivo magnetic resonance imaging of cell tropism, trafficking mechanism, and

- therapeutic impact of human mesenchymal stem cells in a murine glioma model', *Biomaterials*, 32(12).
- Chou, M. C., Huang, T. Y., Chung, H. W., Hsieh, T. J., Chang, H. C. and Chen, C. Y. (2013) 'Q-ball imaging with PROPELLER EPI acquisition', *Nmr in Biomedicine*, 26(12), pp. 1723-1732.
- Claes, A., Idema, A. J. and Wesseling, P. (2007) 'Diffuse glioma growth: a guerilla war', *Acta Neuropathologica*, 114(5), pp. 443-458.
- Conturo, T. E., Lori, N. F., Cull, T. S., Akbudak, E., Snyder, A. Z., Shimony, J. S., McKinstry, R. C., Burton, H. and Raichle, M. E. (1999) 'Tracking neuronal fiber pathways in the living human brain', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(18), pp. 10422-10427.
- De Santis, S., Gabrielli, A., Palombo, M., Maraviglia, B. and Capuani, S. (2011) 'Non-Gaussian diffusion imaging: a brief practical review', *Magnetic Resonance Imaging*, 29(10), pp. 1410-1416.
- Dell'Acqua, F. and Catani, M. (2012) 'Structural human brain networks: hot topics in diffusion tractography', *Current Opinion in Neurology*, 25(4), pp. 375-383.
- Deloulme, J.-C., Gory-Faure, S., Mauconduit, F., Chauvet, S., Jonckheere, J., Boulan, B., Mire, E., Xue, J., Jany, M., Maucler, C., Deparis, A. A., Montigon, O., Daoust, A., Barbier, E. L., Bosc, C., Deglon, N., Brocard, J., Denarier, E., Le Brun, I., Pernet-Gallay, K., Vilgrain, I., Robinson, P. J., Lahrech, H., Mann, F. and Andrieux, A. (2015) 'Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth', *Nature Communications*, 6.
- Di Gregorio, E., Ferrauto, G., Gianolio, E. and Aime, S. (2013) 'Gd loading by hypotonic swelling: an efficient and safe route for cellular labeling', *Contrast Media & Molecular Imaging*, 8(6), pp. 475-486.
- Dimitropoulos, K., Giannopoulou, E., Argyriou, A. A., Zolota, V., Petsas, T., Tsiata, E. and Kalofonos, H. P. (2010) 'The Effects of Anti-VEGFR and Anti-EGFR Agents on Glioma Cell Migration Through Implication of Growth Factors with Integrins', *Anticancer Research*, 30(12), pp. 4987-4992.
- Dimou, S., Battisti, R. A., Hermens, D. F. and Lagopoulos, J. (2013) 'A systematic review of functional magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging modalities used in presurgical planning of brain tumour resection', *Neurosurgical Review*, 36(2), pp. 205-214.
- Ernst, R. R. 1987. Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions.
- Farrar, C. T., Dai, G. P., Novikov, M., Rosenzweig, A., Weissleder, R., Rosen, B. R. and Sosnovik, D. E. (2008) 'Impact of field strength and iron oxide nanoparticle concentration on the linearity and diagnostic accuracy of off-resonance imaging', *Nmr in Biomedicine*, 21(5), pp. 453-463.
- Filippi, C. G., Carlson, M., Johnson, J. M., Burbank, H. N., Alsofrom, G. F. and Andrews, T. (2012) 'Improvements in Lumbar Spine MRI at 3 T Using Parallel Transmission', *American Journal of Roentgenology*, 199(4), pp. 861-867.
- Filippi, M., van den Heuvel, M. P., Fornito, A., He, Y., Pol, H. E. H., Agosta, F., Comi, G. and Rocca, M. A. (2013) 'Assessment of system dysfunction in the brain through MRI-based connectomics', *Lancet Neurology*, 12(12), pp. 1189-1199.
- Fornito, A., Zalesky, A. and Breakspear, M. (2013) 'Graph analysis of the human connectome: Promise, progress, and pitfalls', *Neuroimage*, 80, pp. 426-444.
- Gholipour, A., Estroff, J. A. and Warfield, S. K. (2010) 'Robust Super-Resolution Volume Reconstruction From Slice Acquisitions: Application to Fetal Brain MRI', *Ieee Transactions on Medical Imaging*, 29(10), pp. 1739-1758.
- Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, M. E. and Westphal, M. (2003) 'Cost of migration: Invasion of malignant gliomas and implications for treatment', *Journal of Clinical Oncology*, 21(8), pp. 1624-1636.
- Giese, A. and Westphal, M. (1996) 'Glioma invasion in the central nervous system', *Neurosurgery*, 39(2), pp. 235-250.
- Gigandet, X., Griffo, A., Kober, T., Daducci, A., Gilbert, G., Connelly, A., Hagmann, P., Meuli, R., Thiran, J. P. and Krueger, G. (2013) 'A Connectome-Based Comparison of Diffusion MRI Schemes', *Plos One*, 8(9), pp. 15.

- Goebell, E., Fiehler, J., Ding, X. Q., Paustenbach, S., Nietz, S., Heese, O., Kucinski, T., Hagel, C., Westphal, M. and Zeumer, H. (2006) 'Disarrangement of fiber tracts and decline of neuronal density correlate in glioma patients - A combined diffusion tensor imaging and H-1-MR spectroscopy study', *American Journal of Neuroradiology*, 27(7), pp. 1426-1431.
- Gondi, C. S., Lakka, S. S., Dinh, D. H., Olivero, W. C., Gujrati, M. and Rao, J. S. (2004) 'Downregulation of uPA, uPAR and MMP-9 using small, interfering, hairpin RNA (siRNA) inhibits glioma cell invasion, angiogenesis and tumor growth', *Neuron Glia Biology*, 1, pp. 165-176.
- Greenspan, H. (2009) 'Super-Resolution in Medical Imaging', *Computer Journal*, 52(1), pp. 43-63.
- Griswold, M. A., Jakob, P. M., Heidemann, R. M., Nittka, M., Jellus, V., Wang, J. M., Kiefer, B. and Haase, A. (2002) 'Generalized Autocalibrating Partially Parallel Acquisitions (GRAPPA)', *Magnetic Resonance in Medicine*, 47(6), pp. 1202-1210.
- Gupta, A. K. and Gupta, M. (2005) 'Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications', *Biomaterials*, 26(18), pp. 3995-4021.
- Hahn, E. L. 1950. Spin Echoes. *Physical Reviews*.
- Harsan, L. A., Paul, D., Schnell, S., Kreher, B. W., Hennig, J., Staiger, J. F. and von Elverfeldt, D. (2010) 'In vivo diffusion tensor magnetic resonance imaging and fiber tracking of the mouse brain', *Nmr in Biomedicine*, 23(7), pp. 884-896.
- Heemskerk, A. M., Strijkers, G. J., Vilanova, A., Drost, M. R. and Nicolay, K. (2005) 'Determination of mouse skeletal muscle architecture using three-dimensional diffusion tensor imaging', *Magnetic Resonance in Medicine*, 53(6), pp. 1333-1340.
- Hess, C. P., Mukherjee, P., Han, E. T., Xu, D. and Vigneron, D. B. (2006) 'Q-ball reconstruction of multimodal fiber orientations using the spherical harmonic basis', *Magnetic Resonance in Medicine*, 56(1), pp. 104-117.
- Holland, D., Kuperman, J. M. and Dale, A. M. (2010) 'Efficient correction of inhomogeneous static magnetic field-induced distortion in Echo Planar Imaging', *Neuroimage*, 50(1), pp. 175-183.
- Inoue, S., Ichikawa, T., Kurozumi, K., Maruo, T., Onishi, M., Yoshida, K., Fujii, K., Kambara, H., Chiocca, E. A. and Date, I. (2012) 'Novel Animal Glioma Models that Separately Exhibit Two Different Invasive and Angiogenic Phenotypes of Human Glioblastomas', *World Neurosurgery*, 78(6), pp. 670-682.
- Jeurissen, B., Leemans, A., Tournier, J.-D., Jones, D. K. and Sijbers, J. (2013) 'Investigating the Prevalence of Complex Fiber Configurations in White Matter Tissue with Diffusion Magnetic Resonance Imaging', *Human Brain Mapping*, 34(11), pp. 2747-2766.
- Jezzard, P., Barnett, A. S. and Pierpaoli, C. (1998) 'Characterization of and correction for eddy current artifacts in echo planar diffusion imaging', *Magnetic Resonance in Medicine*, 39(5), pp. 801-812.
- Jones, D. K., Horsfield, M. A. and Simmons, A. (1999) 'Optimal strategies for measuring diffusion in anisotropic systems by magnetic resonance imaging', *Magnetic Resonance in Medicine*, 42(3), pp. 515-525.
- Kallenberg, K., Goldmann, T., Menke, J., Strik, H., Bock, H. C., Stockhammer, F., Buhk, J. H., Frahm, J., Dechent, P. and Knauth, M. (2013) 'Glioma infiltration of the corpus callosum: early signs detected by DTI', *Journal of Neuro-Oncology*, 112(2), pp. 217-222.
- Kamada, K., Todo, T., Morita, A., Masutani, Y., Aoki, S., Ino, K., Kawai, K. and Kirino, T. (2005) 'Functional monitoring for visual pathway using real-time visual evoked potentials and optic-radiation tractography', *Neurosurgery*, 57(1), pp. 121-126.
- Kim, J. H., Trinkaus, K., Ozcan, A., Budde, M. D. and Song, S. K. (2007) 'Postmortem delay does not change regional diffusion anisotropy characteristics in mouse spinal cord white matter', *Nmr in Biomedicine*, 20(3), pp. 352-359.
- Kinoshita, M., Hashimoto, N., Goto, T., Kagawa, N., Kishima, H., Izumoto, S., Tanaka, H., Fujita, N. and Yoshimine, T. (2008) 'Fractional anisotropy and tumor cell density of the tumor core show positive correlation in diffusion tensor magnetic resonance imaging of malignant brain tumors', *Neuroimage*, 43(1), pp. 29-35.

