



HAL
open science

Développement de l'imagerie IRM de diffusion pour la caractérisation des atteintes neuropathologiques induites par les radiations ionisantes chez un modèle murin

Laura Hottier Mouton

► **To cite this version:**

Laura Hottier Mouton. Développement de l'imagerie IRM de diffusion pour la caractérisation des atteintes neuropathologiques induites par les radiations ionisantes chez un modèle murin. Imagerie. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASS062 . tel-03311500

HAL Id: tel-03311500

<https://theses.hal.science/tel-03311500>

Submitted on 1 Aug 2021

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.

Développement de l'imagerie IRM de diffusion pour la caractérisation des atteintes neuropathologiques induites par les radiations ionisantes chez un modèle murin

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 575, electrical, optical, bio :
physics and engineering (EOBE)
Spécialité de doctorat : Imagerie et Physique médicale
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, BAOBAB,
91191 Gif-sur-Yvette, France
Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 9 juillet 2020, par

Laura HOTTIER MOUTON

Composition du jury :

Emmanuel Moysé Professeur des universités, Université François Rablais (Tours)	Président
Rafi Benotmane Directeur de recherche, SCK-Cen (Bruxelles)	Rapporteur & Examineur
Samuel Valable Directeur de recherche, ISTCT (Caen)	Rapporteur & Examineur
Emmanuel Durand Professeur des universités, BioMaps (Orsay)	Examineur
Denis Le Bihan Directeur de recherche, NeuroSpin (Gif-sur-Yvette)	Directeur de thèse
Fawzi Boumezbeur Ingénieur-chercheur, NeuroSpin (Gif-sur-Yvette)	Co-encadrant de thèse
François Boussin Directeur de recherche, LRP (Fontenay-aux-Roses)	Invité
Elodie Pérès Ingénieure-chercheuse, ISTCT (Caen)	Invitée

*"I can't change the direction of the wind,
but I can adjust my sails
to always reach my destination."*

James Dean (1931-1955)

Remerciements

Ce n'est sans doute pas très orthodoxe de commencer ses remerciements en évoquant un autre laboratoire. Cependant, cette thèse a été tout d'abord possible par les liens étroits entretenus entre les ingénieurs-chercheurs de MIRCen et de NeuroSpin. Je tiens donc à remercier Julien Valette, qui a encadré mon stage de M2 et conduit vers Fawzi Boumezbeur, mon encadrant de thèse. Par la même occasion, je souhaiterais adresser mes remerciements à mes anciens collègues de MIRCen, avec qui j'ai initié mon expérience en IRM et qui m'ont donné envie de poursuivre et de m'engager dans une thèse dans ce domaine de recherche.

Mon sujet de thèse se trouvant à l'interface de la neuroimagerie et de la radiobiologie, j'ai pu bénéficier d'un environnement scientifique d'exception au sein de deux laboratoires : NeuroSpin et le Laboratoire de RadioPathologie (LRP). Je tiens donc à remercier chaleureusement les membres avec lesquels j'ai pu interagir dans ces deux laboratoires.

Je souhaite remercier distinctement toutes les personnes qui m'ont encadré au cours de cette thèse. Je pense tout d'abord à Denis Le Bihan, mon directeur de thèse, pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ma thèse au sein de NeuroSpin. Malgré votre implication dans divers projets à travers le monde, vous avez su vous rendre disponible pour mon travail et à l'écoute de mes questions (parfois naïves) en IRM de diffusion. J'ai acquis une certaine autonomie ainsi qu'un regard critique vis-à-vis de mes résultats scientifiques grâce à vous.

Je pense également à Fawzi Boumezbeur qui a endossé bien plus que le rôle d'encadrant de thèse. Merci de m'avoir accompagné dans les réussites comme dans les échecs de la thèse. Même avec une vision du monde un peu pessimiste parfois (au vu de certains sujets que l'on a abordé à la cantine ou à la cafet'), tu as toujours été optimiste pour le projet et su me proposer des solutions aux problèmes que j'ai pu rencontrer. Tu as toujours su trouver les mots pour me remotiver et me redonner confiance pour mener jusqu'au bout cette thèse. Je te dois en grande partie, la qualité de mes travaux de thèse et communications scientifiques.

Je souhaite remercier François Boussin pour m'avoir accueilli au LRP. Nos échanges m'ont permis de combler (au moins en partie) mes lacunes en biologie ainsi que de mieux cerner la problématique biologique du sujet, même si les points de vue entre les biologistes et les physiciens peuvent diverger. Je te remercie pour la richesse de tes idées ainsi que pour ton engagement envers le projet.

J'aimerai également remercier Elodie Pérès, qui est à l'origine de ce projet de thèse et qui est restée impliquée malgré ses obligations professionnelles. Merci pour avoir été présente au début de ma thèse et pour m'avoir mis le pied à l'étrier en me faisant participer à ta dernière session d'acquisitions à NeuroSpin. Merci pour ton oreille attentive ainsi que pour tout le soutien que tu as pu m'apporter, notamment à la fin de la thèse avec les multiples relectures du manuscrit.

J'aimerai remercier les Drs Rafi Benotmane et Samuel Valable pour avoir évalué mon manuscrit de thèse ainsi que les Drs Emmanuel Moyse et Emmanuel Durand pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse. Merci pour vos remarques pertinentes et constructives qui m'ont permis d'améliorer la qualité de ce manuscrit.

Je souhaite remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation des travaux de ma thèse. Je vais dans un premier temps commencer par les membres du LRP : Olivier Etienne et Justyne Vetel. Merci Olivier pour tout le travail (très chronophage) que tu as accompli pendant plus de trois ans, que ce soit les irradiations, les études histologiques, comportementales ou les corrections du manuscrit et des articles en préparation. De la même façon, je tiens à remercier Justyne pour avoir réalisé les études histologiques et comportementales présentées dans ce manuscrit.

Du côté de NeuroSpin, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont pu manipuler les souris, si précieuses pour le projet. Merci Wilfried Pianezzola pour avoir effectué avec sérieux les multiples transports et allers-retours entre Fontenay-aux-Roses et Saclay. Merci aux « maîtres » de l'expérimentation animale : Boucif Djemaï et Erwan Selingue (tu vois je l'ai bien écrit). « Maîtres » d'une part parce qu'ils connaissent tous les gestes et bonnes pratiques pour l'installation des animaux dans l'IRM et le monitoring lors des acquisitions et d'autre part parce qu'ils m'ont appris ces gestes. Grâce à vous, j'ai pu mener en toute autonomie (ou presque) et sécurité mes sessions acquisitions. Merci également à Françoise et à Erwan pour les nombreux services rendus à la fin des acquisitions. Françoise, j'aimerai aussi te remercier pour avoir partagé tes connaissances histologiques et tes hypothèses biologiques toujours très pertinentes lors de nombreuses discussions.

J'ai également énormément appris au cours de ma thèse en analyse de données IRM auprès de David Barrière et de Ricardo Magalhães. Merci pour avoir partagé avec moi vos connaissances, vos outils, vos codes et subtiles astuces. Grâce à vous, je sais comment analyser des données IRM anatomiques, de diffusion et fonctionnelles et faire de magnifiques figures 3D.

J'aimerai également remercier tous les chercheurs avec lesquels j'ai eu l'opportunité d'interagir, de discuter ou de présenter mes résultats : Sébastien, Benoît, Luisa, Anthony, Jean-Luc, Cyril

Tom, merci d'avoir partagé ton bureau avec moi. J'ai pu bénéficier à la fois de tranquillité et de compagnie grâce à toi lors de la rédaction de ce manuscrit.

Les moments de détente autour des pauses café, des repas à la cantine ou des pique-niques ont été une bulle d'oxygène et de réconfort pendant ces années de thèse. Merci

Erwan pour tes conseils Netflix (tadam!) et tes mythiques blagues (je voulais perpétuer la tradition). Merci Françoise pour tes recettes aussi bien culinaires que cosmétiques et tes délicieux gâteaux qui ne font même pas culpabiliser. Merci Sébastien pour tes qualités de chercheurs mais aussi de manager d'équipe (parfois un peu dissipée lors des pauses café). Merci Benoît d'avoir initié un esprit de compétition avec les membres de l'équipe en nous inspirant des cooking challenges grâce aux fameux muffins (ou cookies?). Sans oublier les doctorants et post-doctorants qui se sont succédés au cours de ma thèse (Hermès, Allegra, David, Ricardo, Gabrielle, Matthieu, Solenne, Jacques, Pauline, Solène, Roxane, Rénata, Bruno, Davide, Justine, Kévin, Alexandre, Raïssa, Ivy, et bien d'autres ...) avec qui j'ai pu échanger à la console IRM, à la cafet', ou à l'occasion du Neurobreakfast ou d'un afterwork. Merci à mes collègues, mais aussi amies, Pauline et Solenne pour m'avoir fait lever très tôt pour aller nager et m'avoir donné envie de reprendre la course à pieds et surtout pour tout le soutien et réconfort que vous m'avez apporté.