- Lazar, M., Weinstein, D. M., Tsuruda, J. S., Hasan, K. M., Arfanakis, K., Meyerand, M. E., Badie, B., Rowley, H. A., Houghton, V., Field, A. and Alexander, A. L. (2003) 'White matter tractography using diffusion tensor deflection', *Human Brain Mapping*, 18(4).
- LeBihan, D., Breton, E., Lallemand, D., Grenier, P., Cabanis, E. and Lavaljeantet, M. (1986) 'MR IMAGING OF INTRAVOXEL INCOHERENT MOTIONS - APPLICATION TO DIFFUSION AND PERFUSION IN NEUROLOGIC DISORDERS', *Radiology*, 161(2), pp. 401-407.
- Leergaard, T. B., White, N. S., de Crespigny, A., Bolstad, I., D'Arceuil, H., Bjaalie, J. G. and Dale, A. M. (2010) 'Quantitative Histological Validation of Diffusion MRI Fiber Orientation Distributions in the Rat Brain', *Plos One*, 5(1).
- Liu, W., Dahnke, H., Rahmer, J., Jordan, E. K. and Frank, J. A. (2009) 'Ultrashort T-2* Relaxometry for Quantitation of Highly Concentrated Superparamagnetic Iron Oxide (SPIO) Nanoparticle Labeled Cells', *Magnetic Resonance in Medicine*, 61(4), pp. 761-766.
- Mani, V., Briley-Saebo, K. C., Itskovich, V. V., Samber, D. D. and Fayad, Z. A. (2006) 'Gradient echo Acquisition for Superparamagnetic particles with positive contrast (GRASP): Sequence characterization in membrane and glass superparamagnetic iron oxide phantoms at 1.5T and 3T', *Magnetic Resonance in Medicine*, 55(1), pp. 126-135.
- Mayer, D., Zahr, N. M., Adalsteinsson, E., Rutt, B., Sullivan, E. V. and Pfefferbaum, A. (2007) 'In vivo fiber tracking in the rat brain on a clinical 3T MRI system using a high strength insert gradient coil', *Neuroimage*, 35(3).
- Moisan, A., Pannetier, N., Grillon, E., Richard, M. J., de Fraipont, F., Remy, C., Barbier, E. L. and Detante, O. (2012) 'Intracerebral injection of human mesenchymal stem cells impacts cerebral microvasculature after experimental stroke: MRI study', *Nmr in Biomedicine*, 25(12), pp. 1340-1348.
- Morgan, P. S., Bowtell, R. W., McIntyre, D. J. O. and Worthington, B. S. (2004) 'Correction of spatial distortion in EPI due to inhomogeneous static magnetic fields using the reversed gradient method', *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 19(4), pp. 499-507.
- Mori, S., Crain, B. J., Chacko, V. P. and van Zijl, P. C. M. (1999) 'Three-dimensional tracking of axonal projections in the brain by magnetic resonance imaging', *Annals of Neurology*, 45(2), pp. 265-269.
- Mueller, H.-P., Kassubek, J., Vernikouskaya, I., Ludolph, A. C., Stiller, D. and Rasche, V. (2013) 'Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging of the Brain in APP Transgenic Mice: A Cohort Study', *Plos One*, 8(6).
- Muller, H. P., Vernikouskaya, I., Ludolph, A. C., Kassubek, J. and Rasche, V. (2012) 'Fast Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging of the Mouse Brain at Ultrahigh-Field: Aiming at Cohort Studies', *Plos One*, 7(12), pp. 6.
- Oh, S. W., Harris, J. A., Ng, L., Winslow, B., Cain, N., Mihalas, S., Wang, Q., Lau, C., Kuan, L., Henry, A. M., Mortrud, M. T., Ouellette, B., Nguyen, T. N., Sorensen, S. A., Slaughterbeck, C. R., Wakeman, W., Li, Y., Feng, D., Ho, A., Nicholas, E., Hirokawa, K. E., Bohn, P., Joines, K. M., Peng, H., Hawrylycz, M. J., Phillips, J. W., Hohmann, J. G., Wahnoutka, P., Koch, C., Bernard, A., Dang, C., Jones, A. R., Zeng, H. and Gerfen, C. R. (2014) 'A mesoscale connectome of the mouse brain', *Nature*, 508(7495), pp. 207-+.
- Peeters, R. R., Kornprobst, P., Nikolova, M., Sunaert, S., Vieville, T., Malandain, G., Deriche, R., Faugeras, O., Ng, M. and Van Hecke, P. (2004) 'The use of super-resolution techniques to reduce slice thickness in functional MRI', *International Journal of Imaging Systems and Technology*, 14(3), pp. 131-138.
- Perrin, M., Poupon, C., Rieul, B., Leroux, P., Constantinesco, A., Mangin, J. F. and LeBihan, D. (2005) 'Validation of q-ball imaging with a diffusion fibre-crossing phantom on a clinical scanner', *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 360(1457), pp. 881-891.
- Plenge, E., Poot, D. H. J., Bernsen, M., Kotek, G., Houston, G., Wielopolski, P., van der Weerd, L., Niessen, W. J. and Meijering, E. (2012) 'Super-resolution methods in MRI: Can they improve the trade-off between resolution, signal-to-noise ratio, and acquisition time?', *Magnetic Resonance in Medicine*, 68(6), pp. 1983-1993.

- Poupon, C., Roche, A., Dubois, J., Mangin, J.-F. and Poupon, F. (2008) 'Real-time MR diffusion tensor and Q-ball imaging using Kalman filtering', *Medical Image Analysis*, 12(5), pp. 527-534.
- Price, S. J., Pena, A., Burnet, N. G., Pickard, J. D. and Gillard, J. H. (2004) 'Detecting glioma invasion of the corpus callosum using diffusion tensor imaging', *British Journal of Neurosurgery*, 18(4), pp. 391-395.
- Reisert, M., Mader, I., Anastasopoulos, C., Weigel, M., Schnell, S. and Kiselev, V. (2011) 'Global fiber reconstruction becomes practical', *Neuroimage*, 54(2), pp. 955-962.
- Romano, A., D'Andrea, G., Minniti, G., Mastronardi, L., Ferrante, L., Fantozzi, L. M. and Bozzao, A. (2009) 'Pre-surgical planning and MR-tractography utility in brain tumour resection', *European Radiology*, 19(12), pp. 2798-2808.
- Schenck, J. F. (1996) 'The role of magnetic susceptibility in magnetic resonance imaging: MRI magnetic compatibility of the first and second kinds', *Medical Physics*, 23(6), pp. 815-850.
- Scherrer, B., Gholipour, A. and Warfield, S. K. (2012) 'Super-resolution reconstruction to increase the spatial resolution of diffusion weighted images from orthogonal anisotropic acquisitions', *Medical Image Analysis*, 16(7), pp. 1465-1476.
- Selek, L., Mauconduit, F., Nissou, M. F., Nugue, G., Lahrech, H., Berger, F., Mossuz, P. and Wion, D. (2012) 'Biodiversity as a barrier to glioma cell invasion', *Medical Hypotheses*, 78(4), pp. 459-461.
- Seppenwoolde, J. H., Viergever, M. A. and Bakker, C. J. G. (2003) 'Passive tracking exploiting local signal conservation: The white marker phenomenon', *Magnetic Resonance in Medicine*, 50(4), pp. 784-790.
- Shepherd, T. M., Thelwall, P. E., Stanisiz, G. J. and Blackband, S. J. (2009) 'Aldehyde Fixative Solutions Alter the Water Relaxation and Diffusion Properties of Nervous Tissue', *Magnetic Resonance in Medicine*, 62(1), pp. 26-34.
- Smith, R. E., Tournier, J. D., Calamante, F. and Connelly, A. (2012) 'Anatomically-constrained tractography: Improved diffusion MRI streamlines tractography through effective use of anatomical information', *Neuroimage*, 62(3), pp. 1924-1938.
- Sodickson, D. K., Hardy, C. J., Zhu, Y. D., Giaquinto, R. O., Gross, P., Kenwood, G., Niendorf, T., Lejay, H., McKenzie, C. A., Ohliger, M. A., Grant, A. K. and Rofsky, N. M. (2005) 'Rapid volumetric MRI using parallel imaging with order-of-magnitude accelerations and a 32-element RF coil array: Feasibility and implications', *Academic Radiology*, 12(5), pp. 626-635.
- Soenen, S. J. H., Himmelreich, U., Nuytten, N. and De Cuyper, M. (2011) 'Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling', *Biomaterials*, 32(1), pp. 195-205.
- Stadlbauer, A., Poelking, E., Prante, O., Nimsky, C., Buchfelder, M., Kuwert, T., Linke, R., Doelken, M. and Ganslandt, O. (2009) 'Detection of tumour invasion into the pyramidal tract in glioma patients with sensorimotor deficits by correlation of F-18-fluoroethyl-L-tyrosine PET and magnetic resonance diffusion tensor imaging', *Acta Neurochirurgica*, 151(9).
- Stejskal, E. O. and Tanner, J. E. 1965. Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time Dependent Field Gradient. THE JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS.
- Sun, S. W., Liang, H. F., Le, T. Q., Armstrong, R. C., Cross, A. H. and Song, S. K. (2006) 'Differential sensitivity of in vivo and ex vivo diffusion tensor imaging to evolving optic nerve injury in mice with retinal ischemia', *Neuroimage*, 32(3), pp. 1195-1204.
- Suzuki, Y., Cunningham, C. H., Noguchi, K. I., Chen, I. Y., Weissman, I. L., Yeung, A. C., Robbins, R. C. and Yang, P. C. (2008) 'In Vivo Serial Evaluation of Superparamagnetic Iron-Oxide Labeled Stem Cells by Off-Resonance Positive Contrast', *Magnetic Resonance in Medicine*, 60(6), pp. 1269-1275.
- Terrovitis, J., Stuber, M., Youssef, A., Preece, S., Leppo, M., Kizana, E., Schaer, M., Gerstenblith, G., Weiss, R. G., Marban, E. and Abraham, M. R. (2008) 'Magnetic resonance imaging overestimates ferumoxide-labeled stem cell survival after transplantation in the heart', *Circulation*, 117(12), pp. 1555-1562.