Le dernier volet de ces remerciements s'adresse à mes proches. Merci à vous les filles (Hélène, Sabrina, Mathilde), de me soutenir depuis le lycée et d'avoir toujours cru en moi. Vous avez toujours été présentes et su me rebooster. Merci à la Philou Team (Alexandre, Loïc, Jordan, PC, PD, Mathilde, Emilie, Bertille, Sarah) pour m'avoir aidé à décompresser à l'occasion de nombreuses soirées.

Merci à mes parents et grands-parents, vous m'avez inculqué les valeurs essentielles et apporté toujours ce dont j'avais toujours besoin. Merci d'avoir accepté mes choix et mon départ vers la capitale pour m'épanouir professionnellement et scientifiquement. Merci d'avoir toujours cru en moi et pour tous les week-ends réconfortant passés à vos côtés, en famille.

Merci à ma petite sœur, et son conjoint Gaëtan, pour les week-ends et vacances ressourçantes passées ensemble sur l'île de Ré ou en Alsace. Vous m'avez accordé une merveilleuse parenthèse avec la naissance de Siméon. Il a été en partie mon moteur au cours de cette dernière année de thèse.

Merci à ma belle famille et en particulier à mes beaux-parents pour leur soutien et leur investissement. Vous avez toujours été volontaires et su répondre présents au quotidien, mais aussi dans les moments plus tendus, que ce soit pour la préparation du pot de thèse ou pour une nième relecture du manuscrit.

Merci à Clément, mon mari, pour sa confiance, ses encouragements au quotidien, ses mots rassurants, son amour sans faille. Mais aussi pour toute la logistique de l'appartement que tu as mené d'une main de maître et qui m'a permis de me consacrer entièrement à la rédaction. Merci pour tous les bons repas concoctés, les montagnes de linge lavé et repassé mais aussi pour tous les codes débogés. Sans ton aide précieuse, je n'aurai jamais découvert jupyter et ses notebooks pour analyser mes données, et le fichier .tex de ce manuscrit serait sans doute encore avec pas mal de warnings et d'erreurs. Tu m'as donné assez de courage pour surmonter les montagnes corses (GR20) mais aussi pour tenir bon face à la complexité (scientifique et psychologique) de la thèse. Merci mon doudou!

Table des matières

Liste des abbréviations	1
1 Introduction	4
2 Dommages biologiques induits par les rayonnements ionisants et leurs détections par IRM	7
2.1 Les rayonnements ionisants	7
2.1.1 Généralités	7
2.1.2 Grandeurs dosimétriques	9
2.1.3 Les sources d'expositions aux rayonnements ionisants	11
2.2 Conséquences de l'exposition aux rayonnements ionisants sur l'organisme .	14
2.2.1 Découvertes des premiers effets biologiques	14
2.2.2 L'effet dose des rayonnements ionisants sur les tissus biologiques . .	15
2.2.3 Effets répertoriés dans les études épidémiologiques	18
2.2.4 Cas particulier de l'exposition <i>in utero</i>	20
2.3 Mécanismes biologiques	21
2.3.1 Interactions rayonnement-matière	21
2.3.2 Mécanismes directs et indirects	22
2.3.3 Lésions moléculaires radio-induites	22
2.3.4 Facteurs influant la réparation des lésions à l'ADN	24
2.3.5 Cas particulier du cerveau en développement	28
2.4 L'apport de l'imagerie en radiopathologie cérébrale	32
2.4.1 Études d'imagerie cellulaires et tissulaires (microscopie)	32
2.4.2 Études d'imagerie <i>in vivo</i> sur les modèles animaux	37
2.4.3 Études chez les patients	37
2.5 Bilan	39
3 L'imagerie par résonance magnétique de diffusion : origine, séquence et modèles	52
3.1 La diffusion des spins : du mouvement brownien à la diffusion restreinte et anisotrope	52
3.1.1 Cas idéal de la diffusion libre	53
3.1.2 La diffusion en milieu biologique	54

3.2	Séquence et modèles de l'IRM de diffusion	56
3.2.1	La séquence PGSE	56
3.2.2	Artefacts majeurs en IRM de diffusion	57
3.2.3	Modèle de diffusion gaussienne	59
3.2.4	Modèle de diffusion non gaussienne	60
3.2.5	Modèle de diffusion anisotrope	68
3.2.6	Diffusion anisotrope et S-Index	72
4	Contributions méthodologiques apportées au cours de la thèse	79
4.1	Présentation des équipements	79
4.1.1	Irradiateur	79
4.1.2	Équipements IRM	80
4.2	Protocole IRM et optimisations des paramètres d'acquisition	81
4.2.1	Les différentes étapes du protocole	81
4.2.2	Installation et set-up animal	82
4.2.3	Réglages pré acquisitions	82
4.2.4	Séquence anatomique : Multi Gradient Echo vs Turbo RApid Imaging with Refocusing Echoes	84
4.2.5	Séquence de diffusion	86
4.3	Optimisation des paramètres d'acquisition pour la séquence de diffusion	88
4.3.1	Objet-test utilisé et méthode mise en œuvre	88
4.3.2	Validation du protocole	91
4.4	Définition automatique des régions d'intérêt	92
4.4.1	Atlas et références anatomiques	92
4.4.2	Prétraitement des données IRM avant le recalage	96
4.4.3	Recalage	101
4.5	Analyse par régions d'intérêt	102
4.5.1	Paramètres volumétriques	102
4.5.2	Paramètres de diffusion	102
4.5.3	Tests statistiques	107
4.6	Bilan	107
5	Effets des radiations ionisantes à forte dose sur le cerveau en développement : validation des apports méthodologiques	111
5.1	Matériels et méthodes	111
5.1.1	Protocole d'irradiation et effectifs de l'étude	111
5.1.2	Analyses	112
5.2	Résultats	114
5.2.1	L'irradiation <i>in utero</i> à forte dose (1 Gy) provoque une apoptose élevée des cellules cérébrales chez l'embryon	114

5.2.2	L'irradiation <i>in utero</i> à forte dose (1 Gy) n'impacte pas à long terme le comportement des souris adultes	115
5.2.3	Atrophies cérébrales radio-induites à long terme chez la souris lors d'une irradiation <i>in utero</i>	116
5.2.4	Les atteintes microstructurelles radio-induites à l'âge adulte dans le modèle souris irradié au stade embryonnaire	117
5.2.5	Substance grise	117
5.2.6	Substance blanche	121
5.2.7	Atteintes structurelles radio-induites observées <i>ex vivo</i> par histologie	122
5.3	Discussion	124
5.4	Conclusion	129
6	Caractérisation par IRM des effets cérébraux induits par l'inhibition du gène Xlf dans un modèle de souris transgénique radiosensible	135
6.1	Matériels et méthodes	135
6.1.1	Description du modèle souris Xlf ^{-/-}	135
6.1.2	Effectifs de l'étude	137
6.1.3	Protocole d'acquisition IRM	139
6.1.4	Analyses	140
6.2	Résultats	141
6.2.1	L'absence du gène Xlf provoque une faible apoptose chez l'embryon 4h	141
6.2.2	L'absence de gène Xlf provoque des altérations comportementales chez la souris adulte	141
6.2.3	L'absence du gène Xlf induit des atrophies chez les souris adultes .	143
6.3	L'absence du gène Xlf ne modifie pas la microstructure cérébrale chez la souris	145
6.3.1	Substance grise	145
6.3.2	Substance blanche	146
6.4	Discussion	148
6.5	Conclusion	150
7	Effets des radiations ionisantes à faible dose sur le cerveau en développement	154
7.1	Matériels et méthodes	154
7.1.1	Protocoles d'irradiation et effectifs de l'étude	154
7.1.2	Protocole d'acquisition IRM	155
7.1.3	Analyses	155
7.2	Résultats	157
7.2.1	Apoptose précoce radio-induite par l'exposition à de faibles doses .	157

7.2.2	L'impact à l'âge adulte sur le comportement des souris irradiées <i>in utero</i> à faible dose	158
7.2.3	Altérations volumétriques estimées à l'âge adulte chez les souris irradiées à faible dose	159
7.2.4	Altérations de la microstructure cérébrale estimée à l'âge adulte chez les souris irradiées à faible dose	162
7.2.5	Substance blanche	167
7.3	Discussion	170
7.4	Conclusion	175
8	Conclusion et perspectives	177
A	Liste des publications et communications	183
B	Introduction physique de l'imagerie par résonance magnétique	185
B.1	La résonance magnétique nucléaire	185
B.1.1	Les applications basées sur le principe de la résonance magnétique nucléaire	185
B.1.2	De l'aimantation microscopique ($\vec{\mu}$), à l'aimantation macroscopique (\vec{M})	186
B.2	Expérience canonique de résonance magnétique	188
B.2.1	Excitation radiofréquence	188
B.2.2	Évolution de l'aimantation au cours du temps	189
B.2.3	Équation générale et référentiels	190
B.2.4	Le signal RMN	193
B.2.5	Les temps caractéristiques de relaxation T_1 , T_2 , T_2^*	194
B.2.6	La méthode d'écho de spin	195
B.3	De la RMN à l'IRM	196
B.3.1	L'ajout de gradients de champ magnétique	196
B.3.2	Encodage spatial du signal IRM	197
B.3.3	La séquence d'écho de gradient	202
B.3.4	La séquence d'écho de spin	203
B.3.5	Principaux contrastes en IRM	204
C	Tests de comportements : Matériels et méthodes	209
C.1	Effectifs	209
C.2	Test de l'"open field"	209
C.3	Test du "Three-chamber test for sociability and social recognition"	210
C.4	Tests statistiques	211
D	Protocoles d'immuno-histologie	213
D.1	Apoptose à court-terme chez l'embryon	213

D.2	Calcul d'aire et de densité cellulaire à long terme chez la souris adulte . . .	214
D.3	Analyses statistiques	216
E	Article en préparation :	
	"Non-invasive assessment of whole brain radiosensitivity following <i>in utero</i> irradiation in mice : an anatomical and diffusion MRI study"	217
F	Article en préparation :	
	" Impaired brain development and behavior of Xlf null mice linked to chromosome instability-induced premature neurogenesis"	253

Liste des abréviations

AD diffusivité axiale.

ADC coefficient de diffusion apparent.

ADN acide désoxyribonucléique.

AVC accident vasculaire cérébral.

BO bulbe olfactif.

Cc corps calleux.

CC3 caspase 3 clivée ou "cleaved caspase 3".

CDB cassures double-brin.

Cer cervelet.

CSB cassures simple-brin.

CSE cellules souches embryonnaires.

CSPN cellules souches et progéniteurs neuronaux.

Ctx cortex.

DAPI 4',6 diamidino-2-phénylindole.

DKI imagerie du tenseur de Kurtosis.

DSI imagerie du spectre de diffusion.

DTI imagerie du tenseur de diffusion.

EPI "echo planar imaging".

ERO espèces réactives de l'oxygène.

ERR excès de risque relatif.

eV électron-volts.

FA fraction d'anisotropie.

FDG fluorodésoxyglucose.

FID signal de précession libre.

GD gyrus denté.

GE écho de gradient.

HARDI diffusion à haute résolution angulaire.

Hip hippocampe.

HR recombinaison homologue.

Htl hypothalamus.

IMRT "intensity-modulated radiation therapy".

IRM imagerie par résonance magnétique.

IVIM "intra voxel incoherent motion".

KO "knock-out".

LCS liquide cérébrospinal.

MB mésencéphale.

MD diffusivité moyenne.

MGE "multi gradient echo".

NHEJ suture non homologue des extrémités clivées.

OF "open field".

PCR réaction de polymérisation en chaîne ou "polymerase chain reaction".

PGSE "pulsed gradient spin echo".

RD diffusivité radiale.

RF radiofréquences.

RI rayonnements ionisants.

RMN résonance magnétique nucléaire.

ROI régions d'intérêt.

SB substance blanche.

SD écart type.

SE écho de spin.

SEM erreur standard de la moyenne.

SG substance grise.

SI S-Index.

SNR rapport signal sur bruit.

spectroscopie RMN spectroscopie par résonance magnétique nucléaire.

Str striatum.

TE temps d'écho.

TEMP tomographie par émission monophotonique.

TEP tomographie par émission de positons.

TF transformée de Fourier.

Thal thalamus.

TR temps de répétition.

TurboRARE "turbo rapid imaging with refocusing echoes".

ZSV zone sous-ventriculaire.

Chapitre 1

Introduction

Moins d'un an après la découverte des rayons X en 1895 par Wilhelm Röntgen, les premières applications voient le jour. Ces rayons sont par exemple utilisés pour l'analyse des œuvres d'art et trouvent rapidement un intérêt majeur dans le domaine médical (le champ de la "radiologie" sera créé en 1928). Le diagnostic et le suivi de certaines pathologies comme la tuberculose devinrent ainsi possibles par rayons X, ainsi que des applications thérapeutiques comme le traitement des tumeurs et des lupus. Mais rapidement des effets secondaires sont observés chez certains chercheurs, techniciens ou encore des patients qui présentent des brûlures cutanées ou développent des cancers. C'est en raison de ces effets délétères sur la santé que la radiopathologie devient un domaine à part entière de recherche. Outre les rayons X, les rayonnements ionisants (RI) regroupent par définition les rayonnements alpha (α), bêta (β) et gamma (γ) dont l'énergie est supérieure à 33 électron-volts (eV) et se distinguent par la nature de l'interaction avec la matière qu'ils traversent.

Depuis, les RI font partie de l'arsenal de la médecine moderne dans le cadre de l'imagerie médicale (scanner X, tomographie par émission de positons (TEP), tomographie par émission monophotonique (TEMP)) et de la radiothérapie des cancers (protonthérapie, hadronthérapie, curiethérapie). Dans ce contexte médical, une proportion significative de la population est amenée à être exposée aux RI avec une dose allant de 0,1 à 30 mGy pour une radiographie (selon l'organe et la technique) à 60 Gy (dose cumulée) pour le traitement d'un glioblastome. Dans le cas particulier du traitement des tumeurs cérébrales, d'importants déficits cognitifs apparaissant dans les semaines et mois suivant la radiothérapie ont été reportés chez certains patients. Ces effets indirects causés par les RI sur le cerveau sont d'autant plus néfastes que l'exposition se déroule au cours de son développement, avec des conséquences majeures à moyen et long terme telles que l'avortement spontané, le retard mental, la diminution du quotient intellectuel, l'épilepsie ou l'induction de cancers.

Au-delà de la problématique de la radiothérapie en neuro-oncologie, la radiopathologie s'intéresse de façon plus générale aux conséquences nuisibles d'une exposition pour la santé. Différents cas d'exposition aux RI peuvent être explicités de façon non exhaus-

tive comme : (i) l'exposition chronique des travailleurs (travailleurs nucléaires, personnels soignants, personnel navigant aérien, astronautes); (ii) l'exposition accidentelle à la suite d'un accident nucléaire comme par le passé pour la centrale de Tchernobyl et plus récemment celle de Fukushima pour le personnel et les populations avoisinantes; (iii) l'exposition naturelle par les rayonnements cosmiques qui bombardent continuellement la Terre. Toutes les catégories de la population sont donc concernées, y compris les enfants et les femmes enceintes pour qui l'enjeu est d'autant plus important que les conséquences à long terme ont le temps de se manifester. Sans compter que des cas d'expositions moins terre à terre sont à envisager avec la reprise de la conquête spatiale (Mars, Neptune) ou le "tourisme" spatial orbital ou lunaire. La question de l'exposition aux RI se pose alors plus que jamais.