- Thelwall, P. E., Shepherd, T. M., Stanisz, G. J. and Blackband, S. J. (2006) 'Effects of temperature and aldehyde fixation on tissue water diffusion properties, studied in an erythrocyte ghost tissue model', *Magnetic Resonance in Medicine*, 56(2), pp. 282-289.
- Tournier, J. D., Calamante, F., Gadian, D. G. and Connelly, A. (2004) 'Direct estimation of the fiber orientation density function from diffusion-weighted MRI data using spherical deconvolution', *Neuroimage*, 23(3), pp. 1176-1185.
- Trakic, A., Liu, F., Lopez, H. S., Wang, H. and Crozier, S. (2007) 'Longitudinal gradient coil optimization in the presence of transient eddy currents', *Magnetic Resonance in Medicine*, 57(6), pp. 1119-1130.
- Tuch, D. S. (2004) 'Q-Ball imaging', *Magnetic Resonance in Medicine*, 52(6), pp. 1358-1372.
- Tuch, D. S., Reese, T. G., Wiegell, M. R., Makris, N., Belliveau, J. W. and Wedeen, V. J. (2002) 'High angular resolution diffusion imaging reveals intravoxel white matter fiber heterogeneity', *Magnetic Resonance in Medicine*, 48(4), pp. 577-582.
- Tuettenberg, J., Friedel, C. and Vajkoczy, P. (2006) 'Angiogenesis in malignant glioma - A target for antitumor therapy?', *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 59(3), pp. 181-193.
- Valable, S., Barbier, E. L., Bemaudin, M., Roussel, S., Segebarth, C., Petit, E. and Remy, C. (2008) 'In vivo MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma', *Neuroimage*, 40(2).
- Wang, J., Miletic, H., Sakariassen, P. O., Huszthy, P. C., Jacobsen, H., Brekka, N., Li, X. G., Zhao, P., Mork, S., Chekenya, M., Bjerkvig, R. and Enger, P. O. (2009) 'A reproducible brain tumour model established from human glioblastoma biopsies', *Bmc Cancer*, 9, pp. 13.
- Wedeen, V. J., Wang, R. P., Schmahmann, J. D., Benner, T., Tseng, W. Y. I., Dai, G., Pandya, D. N., Hagmann, P., D'Arceuil, H. and de Crespignya, A. J. (2008) 'Diffusion spectrum magnetic resonance imaging (DSI) tractography of crossing fibers', *Neuroimage*, 41(4), pp. 1267-1277.
- Weinstein, D., Kindlmann, G. and Lundberg, E. (1999) 'Tensorlines: advection-diffusion based propagation through diffusion tensor fields', *Proceedings Visualization '99 (Cat. No.99CB37067)*, pp. 249-530.
- Wu, C. Q., Xu, Y., Yang, L., Wu, J., Zhu, W. C., Li, D. Y., Cheng, Z. Z., Xia, C. C., Guo, Y. K., Gong, Q. Y., Song, B. and Ai, H. (2015) 'Negatively Charged Magnetite Nanoparticle Clusters as Efficient MRI Probes for Dendritic Cell Labeling and In Vivo Tracking', *Advanced Functional Materials*, 25(23), pp. 3581-3591.
- Wu, D., Xu, J., McMahon, M. T., van Zijl, P. C. M., Mori, S., Northington, F. J. and Zhang, J. (2013) 'In vivo high-resolution diffusion tensor imaging of the mouse brain', *Neuroimage*, 83, pp. 18-26.
- Yeh, F. C., Verstynen, T. D., Wang, Y. B., Fernandez-Miranda, J. C. and Tseng, W. Y. I. (2013) 'Deterministic Diffusion Fiber Tracking Improved by Quantitative Anisotropy', *Plos One*, 8(11), pp. 16.
- Yeh, T. C., Zhang, W. G., Ildstad, S. T. and Ho, C. (1995) 'IN-VIVO DYNAMIC MRI TRACKING OF RAT T-CELLS LABELED WITH SUPERPARAMAGNETIC IRON-OXIDE PARTICLES', *Magnetic Resonance in Medicine*, 33(2), pp. 200-208.
- Zamecnik, J. (2005) 'The extracellular space and matrix of gliomas', *Acta Neuropathologica*, 110(5).
- Zhang, F., Huang, X. L., Qian, C. Q., Zhu, L., Hida, N., Niu, G. and Chen, X. Y. (2012a) 'Synergistic enhancement of iron oxide nanoparticle and gadolinium for dual-contrast MRI', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 425(4), pp. 886-891.
- Zhang, J. Y., Jones, M. V., McMahon, M. T., Mori, S. and Calabresi, P. A. (2012b) 'In vivo and ex vivo diffusion tensor imaging of cuprizone-induced demyelination in the mouse corpus callosum', *Magnetic Resonance in Medicine*, 67(3), pp. 750-759.
- Zhao, T., Duan, F., Liao, X., Dai, Z., Cao, M., He, Y. and Shu, N. (2015) 'Test-retest reliability of white matter structural brain networks: a multiband diffusion MRI study', *Frontiers in Human Neuroscience*, 9.
- Zurkiya, O. and Hu, X. P. (2006) 'Off-resonance saturation as a means of generating contrast with superparamagnetic nanoparticles', *Magnetic Resonance in Medicine*, 56(4), pp. 726-732.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

IRM CELLULAIRE DU MODELE GLIO6

Une partie de ma thèse s'est concentré sur l'IRM cellulaire de cellules marquées par des nanoparticules magnétiques (chapitre 5). Les premières applications ont portées sur le modèle de glioblastome Glioblastoma décrit dans le chapitre 2, et étaient destinées à quantifier *in vivo* la migration des cellules Glioblastoma marquées par des nanoparticules d'oxyde de fer (USPIO-NPs). Les USPIO-NPs choisies étaient les MIRB, utilisées avec succès pour la lignée cellulaire U937 (chapitre 5). Ainsi, nous aurions pu obtenir une modalité d'imagerie supplémentaire pour caractériser ce modèle tumorale avec plus de précision, et déterminer la vitesse de migration des cellules Glioblastoma par exemple. Cependant, ce projet n'a pas pu aboutir à cause de l'exocytose précoce des MIRB par les cellules Glioblastoma, indétectable *in vitro*.

Une expérience avec le ProHance[®](gadoteridol), un agent de contraste (AC) à base de gadolinium, a été réalisée. L'idée ici était de marquer magnétiquement la cellule par un AC de petite taille et de faible poids moléculaire, que la cellule pourrait supporter. Le marquage avec ProHance a été réalisé avec un protocole de gonflement hypotonique. Malheureusement cette nouvelle procédure n'a pas permis de suivre par IRM les cellules Glioblastoma pendant l'ensemble de la croissance tumorale qui est longue d'au moins deux mois.

1°) Marquage Molday Ion

Caractérisation du marquage

Afin de caractériser au mieux le marquage des cellules Glioblastoma par les MIRB, une étude complète *in vitro* a été effectuée. Les cellules Glioblastoma-GFP (Green Fluorescent Protein) ont été marquées, avec le même protocole de marquage que les cellules U937 (chapitre 5). Les résultats de cytométrie de flux ont validé un marquage de 100 % des cellules, tandis que les tests de croissance et les tests MTT, test de la viabilité des cellules utilisant le sel de tétrazolium MTT comme réactif, n'ont pas relevé de toxicité des MIRB. Les images de fluorescence nous montrent une bonne efficacité de marquage. De plus, des expériences effectuées en ICP-MS (Induced coupled plasma mass spectroscopy) ont mesuré une quantité moyenne de 7 pg de fer par cellule. Enfin, le marquage est

préservé après division cellulaire chez les deux cellules filles (figure A), et les cellules Gliob ne rejettent pas les MIRB dans le milieu de culture.

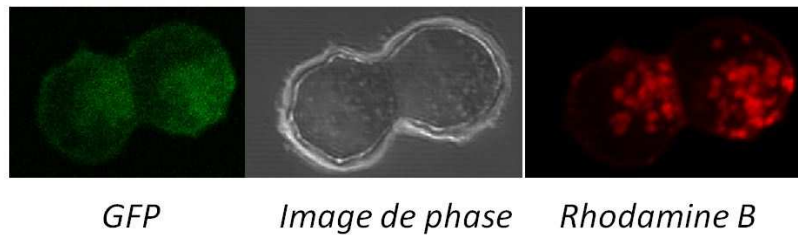


Figure A. Imagerie de fluorescence des cellules Gliob marquées par des MIRB. Après marquage, les cellules sont fixées avec du PAF 4% et imagées avec le microscope multizoom AZ100 Nikon. La cellule Gliob exprime la GFP, et est en phase de division cellulaire. La fluorescence rouge (Rhodamine B) montre la présence des nanoparticules MIRB, qui se séparent de manière similaire pendant la division.

En résumé, tous les résultats obtenus *in vitro* tendaient vers un marquage réussi avec 100 % d'efficacité et sans effets sur la cellule Gliob.

IRM *in vivo*

$5 \cdot 10^5$ cellules Gliob-GFP ont été implantées chez des souris nude ($n=4$) et leur croissance a été suivie par IRM multiparamétrique (protocole décrit dans chapitre 5). L'IRM cellulaire a montré des résultats préliminaires intéressants. Cependant, le suivi longitudinal sur 60 jours ne montrait pas de mouvement des cellules marquées (figure B), et celles-ci n'étaient pas présentes dans le corps calleux comme nous l'aurions imaginé (chapitre 2).

Les analyses par la microscopie de fluorescence ont permis d'expliquer la biodistribution des cellules Gliob-GFP et des MIRB. A deux mois de croissance tumorale, les cerveaux de souris ont été fixés, coupés, et observés au microscope « macrofluor » et au microscope bi-photon (figure C). On observe un envahissement du cerveau par les cellules Gliob-GFP vertes, comme constaté dans le chapitre 2, mais ces cellules n'émettent aucune fluorescence rouge qui est celle des MIRB. Cependant, on observe que la fluorescence rouge, reflétant la présence des MIRB, est regroupée dans le site d'implantation.

Notre hypothèse est qu'une fois implantées, les cellules Gliob se sont débarrassées des MIRB par exocytose, pour ensuite envahir le cerveau comme à leur habitude (chapitre 2).

Cette expérience a été reconduite avec un marquage plus restreint, passant d'un temps d'incubation des cellules avec les MIRB de 20h à 8h. L'idée est d'alléger la quantité de MIRB par cellule qui pourrait alors les conserver et ne pas les évacuer *in vivo*. Des souris nude (n=4) furent implantées avec ces cellules, mais le résultat fut similaire.

De cette série d'expériences, on peut conclure que les cellules Glioblastome ne montrent pas le même comportement *in vivo* et *in vitro*, et ne peuvent pas être marquées par l'AC MIRB. Pour leur migration, les cellules Glioblastome se débarrassent des MIRB par exocytose. C'est pourquoi nous avons essayé un marquage avec l'AC ProHance, agent de faible poids moléculaire à base de gadolinium.

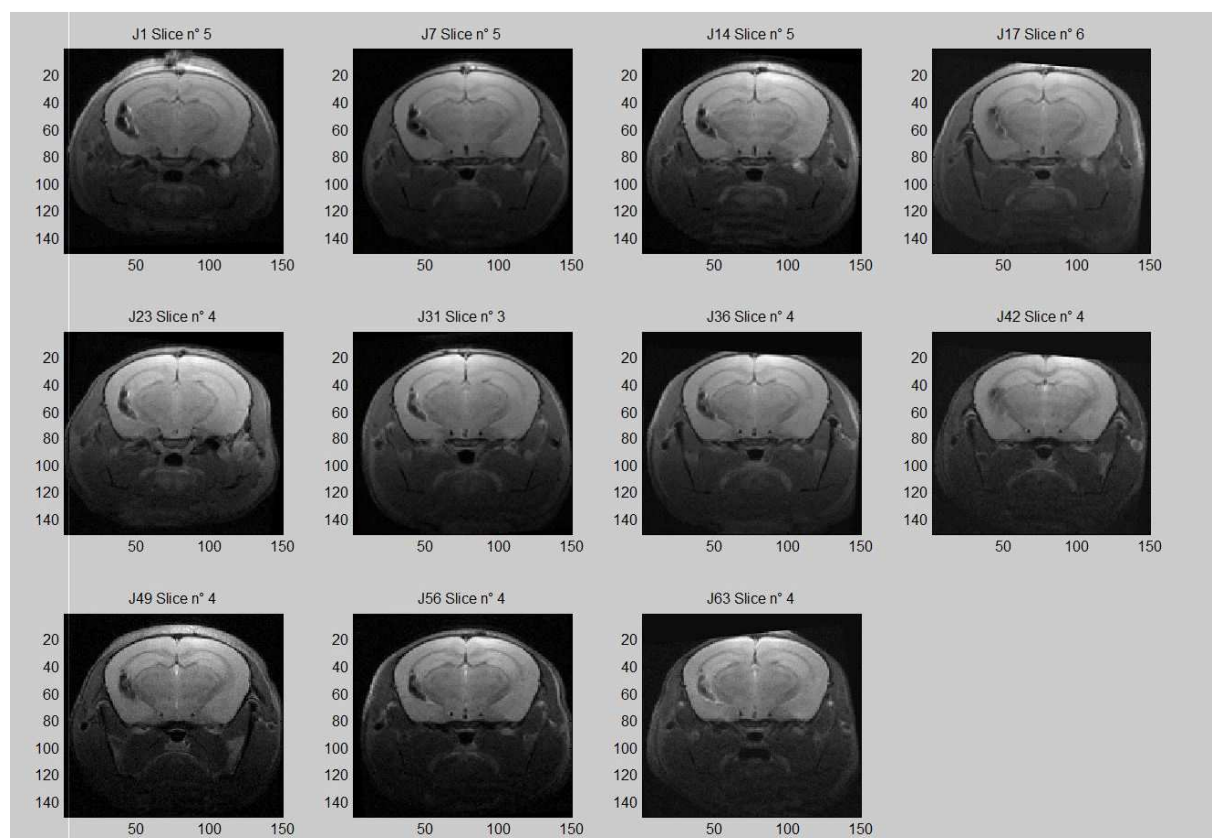


Figure B. Imagerie TurboRARE du suivi longitudinal (jours 1, 7, 14, 17, 23, 31, 36, 42, 49, 56, 63 après injection) des cellules Glioblastome marquées pour une souris typique. Les cellules Glioblastome marquées apparaissent avec un contraste négatif sur l'image. Le protocole complet (chapitre 5) d'IRM cellulaire est appliqué sur les souris Glioblastome+MIRB, mais ne montre aucun changement dans la biodistribution des cellules marquées.

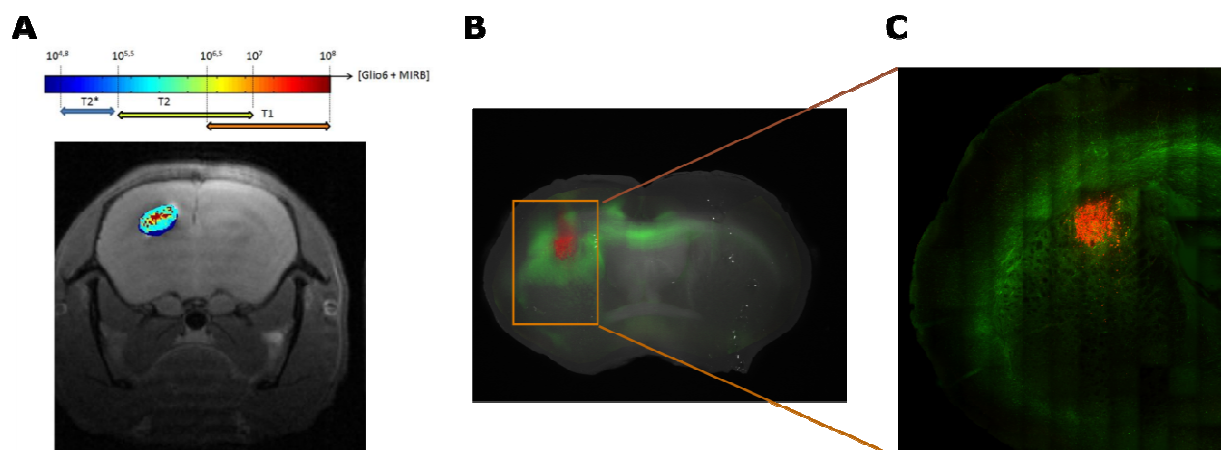


Figure C. Biodistribution des MIRB internalisées dans des cellules Glioblastoma *in vivo*. On observe une exocytose des MIRB par les Glioblastoma dans une souris typique. (A) Le protocole d'IRM cellulaire permet de quantifier les MIRB chez la souris *in vivo* ($J = 63$), mais ne retranscrit pas la biodistribution des cellules Glioblastoma. En effet, grâce à la microscopie optique, on voit que les Glioblastoma qui sont codées GFP envahissent le corps calleux (fluorescence verte) comme observé précédemment (chapitre 2), mais les nanoparticules MIRB restent concentrées dans la zone du site d'injection. La microscopie macrofluorescence (B) et la microscopie bi-photon (C) confirment ce comportement.

Marquage Prohance

Etant donné que le marquage intracellulaire ne semblait pas convenir à la biologie des cellules Glioblastoma, nous avons essayé d'utiliser un marquage de la membrane cellulaire avec du Prohance. La méthode utilisée est le « gonflement hypotonique » (hypotonic swelling) développé dans le laboratoire de Sylvio Aimé (Di Gregorio et al., 2013), équipe avec qui nous collaborons. Le marquage des cellules Glioblastoma a été réalisé et 4 souris ont été implantées.