Les études épidémiologiques ont été la première source de connaissances en radiopathologie cérébrale chez l'Homme. Des études sur des cohortes d'enfants ayant subi une radiothérapie ou ayant été exposés de façon accidentelle au cours de catastrophes nucléaires, ont été menées de façon longitudinale et non invasive (neuroimagerie et tests cliniques) pour établir à long terme les effets néfastes des RI sur les tissus sains ou les tissus tumoraux chez les patients. Toutefois ces études épidémiologiques ont leurs limites (en particulier l'impossibilité de contrôler les conditions d'irradiation des populations exposées), d'où la nécessité de disposer d'autres types d'études. D'une part des études *in vitro* ont été menées sur des lignées cellulaires (de cellules souches ou différenciées) humaines ou animales afin d'établir les mécanismes de radiosensibilité (ou de radiorésistance) des divers types cellulaires en fonction de divers protocoles d'irradiation (dose, source, débit...) en étudiant la survie cellulaire et les altérations génétiques (mutations, cassures de l'ADN, micronoyaux). D'autre part des modèles animaux ont été étudiés, en particulier des modèles murins *ex vivo* afin de mieux apprécier les atteintes cellulaires et les mécanismes de réparation de l'ADN ou de compensation qui se mettent en place suite au stress cellulaire radio-induit notamment au cours du développement cérébral. Ces études précliniques ont ainsi permis d'évaluer l'impact de protocoles de radiothérapie sur le fœtus ou l'individu au stade juvénile, de les optimiser et de maximiser le rapport bénéfice-risque lié à cette option thérapeutique. Plus récemment, le développement de l'imagerie *in vivo* et en particulier de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) a permis en conjonction des caractérisations comportementales d'étudier de façon non invasive les effets délétères des RI. Ces études *in vivo* et les modalités telles que l'IRM permettent également de positionner la recherche en radiopathologie dans un contexte de recherche translationnelle et de travailler à l'identification de biomarqueurs de l'atteinte cérébrale liée aux RI et leur transfert à la recherche clinique.

Dans ce contexte, les équipes de recherche de NeuroSpin (CEA, DRF, JOLIOT, NeuroSpin, UNIRS devenu BAOBAB en 2020) et du Laboratoire de Radiopathologie (CEA, DRF, JACOB, IRCM, LRP) travaillent depuis 2014 au développement de l'imagerie de diffusion et à son application pour la caractérisation des atteintes neuropathologiques

induites par les RI chez la souris. Une première étude a ainsi été réalisée validant la pertinence de cette approche et en particulier la sensibilité de l'IRM de diffusion aux altérations microstructurelles consécutives à une exposition à forte dose (3x5 Gy) de souris adultes. Ce travail de thèse se positionne dans la continuité de cette étude avec des doses moindres et a pour objectif de mettre en place une méthodologie (acquisition et traitement des images) optimisée et semi-standardisée de manière à permettre une exploration sur le cerveau entier des altérations microstructurelles dans la substance grise et la substance blanche radio-induites à faibles doses de RI sur le cerveau en développement (*in utero* et juvénile) chez la souris.

Après avoir introduit les dommages biologiques consécutifs à l'exposition aux RI (chapitre 2), les principes de l'IRM de diffusion sont présentés dans le chapitre 3. Le chapitre 4 est consacré aux développements méthodologiques propres réalisés au cours de cette thèse ainsi qu'à la présentation des équipements utilisés pour nos études *in vivo*. Une première étude consacrée à la validation de notre approche IRM sur un contrôle positif (souris exposées *in utero* à 1 Gy) est présentée dans le chapitre 5. Notre deuxième étude, décrite dans le chapitre 6, concerne la caractérisation par cette même approche IRM d'un modèle de souris radiosensible (mutation *Xlf*^{-/-}) original développé par le LRP. Enfin le chapitre 7 présente notre étude des effets d'une irradiation *in utero* ou post-natale à 100 mGy chez la souris sauvage ou radiosensible.

Chapitre 2

Domages biologiques induits par les rayonnements ionisants et leurs détections par IRM

La radiobiologie vise à étudier les conséquences biologiques entre les rayonnements ionisants (RI) et les tissus biologiques à différentes échelles. Dans un premier temps, ce chapitre se focalise sur les connaissances physiques des mécanismes d'interactions des RI dans les milieux biologiques. Dans un second temps, un état des lieux des dommages biologiques radio-induits sera établi à la fois sur les méthodes employées et les connaissances apportées par les études menées sur des cellules, des modèles animaux et des cohortes de patients.

2.1 Les rayonnements ionisants

2.1.1 Généralités

Les rayonnements correspondent à une émission d'énergie sous la forme d'ondes ou de particules subatomiques. Il existe deux types de rayonnements : les ionisants et les non ionisants. Ils se différencient par l'énergie qu'ils transportent (Figure 2.1). En effet, les rayonnements sont dits ionisants lorsque l'énergie qu'ils transportent est suffisante pour ioniser les atomes de la matière qu'ils traversent, c'est-à-dire leur arracher un ou des électrons. Une énergie de première ionisation de l'ordre de quelques électron-volts (eV), peut être comprise dans la gamme d'énergie des rayonnements ultraviolets (UV) lointains. Par convention, pour s'affranchir des rayons UV dans la catégorie des RI, le seuil d'énergie est fixé à 33 eV, c'est-à-dire l'énergie de première ionisation des molécules d'eau.

Dans ce manuscrit, seuls les RI (UV exclus) seront considérés. Ces rayonnements sont issus d'atomes instables qui présentent un excès d'énergie ou de masse. Pour atteindre leurs états d'équilibre, les atomes se désintègrent et relâchent cet excès sous forme ondulatoire (pour les rayons X et γ) ou corpusculaire (pour les désintégrations α et β) (Donya

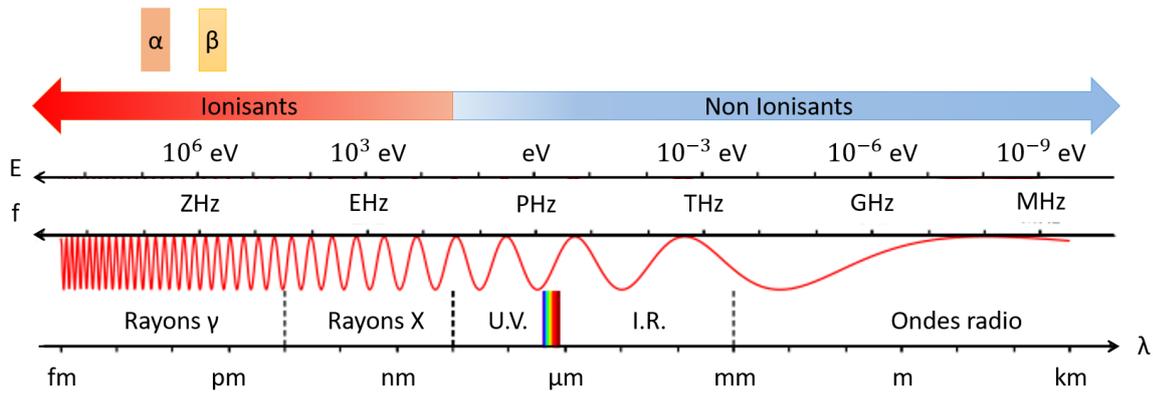


FIGURE 2.1 – Spectre électromagnétique en fonction de l'énergie (E), la fréquence (f) et la longueur d'onde (λ). Les RI comprennent les rayons X, γ , α et β . La gamme d'énergie des RI de type α et β est également représentée.

et al., 2014). La Table 2.1 résume les caractéristiques des particules chargées et rayonnements électromagnétiques possibles. Les rayons X et γ , également appelés rayonnements photoniques (ν) se distinguent par leur origine. Les photons X sont émis à l'occasion d'une transition énergétique entre orbitales électroniques. Initialement, un faisceau d'électrons est propagé sur une cible métallique. La réorganisation des électrons du cortège électronique des atomes cibles, généralement métalliques, s'effectue et génère des rayons X. Le rayonnement γ survient à la suite de la désintégration α ou β d'un noyau atomique instable. En effet, lorsqu'un noyau instable émet l'une de ces particules, le noyau fils est souvent dans un état excité. Le rayonnement γ est alors émis au cours de la désexcitation du noyau (exemples : $^{60}\text{Cobalt}$, $^{137}\text{Césium}$), mais peut également être le produit d'une réaction de fusion : $^2_1\text{H} + ^1_1\text{H} \rightarrow ^3_2\text{He} + \nu_\gamma$.