Le suivi *in vivo*, avec une séquence RARE pondérée T_1 , a été effectué. Pour chaque souris, une hyper-intensité due à l'AC ProHance a pu être détectée dans la zone d'injection (figure D). Malheureusement, cette hyper-intensité a rapidement diminué, pour disparaître au bout de 7 jours (Figure D). Ce marquage, réalisé avec succès, est trop restreint dans le temps pour convenir à nos problématiques de croissance tumorale s'étalant sur 2 mois.

Par manque de temps durant cette thèse, nous n'avons pas pu poursuivre d'autres pistes possibles pour réaliser un suivi par IRM cellulaire des Glioblastoma.

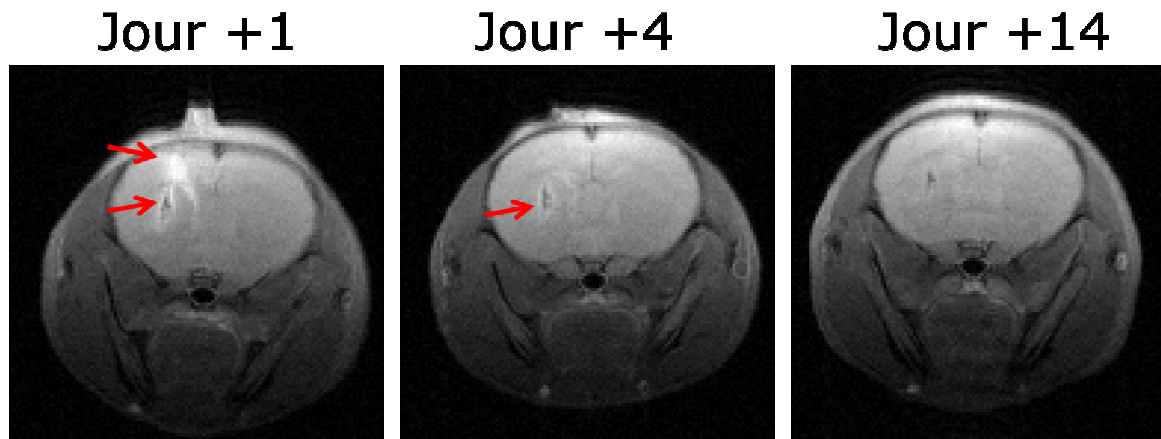


Figure D. Imagerie RARE du suivi longitudinal (jours 1, 4, 14 après injection) des cellules Glioblastoma marquées avec du ProHance pour une souris typique. Les cellules Glioblastoma marquées apparaissent avec un contraste positif sur l'image (flèche rouge). Ce contraste positif diminue au bout de 4 jours pour disparaître 14 jours après l'injection.

ANNEXE 2 :

IRM DE CERVEAUX DE RATS IRRADIES AU RAYONNEMENT SYNCHROTRON

Contexte scientifique

Grâce au développement de l'imagerie DTI et de la tractographie des fibres du cerveau, de nombreuses collaborations ont été entamées avec des équipes extérieures. Ce travail a été entamé en collaboration avec Véronique Coizet de l'équipe « Fonctions cérébrales et neuromodulation », dirigée par Oliver David, qui travaille sur les voies de connectivités cérébrales. L'équipe s'intéresse notamment aux interactions entre le colliculus supérieur (SC) et les ganglions de la base, qui sont à l'origine des réactions de notre cerveau suite à un changement soudain de notre environnement.

Des voies existantes, comme la voie « nigro-tectale » sont avérées, et ont permis de mieux comprendre le fonctionnement et la connectivité des ganglions de la base. Plus récemment, la voie « tecto-subthalamique » a été décelée, reliant les parties latérales du SC aux parties rostrales et dorsale et du noyau subthalamique (NST). Les méthodes utilisées par l'équipe étaient des méthodes invasives, basées sur l'identification de connectivités après injection d'un marqueur BDA (biotinylated dextran amine) (figure E). Notre collaboration leur apporte une imagerie de connectivité non destructive qui en une seule et unique acquisition identifierait l'ensemble des voies existantes, ici après irradiation d'une voie ciblée.

Dans ce contexte, une série d'expérience IRM a été réalisée sur des rats irradiés par rayonnement de faisceaux synchrotron au niveau du colliculus supérieur, dans un seul hémisphère, irradiation disymétrique où l'autre hémisphère sert de témoin. Cette irradiation provoquerait une lésion sur la voie tecto-subthalamique et il était notamment considéré que les projections partant du SC et reliant le STN seraient supprimées dans l'hémisphère irradié.

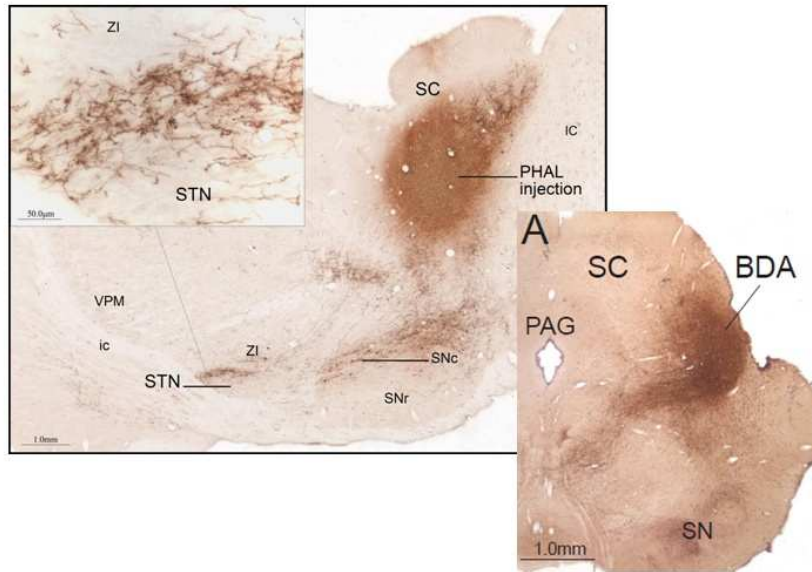


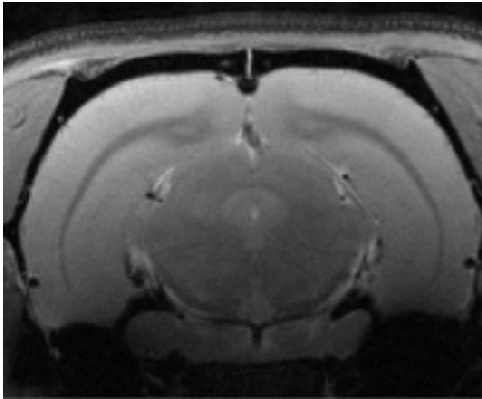
Figure E. Mise en évidence de la voie tecto-subthalamique reliant le colliculis supérieur (SC) et le noyau subthalamique (NST) après injection du marqueur BDA (biotinylated dextran amine)

IRM in vivo avec agent de contraste

Cinq rats irradiés (n=5) ont été étudiés par l'IRM pondérées T₁ avec agent de contraste (AC). Le but étant de détecter les effets de l'irradiation synchrotron qui provoque des lésions microscopiques, subtiles à visualiser. Mais si ces lésions s'accompagnent par une rupture de la barrière hémato-encéphalique, un rehaussement du signal sera détecté dans la zone lésionnelle suite à l'injection de l'AC. Dans cette expérience, les rats sont anesthésiés à l'isoflurane à 2%, et l'AC, le Gd-DOTA, est injecté dans la veine de la queue avec la dose de 0.1 mmol/kg.

La figure F montre les résultats de cette expérience. Comme attendu, une lésion a été détectée et valide la méthodologie du rayonnement synchrotron pour irradier efficacement la zone souhaitée.

pré-injection



post-injection

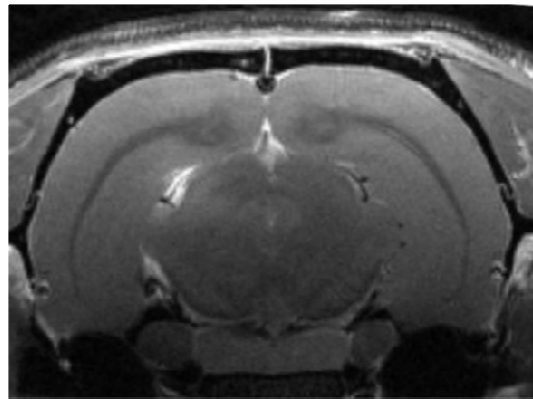


Figure F. IRM in vivo de la lésion par irradiation synchrotron. La séquence TurboRARE (séquence pondérée T_1) est utilisée pré et post-injection de Gd-DOTA. La lésion est localisée avec un rehaussement du signal, contraste positif après injection de l'AC.

Imagerie DTI et tractographie ex vivo

Un second protocole IRM utilisant les séquences 3D DTI haute résolution spatiale a été réalisé. Dans ce protocole, les cerveaux de rats sont fixés avec PFA 4% et Gd-DOTA (protocole décrit dans le chapitre 2).

Les fibres du cerveau sont reconstruites avec succès dans l'ensemble du cerveau de rat avec le logiciel Trackvis, en utilisant les critères d'arrêt : $FA = 0.25$, angle limite d'une fibre = 60° .

Des régions d'intérêt contenues dans le SC ont été dessinées pour les projections de fibres partant du SC. On peut alors comparer l'hémisphère irradié versus non irradié, et l'on observe une asymétrie dans les fibres obtenues (figure G). Du côté non irradié, des fibres projetant dans la direction postérieure sont reconstruites, et semblent correspondre aux projections reliant le SC et le STN.