D'autre part, les neutrons, particules lourdes et non chargées, peuvent également pénétrer la matière et interagir avec ses noyaux. Le rayonnement neutronique est émis lors de la fusion ou la fission nucléaire, c'est-à-dire les phénomènes d'activation sur lesquels repose le fonctionnement des réacteurs nucléaires. L'activation peut également être amenée avec des protons. Comme le reporte la Table 2.1, les RI sont utilisés à la fois dans le domaine médical à travers les radiothérapies et les diagnostics par rayons X, tomographie par émission monophotonique (TEMP) ou tomographie par émission de positons (TEP) mais aussi dans le milieu industriel (Commission et al., 1996; Waltar, 2003).

Il existe deux voies d'irradiation : l'exposition externe et la contamination. L'exposition externe se définit par une irradiation qui s'effectue à l'extérieur de l'organisme. À l'inverse, la contamination se définit par la pénétration d'une matière radioactive dans l'organisme (par ingestion, inhalation ou voie cutanée). Les conséquences sont liées à la probabilité d'interactions des rayonnements avec les tissus biologiques et donc le pouvoir pénétrant de ces rayonnements. Par conséquent, les rayonnements α et β étant très peu pénétrants ne présentent, en général, pas de danger en cas d'irradiation externe puisque leur pénétration

RI	Réaction	$\frac{A}{Z}\text{X}$	Applications
α	a) $\frac{A}{Z}\text{X} \rightarrow \frac{A-4}{Z-2}\text{Y} + \frac{4}{2}\text{He}$	^{223}Ra ^{241}Am $^{238}\text{Pu}, ^{90}\text{Sr}$ ^{210}Po	Radiothérapie métabolique (os) DéTECTEURS de fumée Sources d'énergie Élimination électricité statique
	a') $\frac{A}{Z}\text{X} + \frac{4}{2}\text{He} \rightarrow \frac{A+4}{Z+2}\text{Y} + \nu$		
β^+	a) $\frac{A}{Z}\text{X} \rightarrow \frac{A}{Z-1}\text{Y} + \frac{0}{+1}\text{e} + \bar{\nu}_e$		
	a') $\frac{0}{+1}\text{e} + \frac{0}{-1}\text{e} \rightarrow 2\nu$	$^{18}\text{F}, ^{15}\text{O}$ $^{13}\text{N}, ^{11}\text{C}$	TEP
β^-	a) $\frac{A}{Z}\text{X} \rightarrow \frac{A}{Z+1}\text{Y} + \frac{0}{-1}\text{e} + \nu_e$	$^{131}\text{I}, ^{89}\text{Sr}, ^{153}\text{Sm}$	Radiothérapie métabolique
	b) $\frac{A}{Z}\text{X} \rightarrow \frac{A}{Z+1}\text{Y}^* + \frac{0}{-1}\text{e} + \nu_e$		
	b') $\frac{A}{Z+1}\text{Y}^* \rightarrow \frac{A}{Z+1}\text{Y} + \nu$		
γ	a) $\frac{A}{Z}\text{X}^* \rightarrow \frac{A}{Z}\text{X} + \nu$	$^{99}\text{Tc}, ^{201}\text{Tl}$ $^{123,131}\text{I}, ^{133}\text{Xe}$ W, Cu, Mo ^{125}I	TEMP Scanner X Dosage de protéines (RIA)
	b) $\frac{A}{Z}\text{X} + \frac{0}{-1}\text{e} \rightarrow \frac{A}{Z-1}\text{X} + \nu$		
	c) $\frac{A}{Z}\text{X} + \frac{A'}{Z'}\text{Y} \rightarrow \frac{A+A'}{Z+Z'}\text{W} + \nu$	$^2_1\text{H} + ^3_1\text{H}$	Fusion nucléaire (étoiles)
	d) $\frac{A}{Z}\text{X} + \frac{1}{0}\text{n} \rightarrow \frac{A'}{Z'}\text{Y} + \frac{A''}{Z''}\text{W} + \nu$	^{235}U	Fission (Source d'énergie)

TABLE 2.1 – Les rayonnements ionisants issus de la désintégration d'un atome $\frac{A}{Z}\text{X}$. TEP : Tomographie par Émission de Positons, TEMP : Tomographie par Émission Monophotonique, RIA : "Radio-Immuno-Array". Ra = Radium ; Am = Américium ; Pu = Plutonium ; Sr = Strontium ; Po = Polonium ; F = Fluor ; O = Oxygène ; N = Azote ; C = Carbone ; I = Iode ; Sm = Samarium ; Tc = Technécium ; TI = Thallium ; Xe = Xénon ; W = Tungstène ; Cu = Cuivre ; Mo = Molybdène ; U = Uranium. La radiothérapie métabolique correspond à l'administration d'un radiopharmaceutique par voie intraveineuse ou orale pour une action systémique et ciblée.

est faible. En revanche, ils sont néfastes en cas de contamination puisqu'ils déposent toute leur énergie sur une faible distance. Au contraire, les rayons X et γ sont plus pénétrants et présentent donc un risque important en cas d'irradiation externe (Commission et al., 1996).

2.1.2 Grandeurs dosimétriques

La quantification de l'irradiation est réalisée à l'aide de différentes grandeurs dosimétriques définies dans la Table 2.2.

Les doses équivalentes et efficaces font intervenir les facteurs de pondération du rayonnement w_R et de sensibilité du tissu w_T . Les valeurs de ces facteurs sont reportées dans les Tables 2.3 et 2.4. En pratique les doses équivalentes (H) et efficaces (E) sont utilisées dans des contextes de radioprotection. Par exemple pour le tissu cérébral exposé à des rayonnements de type γ , la dose efficace (E) est calculée selon la formule suivante à partir

Grandeur	Concept	Unité
Activité (A)	Nombre de désintégrations par seconde	Becquerel (Bq)
Dose absorbée (D)	Quantité d'énergie absorbée par la matière par unité de masse	Gray (Gy) 1Gy=1J/kg
Dose équivalente (H)	Dose absorbée relative à un rayonnement : $H = D \times w_R$	Sievert (Sv)
Dose efficace (E)	Dose équivalente relative à un tissu : $E = H \times w_T$	Sievert (Sv)

TABLE 2.2 – Principales grandeurs dosimétriques utilisées pour la quantification des rayonnements ionisants.

Rayonnement	Facteur w_R
α	20
β	1
γ	1
X	1
neutrons < 10 keV	5
10-100 keV	10
100 - 2 MeV	20

TABLE 2.3 – Valeurs du facteur de pondération du rayonnement (w_R) en fonction du RI considéré. La valeur du facteur w_R pour les rayonnements α , β , γ et X ne varie pas en fonction de l'énergie.

Organes	Facteur w_T
Gonades	0,2
Moelle épinière, Poumons, Estomac, Colon	0,12
Foie, Thyroïde	0,05
Peau, Os	0,01
Autres (dont cerveau)	0,05

TABLE 2.4 – Valeurs du facteur de pondération de sensibilité tissulaire (w_T) en fonction de l'organe exposé.

de la dose absorbée (D) :

$$E = w_R \times w_T \times D = 1 \times 0,05 \times D = 0,05 \times D.$$

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous utiliserons la dose absorbée D exprimée en Gy, principalement utilisée en radiobiologie, plutôt que les doses équivalente ou efficace qui sont calculées en radioprotection. Le calcul de dose n'est pas aussi trivial que présenté dans la Table 2.2 puisqu'il dépend du paramètre évalué ainsi que de la technique utilisée. De nombreuses techniques existent dans la littérature (Ainsbury et al., 2011). Parmi elles, les techniques biologiques sont généralement basées sur l'observation des gènes, des protéines et des cellules sanguines alors que les études physiques reposent sur des études de la résonance magnétique des électrons ou des études de simulations numériques.

2.1.3 Les sources d'expositions aux rayonnements ionisants

Pour mieux apprécier le contexte des RI, il est utile d'examiner les différentes sources auxquelles la population est soumise de manière naturelle ou artificielle (Figure 2.2).