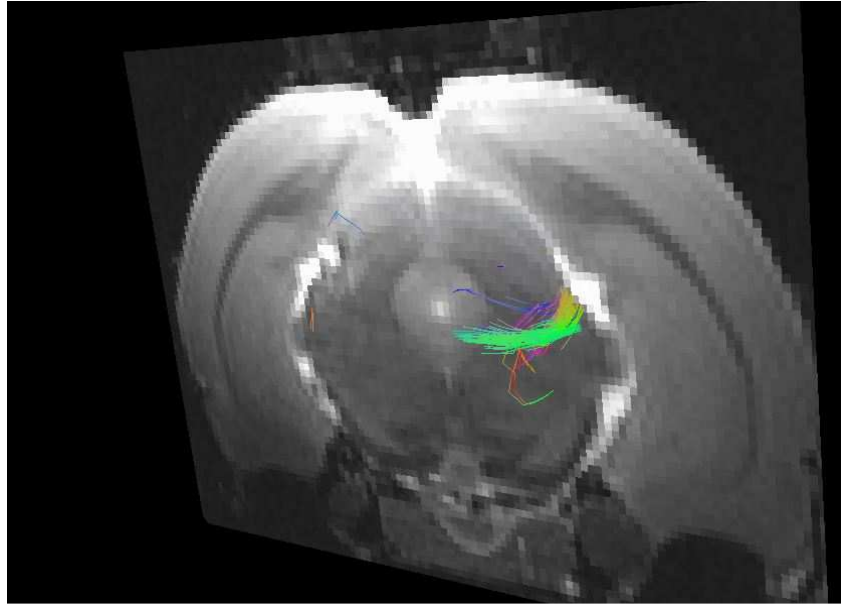


Figure G. Tractographie des projections partant du SC vers le STN. Une région d'intérêt est dessinée dans le SC des deux hémisphères, et les fibres reconstruites sont superposées sur une coupe coronale d'une image anatomique. Aucune fibre n'est reconstruite dans l'hémisphère irradiée (partie gauche), à l'inverse de l'hémisphère droit, non irradié. Paramètres d'acquisition : résolution spatiale de $150\mu\text{m}^3$, TE = 16ms, TR = 90 ms, 30 directions de diffusion, b = 1500s/mm^2 , nombre d'accumulations NA = 2, durée d'acquisition = 11h.

Ce travail est en cours, avec des résultats prometteurs mais nécessitent un plus grand nombre d'animaux pour augmenter la significativité quant à la disparition du tract reliant SC et STN après irradiations au synchrotron.

ANNEXE 3 :

TRACTOGRAPHIE HARDI vs DTI

Cette annexe reprend et complète la réflexion entamée dans le manuscrit quant au choix entre les imageries DTI et HARDI au cours de ma thèse (chapitre 1, 2). Les résultats présentés dans cette annexe ont été obtenus pendant le stage de Julia Dupuis, étudiante en 2^{ème} année d'école d'ingénieur (PHELMA) que j'ai encadrée.

Les différents schémas de tractographie sont résumés dans la figure H. En résumé, seul le modèle ODF est capable de reconstruire les fibres de microstructures complexes, comme les croisements de fibres. Cependant, elles nécessitent des acquisitions HARDI, caractérisées par une grande résolution angulaire, c'est-à-dire un très grand nombre de direction de gradients de diffusion et qui demande naturellement des acquisitions beaucoup plus longues que pour le cas du modèle DTI.

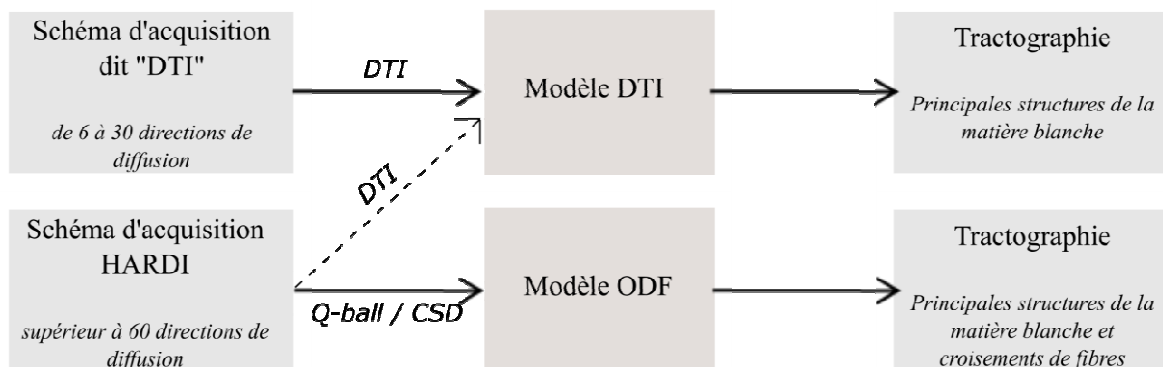


Figure H. Schéma du processus de la tractographie, de l'acquisition, à la reconstruction des fibres. Les reconstructions DTI, les plus courantes, n'ont besoin que de peu de directions de diffusion lors de l'acquisition (acquisition appelée par simplification « acquisition DTI »). Les reconstructions basées sur le modèle de l'ODF sont capables de résoudre les croisements de fibres, mais nécessitent des acquisitions HARDI. A noter que la modélisation DTI peut s'appliquer sur une acquisition HARDI.

L'ensemble des données a été acquis sur des cerveaux de rat, *ex vivo* (protocole de fixation chapitre 2). Les paramètres de valeur de b, et du nombre de directions de diffusion ont été optimisés à partir de plusieurs expériences préliminaires dans le but d'obtenir les reconstructions de fibres le plus proche possible de travaux d'histologie.

En s'appuyant sur des résultats de la littérature (Leergaard et al., 2010), nous nous sommes concentrés sur une zone du cerveau contenant des croisements de fibres (figure I). L'optimisation de la séquence de diffusion nous a conduite aux paramètres suivants : $b = 2500 \text{ s/mm}^2$, 150 directions de diffusion et un temps d'acquisition de 36h. Des reconstructions DTI, QBI CSD ont été comparées (figure J). La possibilité de reconstruire des fibres qui se croisent a été validé (figure J) pour la première fois dans l'équipe.

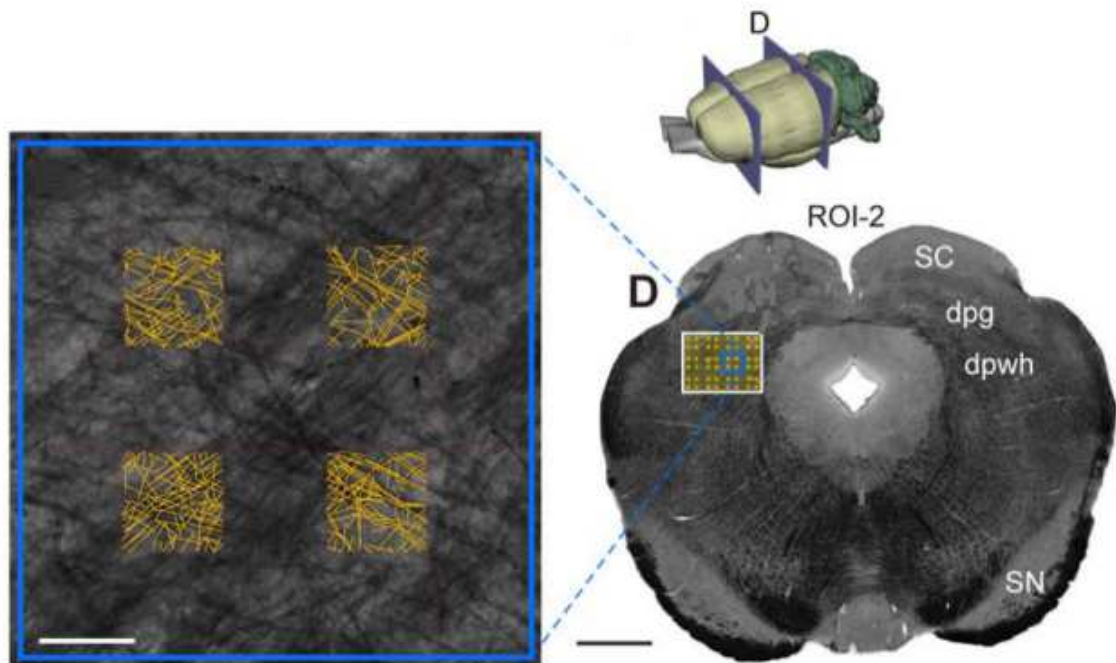


Figure I : Position et image histologique des croisements de fibres étudiés (Leergaard et al., 2010). Sur la partie « zoomée » de la coupe coronale, on peut voir les croisements de fibres mis en avant.