Sources naturelles

L'organisme est exposé de façon naturelle et chronique aux sources de RI de faible dose présentes dans les sols, l'eau, l'air et l'alimentation (Ramachandran, 2011). Parmi ces sources dites naturelles, on peut citer les rayons telluriques issus des minerais contenant des isotopes radioactifs tels que le $^{232}\text{Thorium}$, l' $^{235}\text{Uranium}$ ou l' $^{238}\text{Uranium}$ dont les demi-vies sont de l'ordre du milliard d'années. L'eau de source, provenant des roches souterraines, contient également ces radioéléments. Les produits alimentaires que nous consommons (produits laitiers, viandes, poissons, végétaux) sont eux aussi légèrement radioactifs par la présence de $^{40}\text{Potassium}$ ou de $^{14}\text{Carbone}$. Le $^{222}\text{Radon}$ est un élément radioactif gazeux de la filiation de l' $^{238}\text{Uranium}$. Il s'agit d'un émetteur α à courte demi-vie (3,8 jours) et est particulièrement présent dans les caves, les vallées et les mines d'uranium. La Figure 2.2 résume les différentes sources naturelles et médicales qui contribuent à l'exposition annuelle des RI pour la population française. En moyenne l'exposition annuelle d'un individu est estimée autour de 2,5 mSv en France. Les comportements individuels (tabagisme, consommation de poisson, le nombre d'heures de vol) ainsi que l'environnement influencent la dose annuelle reçue. Par exemple les rayons cosmiques ont un impact plus important en altitude qu'au niveau de la mer : la dose d'irradiation double tous les 1500 m d'altitude.

Sources artificielles

Une multitude d'applications, médicales et industrielles, utilisent les RI (Waltar, 2003). Par exemple, la production d'énergie par les centrales nucléaires repose sur les sources

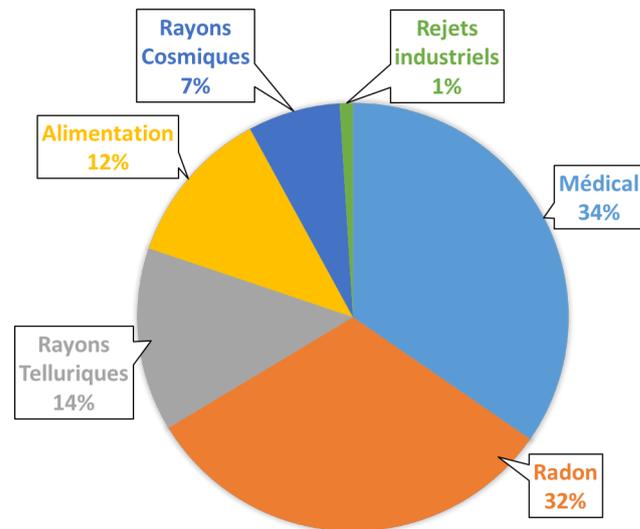


FIGURE 2.2 – Contributions des sources d'exposition d'origine naturelle et artificielle (médicales et industrielles) pour la population française en 2015. Source : IRSN.

radioactives pour fonctionner. En aéronautique, la radiographie industrielle est une technique qui vise à contrôler les matériaux en termes de qualité (soudure, fissure). Dans le domaine de l'agroalimentaire et des cosmétiques, l'irradiation des produits est mise en œuvre pour leur conservation. Les contrôles de sécurité emploient également les rayons X pour vérifier de façon non destructive le contenu des bagages ou des colis. En médecine, l'irradiation du matériel médical et pharmaceutique est mise en œuvre pour leur stérilisation.

Il existe principalement trois catégories d'expositions artificielles :

- l'exposition des travailleurs concerne les personnes employées dans les industries, les cabinets de radiologie, les hôpitaux. Ces personnes ont un suivi dosimétrique et leur exposition est limitée à 20 mSv par an. Pour les personnels navigants aériens, une limite d'exposition est également préconisée à 20 mSv par an.
- l'exposition médicale liée à des outils diagnostiques (rayons X, scintigraphie, TEP) et thérapeutiques (radiothérapie) irradie les patients pour lesquels la balance bénéfices/risques pèse en faveur de l'utilisation des RI.
- l'exposition accidentelle peut survenir en cas de catastrophe nucléaire, comme par le passé, à Tchernobyl (1986) ou à Fukushima (2011).

Un panorama d'exemples d'expositions d'origine artificielle est donné sur la Figure 2.3 avec les ordres de grandeur de doses correspondants (exprimés en mSv).

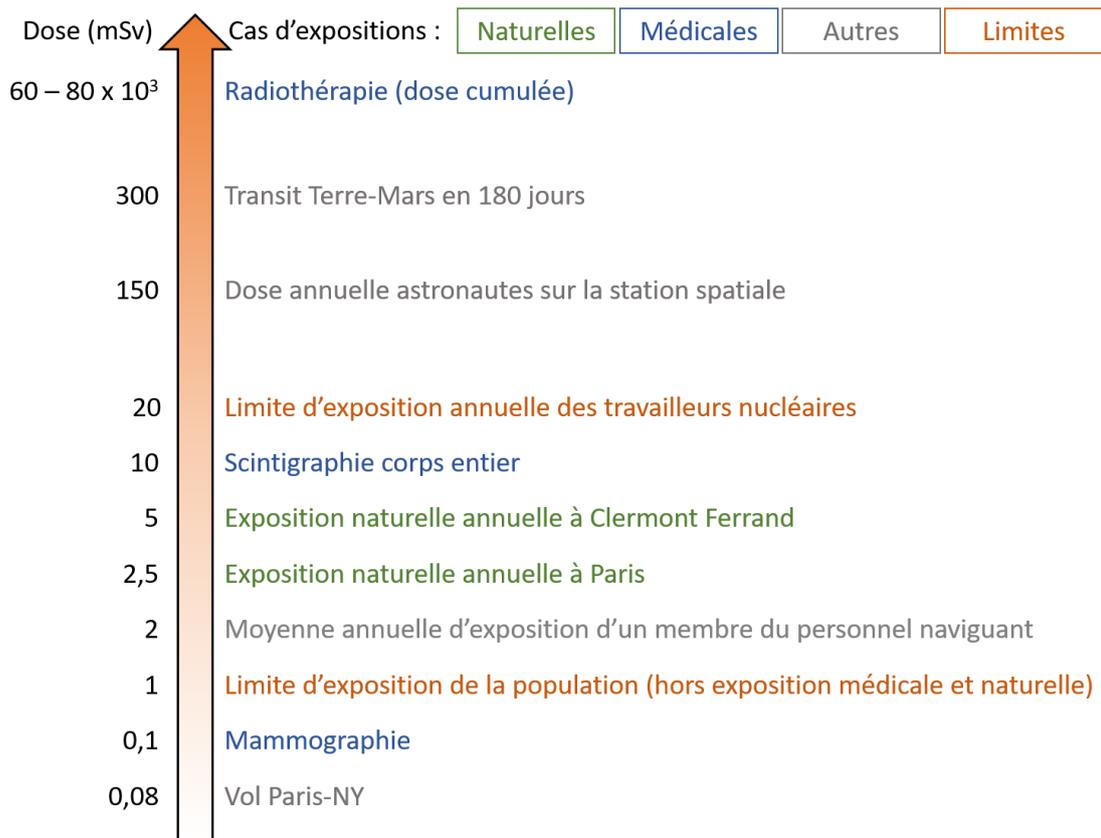


FIGURE 2.3 – Ordres de grandeur de la dose absorbée en millisievert pour des expositions naturelles (vert), médicales (bleu) ou autres (gris). Les limites d'expositions sont également indiquées en orange. Sources : Vakil (2017); W. Lloyd et Townsend (2019), IRSN (<http://www.inrs.fr/risques/rayonnements-ionisants/exposition-aux-risques.html>).

2.2 Conséquences de l'exposition aux rayonnements ionisants sur l'organisme

2.2.1 Découvertes des premiers effets biologiques

Après la découverte de la radioactivité naturelle par Henri Becquerel en 1896, puis du radium et du polonium en 1898 par les époux Curie, les premières observations de brûlures radio-induites sont rapportées en 1901 (Hevesy, 1984; Reed, 2011). Pour l'anecdote, il est rapporté que Becquerel découvrit de manière fortuite une brûlure au niveau de l'abdomen qu'il a associé à la présence d'un sachet de sel de radium dans la poche de sa montre à gousset. Cette observation fut confirmée par Pierre Curie qui volontairement mit son avant-bras en contact direct avec un sachet de sel de radium. Ils communiquèrent alors leurs observations en 1901 dans un compte-rendu à l'Académie des Sciences. Malgré cette mise en garde, le radium fut utilisé pour sa valeur curative notamment dans les lésions cutanées (lupus, verrues, cors), les tumeurs ORL et thyroïdienne, mais aussi pour sa valeur analgésique (eczémas, psoriasis et zona). L'utilisation du radium en France se poursuivit jusqu'à son interdiction par décret en 1976.

Les premiers effets de l'irradiation au radium à l'échelle d'une cohorte se manifestèrent aux États-Unis dans les années 1920. Les "Radiums Girls" étaient employées pour des travaux de peinture sur les cadrans de montres et d'horloges. Elles manipulaient la peinture radioactive luminescente qu'elles fabriquaient à partir de sels de radium. En plus de la poussière de radium auxquelles elles étaient exposées, elles ingéraient quotidiennement de la peinture radioactive en effilant leur pinceau du bout de leurs lèvres. Aucune mesure de radioprotection n'était instaurée à cette époque. Quelques années plus tard, l'exposition chronique du radium engendra chez ces femmes l'apparition de symptômes tels que des nécroses de la mâchoire ou des fractures spontanées des os. Certaines d'entre elles déclarèrent un cancer des os (Cohen et Kim, 2017).

Les rayons X également se sont vus attribuer des effets biologiques délétères peu de temps après leur découverte en 1895 par Wilhelm Röntgen. Le premier cas de cancer cutané fut déclaré chez un manipulateur de rayons X en 1902. Il s'en suivit d'autres déclarations de cancers chez les pionniers de la radiologie (manipulateurs, radiologues, médecins...). En dépit de la valeur diagnostique démontrée notamment pour la tuberculose pulmonaire, différents cas de cancers ont été rapportés chez les patientes irradiées à des doses élevées (800 à 900 mGy) à l'origine des rayons X (Reed, 2011).

2.2.2 L'effet dose des rayonnements ionisants sur les tissus biologiques

Le régime des faibles et des fortes doses d'irradiation

Divers facteurs physiques influencent les effets biologiques des rayonnements ionisants : la nature du rayonnement, sa dose, son débit de dose et son énergie. Les courbes représentées sur la Figure 2.4 représentent l'excès de risque relatif (ERR) par unité de dose absorbée (D). Cet indice correspond à l'augmentation de risque d'être atteint d'une pathologie, ici le cancer, dans une cohorte de personnes irradiées par rapport à une population non exposée. On distingue deux régimes :

- Le régime linéaire ($ERR \propto D$) et sans seuil pour les doses supérieures à 100 mGy, définies par le terme "fortes doses". Ce modèle a notamment été établi à partir des données épidémiologiques représentées sur la Figure 2.4 par les carrés rouges. Dans ce régime, le nombre de cellules lésées augmente avec la dose. Plus le nombre de lésions à l'intérieur des cellules est élevé, plus les systèmes de réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) mènent à des réparations non fidèles. En absence d'apoptose, des mutations génétiques s'accumulent dans les cellules, lesquelles peuvent être à l'origine de l'apparition d'un cancer radio-induit. Au contraire, en présence d'apoptose le nombre de réparations fautives diminue par l'élimination des cellules mutées, mais appauvrit le tissu en cellules ce qui accélère le vieillissement.
- Le régime pour les doses inférieures ou égales à 100 mGy, définies par le terme "faibles doses". Dans cette gamme dosimétrique, les études épidémiologiques présentent soit une puissance statistique trop faible, soit une absence d'effet statistique détecté. En effet, seules des études réalisées à partir de cohortes de populations naturellement exposées à ces niveaux de doses (Inde, Chine) et vivant dans des conditions similaires pourraient obtenir la puissance statistique nécessaire à l'établissement de l'ERR dans cette gamme dosimétrique. Jusqu'à maintenant cette partie de la courbe est alors extrapolée à partir des données épidémiologiques récoltées à plus fortes doses, suivant différents modèles représentés par les courbes a, b, c et d.

L'établissement de la courbe effet-dose pour les faibles doses d'irradiation est un domaine de recherche actif en radiobiologie. La relation linéaire représentée en gris sur la Figure 2.4 a été introduite en 1960 par l'ICRP ("International Commission of RadioProtection") n'est pas représentative de ce qui est retrouvé dans les modèles cellulaires et animaux (ICRP, 2004). En général, la relation trouvée peut être curvilinéaire (a et b), avec un seuil apparent (c) ou un effet hormésis (réponse adaptative) (d).

Les courbes (a) et (b) reflètent l'effet bystander des RI qui correspond à des effets à proximité des cellules irradiées sur les cellules non irradiées (Mancuso et al., 2012; Schöllnberger et al., 2007). En effet les cellules non irradiées en contact ou proches des cellules exposées aux RI peuvent présenter des dommages à l'ADN (cassures, mutations et in-

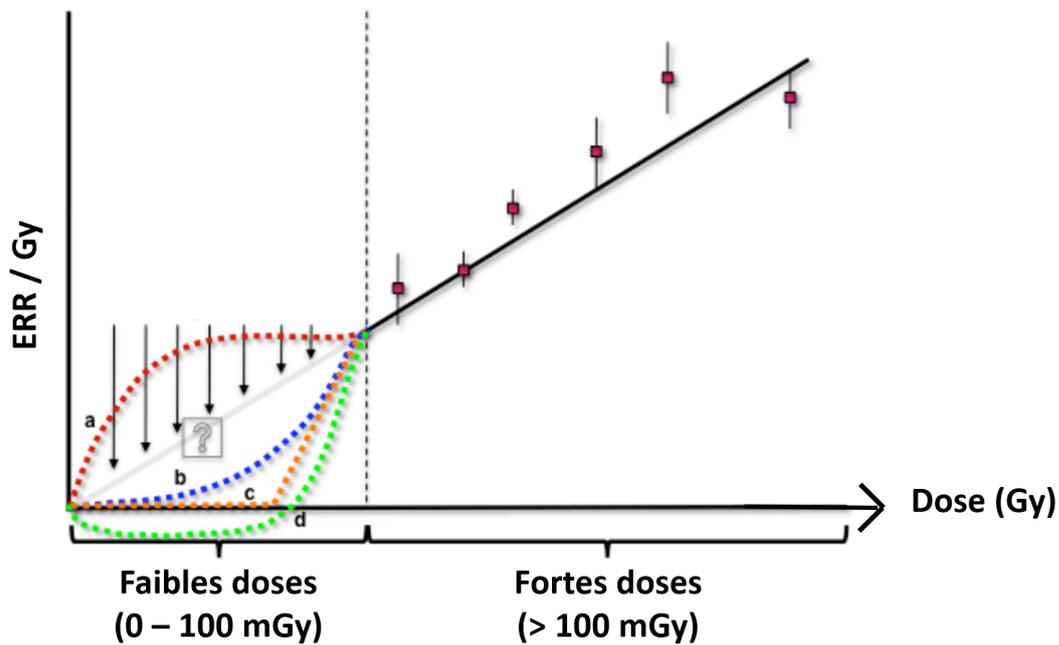


FIGURE 2.4 – Estimation des effets à long terme de l'exposition à de faibles doses à partir d'une extrapolation des données obtenues par des irradiations fortes doses. Figure inspirée de Mancuso et al. (2012). Les carrés rouges représentent la moyenne et l'écart-type des données épidémiologiques. Les courbes pointillées (a) en rouge, (b) en bleue, (c) en orange et (d) en vert sont les résultats d'ajustement de courbes avec un sur risque, un sous-risque, un effet de seuil et une réponse adaptative, respectivement, des organismes face aux RI.

stabilité génétique), lesquelles peuvent conduire selon les conditions à la survie ou à la mort cellulaire. Des études réalisées par des irradiations avec microfaisceaux de milieux conditionnés ont mis en évidence que l'origine des effets bystander pourrait s'expliquer par le passage d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), de cytokines ou d'organites intracellulaires par les jonctions intercellulaires entre les cellules irradiées et non irradiées. De plus, les ERO et les cytokines produites par les cellules non irradiées pourraient être sécrétées dans le milieu extracellulaire et agir sur les cellules non exposées aux RI. Cet effet bystander est caractérisé de néfaste ou protecteur selon les conséquences sur les cellules. L'effet néfaste se traduit par une augmentation de l'ERR pour une même dose d'irradiation (courbe a). De façon réciproque, les cellules irradiées dépendent des cellules saines voisines potentiellement capables d'inhiber le développement de cellules mutées. Cet effet bystander protecteur se traduit par une diminution de l'ERR pour une même dose d'irradiation (courbe b).