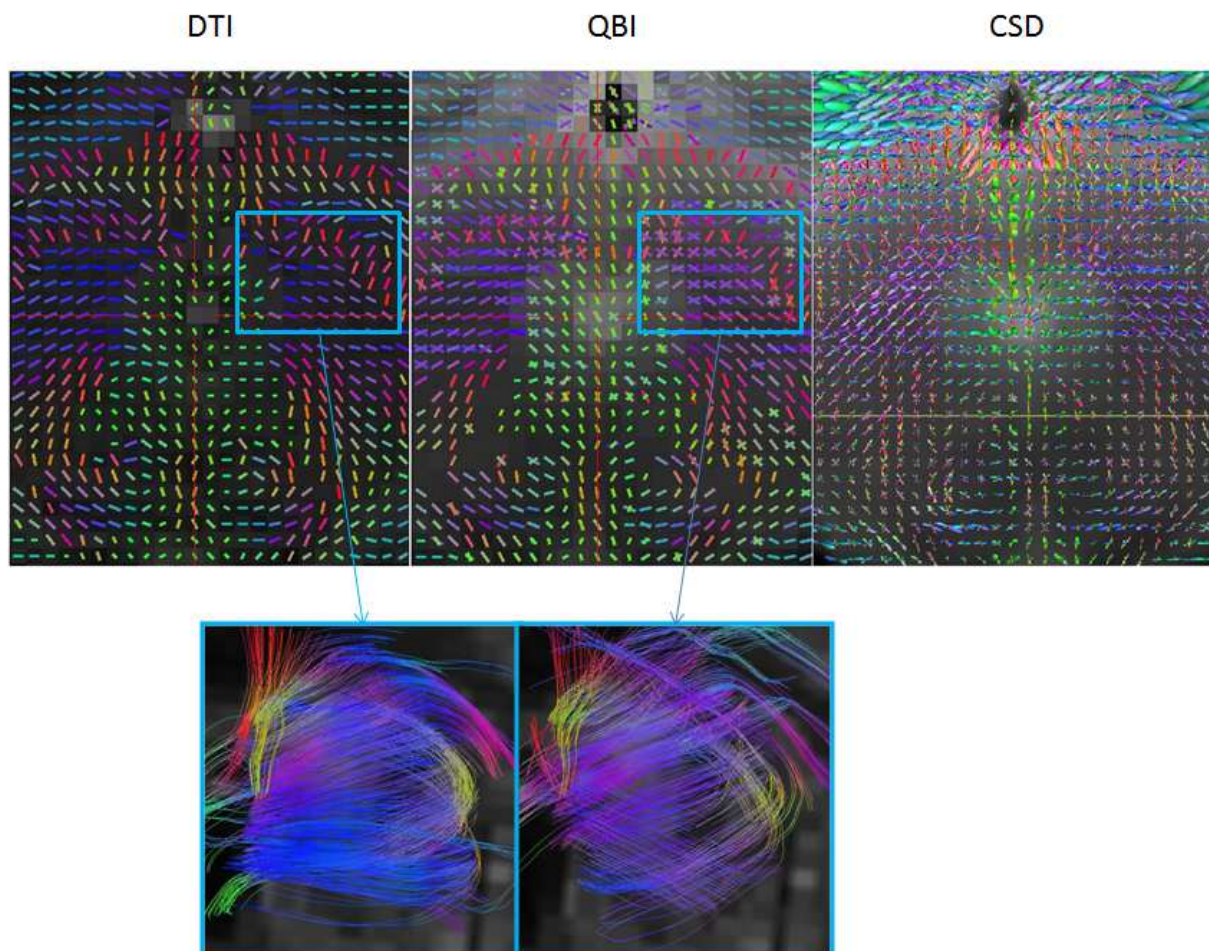


Figure J. Comparaison des reconstructions DTI, CSD et QBI avec le logiciel Mrtrix pour la même coupe coronale que dans la figure I. Les reconstructions des fibres, dans le cas DTI et QBI sont montrés. Pour la tractographie DTI, le logiciel échoue à retranscrire le croisement de fibres présent dans cette partie du cerveau et donne même des fibres horizontales, faussées. A l'inverse, à partir de la reconstruction QBI, le croisement de fibres est reconstruit avec succès.

Cependant, comme expliqué dans le manuscrit, ce sont les schémas d'acquisition et de reconstruction DTI qui ont été privilégiés dans cette thèse. Notre travail ne portait pas sur la détection de fibres complexes, mais sur des structures homogènes de la matière blanche. Ainsi, l'échantillonnage précis de la sphère de diffusion n'était plus nécessaire.

De plus, en pratique, les reconstructions à partir du modèle de l'ODF se sont quelques fois avérées moins complètes que celles obtenues par DTI. C'est le cas dans la figure K, où à partir du même de la même acquisition HARDI, la commissure antérieure des rats est reconstruite soit en utilisant le DTI, ou alors le QBI. Les fibres reconstruites avec le schéma DTI sont intactes, à l'inverse de celles reconstruites avec le schéma QBI (figure K).

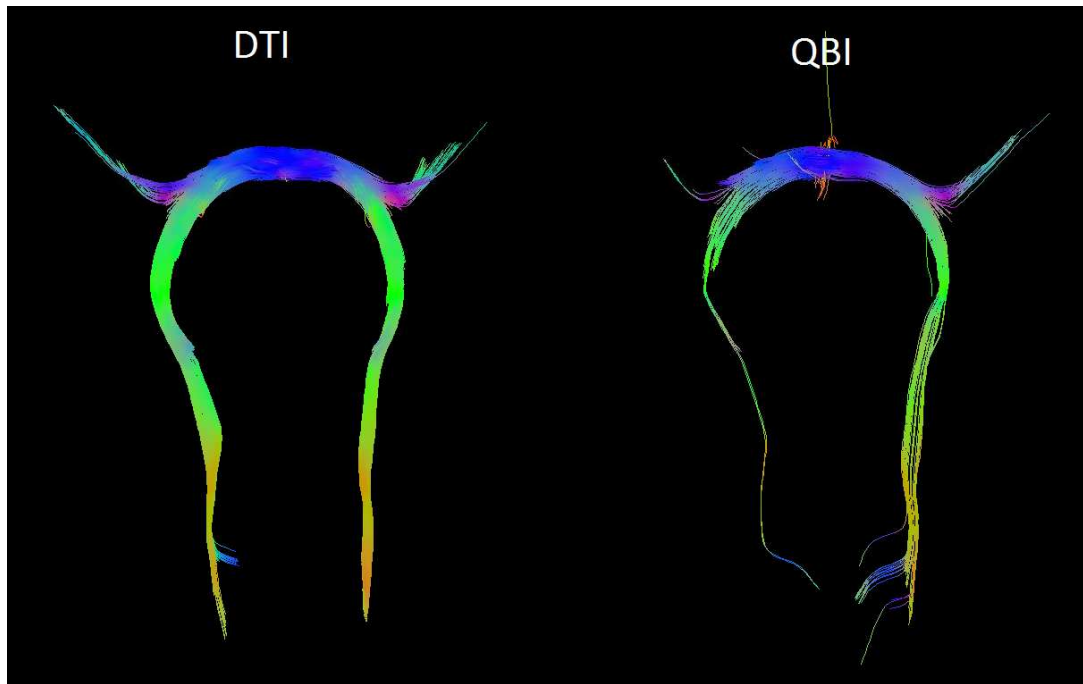


Figure K. Tractographie de la commissure antérieure d'un rat sain, reconstruite sous DSI studio par la méthode DTI ou QBI. Dans le cas de la reconstruction QBI, les fibres apparaissent largement altérées.

Pour conclure sur cette partie, nous pouvons dire que des comparaisons entre les deux méthodes demeurent encore à leur début, nécessitant davantage de validation et de confirmation par sur d'autres modèles animaux ou sur des connaissances a priori.

ANNEXE 4 :

ANATOMIE DU CERVEAU DE SOURIS

Chez les mammifères, les rongeurs présentent le cerveau le moins compliqué. Le cervelet par exemple est à découvert et n'est pas recouvert par le cerveau comme chez l'homme, et le cortex ne présente pas de circonvolutions à l'exception d'un sillon antéro-postérieur situé de chaque côté de la ligne médiane. Cependant, il garde de nombreuses similarités, avec notamment la composition des cellules du système nerveux, ou la présence des mêmes structures principales. Cette annexe décrit brièvement les cellules et les tissus cérébraux en question. Elle décrit aussi comment, en pratique, ces structures sont délimitées par l'expérimentateur à partir d'images IRM.

Cellules du système nerveux central

Dans le système nerveux, deux types cellulaires existent : les neurones et les cellules gliales. Les cellules gliales sont composées des astrocytes, des oligodendrocytes, des cellules de Schwann et de la microglie. Elles permettent le bon fonctionnement du système nerveux central et forment un système de régulation dans le cerveau. Elles servent notamment de support aux neurones, en les protégeant et en leur apportant nutriments et oxygène.

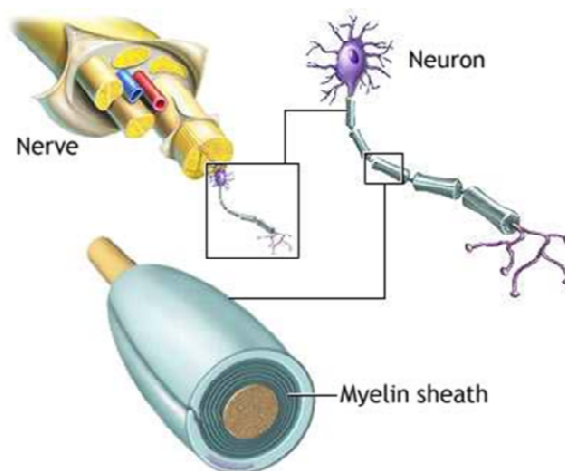


Figure L. Schéma de l'organisation des neurones au cœur du système nerveux. Les neurones sont prolongés par des axones qui sont entourés de couches de myéline. Image copiée de http://www.pennmedicine.org/health_info/body_guide/reftext/html/nerv_sys_fin.htm

Les neurones permettent de transmettre, analyser et stocker les informations dans le cerveau. Ils doivent être reliés entre eux afin de transmettre des signaux. Un influx nerveux (signal électrique) se déplace dans le neurone jusqu'à la synapse, qui libère des neurotransmetteurs. Ces molécules chimiques transmettent le signal nerveux à un autre neurone de deux manières, par les dendrites ou les axones. Les dendrites sont une extension du corps cellulaire et forment un réseau proche du neurone (autour de 100 μm) qui reçoit les informations des cellules sensorielles proches, ou des neurones voisins. Les axones permettent la communication avec des neurones à plus longue distance (jusqu'à plusieurs mm chez le rongeur). Les axones sont généralement entourés d'une gaine de myéline (figure L), et organisés en paquet de fibres axonales myélinisées, formant ainsi la matière blanche. Ces connections relient les parties du cerveau entre elles, et forment un réseau de connectivité complet.

Tissus cérébraux

Les tissus cérébraux se divisent en trois parties : la matière blanche, la matière grise, et les ventricules.

Les ventricules sont un ensemble de cavités qui produisent et contiennent le liquide céphalo-rachidien. Le liquide céphalo-rachidien permet une protection mécanique du système nerveux contre les chocs, il évacue les déchets moléculaires provenant du cerveau et il contient des cellules du système immunitaire.

La matière grise est composée des corps cellulaires de l'arbre dendritique des neurones ainsi que de certaines cellules gliales. Elle a pour rôle de recevoir les messages, analyser les informations et élaborer des réponses adaptées.

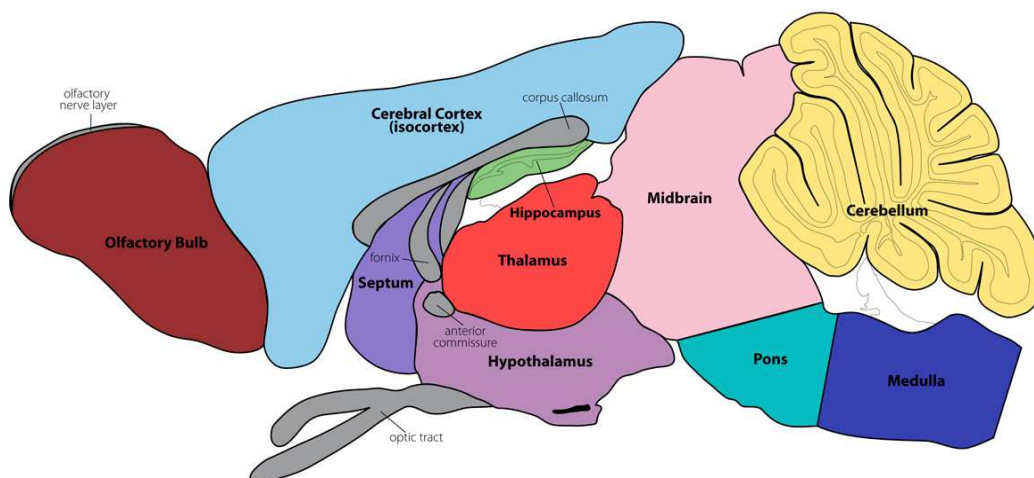


Figure M. Coupe sagittale d'un cerveau de souris. Les principales structures du cerveau sont détaillées, avec notamment en gris les structures de la matière blanche (corps calleux, fornix, commissure antérieure et tract optique).

Par rapport à la matière grise, la matière blanche apparaît blanchâtre au microscope à cause des gaines de myéline qui entourent les axones. La matière blanche est composée de paquets de fibres axonales qui connectent les zones du cerveau entre elles. Les fibres d'associations relient des régions d'un même hémisphère du cortex cérébral. Les commissures (corps calleux, fornix, commissures antérieure, postérieure et habénulaire) joignent les deux hémisphères entre elles. Les fibres de projections relient différentes parties du cortex aux noyaux gris centraux et vers la moelle épinière. Ainsi, la matière grise constitue les principales structures du cerveau, reliées entre elles par la matière blanche, comme observé dans la figure M.

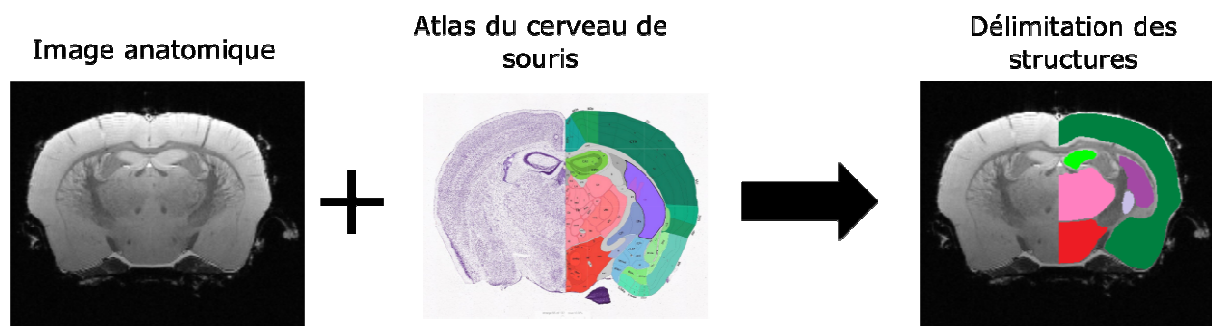


Figure N. Processus de délimitation des principales structures du cerveau. Dans le but d'obtenir des résultats de volumétrie sur les principales structures du cerveau (chapitre 3), des régions d'intérêt sont tracées à la main sur les images IRM à haute résolution spatiale. Puis, l'Allen brain atlas (<http://mouse.brain-map.org/>), atlas du cerveau de souris, est utilisé pour délimiter au mieux les différentes structures sur toutes les coupes coronales du cerveau : vert foncé = cortex, vert clair = hippocampe, rouge = hypothalamus, rose = globus pallidus, violet = striatum, gris = thalamus.

En pratique, les structures du cerveau étaient délimitées sur les images IRM en traçant des régions d'intérêt à la main, en s'aidant d'atlas de neuroanatomie de souris ou de rat et en suivant les conseils de biologistes et neuroscientifiques. Pour la tractographie, les structures principales de matière blanche apparaissent avec un bon contraste sur les images IRM et sont plus faciles à délimiter. Pour les structures de la matière grise, la procédure est décrite dans la figure N.

Résumé

Cette thèse a pour but de développer des techniques en imagerie par résonance magnétique (IRM) afin de détecter des altérations neurologiques à l'échelle microscopique dans des modèles animaux. Deux modèles chez la souris ont été étudiés en particulier: le modèle Glioblastome humain et le modèle MAP6, apparenté à la schizophrénie. Les méthodologies développées ont été centrées autour de l'IRM du tenseur de diffusion (DTI) 3D rapide et à haute résolution spatiale pour des applications *ex vivo* et *in vivo* chez le rongeur. Dans le modèle Glioblastome, la migration de cellules tumorales dans le corps calleux a été précocement détectée et quantifiée alors qu'aucun signe n'était visible sur les IRM anatomiques classiques. La tractographie, imagerie des fibres de la matière blanche, a permis d'identifier des déficits de certains tracts et de leurs connectivités dans le modèle MAP6. Des altérations inhomogènes ont été détectées, avec en particulier une réduction drastique de la voie cortico-spinale, résultats mettant en exergue le rôle primordial de la protéine MAP6 lors de la neuromorphogénèse. La méthode « Super Résolution » développée puis appliquée *in vivo* aux souris MAP6, a permis d'obtenir en moins d'une heure une imagerie de tractographie comparable à celle obtenue *ex vivo* (en 59h), ce qui ouvre la voie à des suivis longitudinaux *in vivo* pour des études du développement du cerveau ou de l'évaluation de nouvelles thérapies. D'autre part, une méthode IRM cellulaire *in vivo* quantitative a été mise en place. Le principe repose sur la mesure combinée des relaxivités cellulaires *in vitro* (pouvoir à réduire les temps de relaxation T_2^* , T_2 et T_1) pour convertir les trois paramètres de la relaxation *in vivo* en concentrations cellulaires. En utilisant le modèle de gliome U87 et des cellules U937 marquées magnétiquement, les résultats ont montré qu'une très large gamme de concentrations cellulaires peut être quantifiée et que la biodistribution des cellules U937 autour de la tumeur est hétérogène, information essentielle pour étudier l'efficacité d'une thérapie cellulaire.

Abstract

This thesis aims to develop magnetic resonance imaging (MRI) techniques to detect neurological damage at the microscopic level in animal models. Two mouse models were examined in particular human glioblastoma model (Glioblastoma) and a schizophrenia mouse model (MAP6 model). The methodologies developed were centered around 3D fast diffusion tensor imaging (DTI) with high spatial resolution for *ex vivo* and *in vivo* applications in rodents. In Glioblastoma model, the migration of tumor cells in the corpus callosum was early detected and quantified while no signs were visible on conventional anatomical MRI. Tractography identified deficits of some tracts and their connectivity in the MAP6 model. Inhomogeneous alterations were detected, especially with a drastic reduction of the corticospinal pathway. These results highlight the crucial role of the MAP6 protein in the brain development. The "Super Resolution" post-processing was developed and applied *in vivo* to MAP6 mouse model. Tractography imaging comparable to that obtained *ex vivo* (in 59h) was obtained in less than one hour, paving the way for *in vivo* longitudinal studies as brain development studies or evaluation of new therapies. On the other hand, a *in vivo* cellular MRI method has been established. The principle is based on the combined measurement of cell relaxivities *in vitro*, to obtain *in vivo* cell concentrations based on relaxation parameters. Using the U87 glioma model and U937 magnetically labeled cells, the results showed that a wide range of cell concentrations can be quantified and the biodistribution of U937 cells around the tumor is heterogeneous, information essential to study the effectiveness of cell therapy.