La courbe (d) décrit une diminution puis une augmentation de l'ERR dans la gamme des faibles doses. Ce phénomène est appelé hormésis ou réponse adaptative. En cas de préconditionnement aux RI à des doses très faibles, des mécanismes de protection sont activés de manière à être plus efficace au moment d'une irradiation à dose plus élevée. L'effet d'hormésis se traduit par une stimulation des défenses antioxydantes (Bernal et al., 2013) et des réponses du système immunitaire (Ina et Sakai, 2005) permettant respectivement de réduire les dommages de l'ADN des cellules irradiées et de favoriser l'élimination des cellules endommagées. L'effet bystander est alors protecteur et est à l'origine de la réduction de l'ERR.

La courbe orange (c) correspond à une courbe linéaire avec un seuil. L'apparition d'un seuil se justifie par l'élimination ou la réparation fidèle des cellules lésées. À ce jour, la valeur du seuil à partir duquel les effets radio-induits apparaissent n'a pas encore été déterminée.

Ces deux types de régimes (faibles et fortes doses) sont associés à deux catégories d'effets : les effets déterministes et les effets stochastiques.

Effets déterministes

Les effets à incidence déterministe sont caractérisés par une dose seuil d'exposition à partir de laquelle ces effets apparaissent. En général, ils se déclarent précocement et leurs sévérités augmentent avec la dose reçue. Ils sont généralement causés par la mort radio-induite des cellules et engendrent une perte fonctionnelle du tissu ou de l'organe irradié, pouvant mener au décès de l'individu. Les effets déterministes dépendent également du type d'irradiation : globale ou localisée. Par exemple, les brûlures décrites dans la sous-section précédente (2.2.1) font partie des effets déterministes engendrés par une irradiation localisée. Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi de nous focaliser sur les effets de l'irradiation corps entier dont les effets déterministes sont recensés dans la Table 2.5.

Les syndromes hématopoïétique (ou de la moelle épinière), gastro-intestinal et cérébro-

D (Gy)	Effets
0,5	Cataracte, opacité du cristallin
0,3 - 1	Nausées, vomissements, fatigue, maux de tête
1 - 3,5	Épilation provisoire, syndrome hématoïétique
3,5 - 5,5	LD ₅₀
5 - 7	Stérilité définitive
5,5 - 7,5	Syndrome gastro-intestinal (infections)
7,5 - 10	Atteinte pulmonaire
10 - 15	Syndrome cérébro-vasculaire : convulsions, coma, décès

TABLE 2.5 – Effets déterministes recensés, après une seule exposition corps-entier, en fonction de la dose absorbée (D, en Gy). LD₅₀ : dose létale pour laquelle 50% des individus décèdent. Sources : International Commission on Radiological Protection (1984, 1990, 1992, 2007).

vasculaire se manifestent plus généralement sous le nom de syndrome d’irradiation aiguë (Bazyka et al., 2018). Ils se déclenchent quelques heures à quelques semaines après une irradiation à fortes doses. D’autres organes peuvent également être atteints (rein, foie, ...) à cause d’une défaillance dans la circulation sanguine provoquée par la réponse inflammatoire de l’organisme.

Effets stochastiques

Les effets stochastiques sont des effets qui se basent sur la probabilité de la transformation d’une cellule. Ils interviennent à la fois aux faibles et aux fortes doses de RI avec un degré de gravité indépendant de la dose reçue. Ils apparaissent de manière aléatoire et souvent tardivement (plusieurs années après l’irradiation). Ils sont la conséquence des dommages à l’ADN et des mutations génétiques induites. La mutation peut porter sur un gène d’une cellule somatique, l’effet stochastique est alors cancérogène. Les études épidémiologiques ont permis de mettre en évidence certains cancers radio-induits chez des populations irradiées. Mais ces anomalies génétiques peuvent aussi être transmises aux générations futures dans le cas de mutation de gènes d’une cellule germinale, l’effet stochastique est alors héréditaire.

2.2.3 Effets répertoriés dans les études épidémiologiques

La plupart des connaissances des effets stochastiques à fortes doses (> 100 mGy) chez l’Homme sont issues des études épidémiologiques réalisées sur les cohortes de personnes exposées aux RI à la suite d’une catastrophe ou d’une attaque nucléaire correspondant donc à une irradiation corps-entier. Ces études ont pour but d’évaluer l’ERR d’une pathologie, souvent le cancer, liée aux conditions d’exposition par rapport à une cohorte témoin. Les études épidémiologiques les plus documentées sont celles portant sur les bombardements nucléaires d’Hiroshima et Nagasaki et les accidents nucléaires de Tchernobyl et de Fukushima.

Hiroshima, Nagasaki

Les survivants de l'attaque nucléaire d'Hiroshima et de Nagasaki (1945) furent exposés à un rayonnement de type neutronique à des doses élevées (Kamiya et al., 2015) :

- entre 7 Gy et 10 Gy à 1km de l'hypocentre pour Hiroshima et Nagasaki respectivement ;
- entre 13 mGy et 23 mGy respectivement à 2,5 km de l'hypocentre pour Hiroshima et Nagasaki respectivement.

Lors du suivi de ces cohortes, des cas de leucémies ont été rapportés pour les personnes présentes à proximité de l'hypocentre. L'ERR atteint sa valeur maximale entre 6 et 8 ans après l'exposition chez les enfants âgés d'une dizaine d'années, puis diminue. Chez les adultes, l'ERR reste constant avec une valeur autour de 2. Pour une dose de 1 Gy, le risque de développer un cancer radio-induit est significatif, quel que soit le type de tumeurs solides, alors que pour une dose de 100 mGy, ce risque n'est pas significatif. Outre les cancers radio-induits, ces cohortes présentent également une probabilité d'avoir un accident vasculaire cérébral (AVC), des problèmes de circulation sanguine, des difficultés respiratoires et digestives qui augmentent avec la dose reçue.

Tchernobyl

En 1986, un des réacteurs de la centrale nucléaire de Tchernobyl en Ukraine explosa. La dispersion de substances radioactives comme l'iode (^{131}I) ou le césium (^{137}Cs) dans l'atmosphère se dispersèrent dans une zone qui s'étend sur l'ex-URSS et le territoire européen. La dose de rayonnement γ absorbée varie proportionnellement avec la distance par rapport au lieu de l'explosion (Table 2.6).

Dose absorbée	Population
1 - 15 Gy	Travailleurs nucléaires et équipes de secours présentes sur le site
100 - 700 mGy	Équipes de décontamination et habitants dans un périmètre < 30 km
140 mGy	Moyenne pour les habitants dans un périmètre > 30 km
1 - 2 mGy	Autrichiens et Finlandais
<1 mGy	Autres pays européens

TABLE 2.6 – Dose absorbée (Gy) par différents types de population en fonction de la distance par rapport à la centrale nucléaire de Tchernobyl (Ae et al., 2004; Ivanov et al., 2005).

Cette catastrophe provoqua un syndrome d'irradiation aiguë pour 134 travailleurs nucléaires parmi lesquels 28 décédèrent à la suite de ce syndrome. Les études épidémiologiques fondées sur cette population ont montré des effets néfastes et stochastiques sur la santé (Kamiya et al., 2015). Parmi eux, le plus proéminent est l'augmentation de l'incidence du cancer thyroïdien chez les enfants et adolescents exposés à une dose supérieure à 1 Gy au moment de la catastrophe. L'ERR fut estimé à 1,91 en Ukraine et 2,15 en Biélorussie (Baverstock et Williams, 2006). Chez les travailleurs du nucléaire, une aug-

mentation du nombre de cancers solides a été recensée : estomac (+15%), rein (+24%), poumon (+26%), colon (+33%), vessie (+65%). Des effets non cancéreux, comme une augmentation des maladies cardiovasculaires et une diminution des fonctions cognitives furent également observées (Ivanov et al., 2005) .

Fukushima

L'accident nucléaire de Fukushima de 2011 se déclencha à la suite d'une succession d'événements naturels (séisme et tsunami). Contrairement à Tchernobyl, la population et les travailleurs ont été exposés à des doses de RI issus des sources d'iode (^{131}I) et de césium (^{137}Cs) plus faibles (< 100 mGy). La dose corps-entier estimée pour les Japonais résidants dans une zone de 20 à 30 km de la centrale nucléaire est de 10 à 50 mSv alors que la dose d'exposition naturelle annuelle est de 1 à 10 mSv (Hasegawa et al., 2015; Christodouleas et al., 2011). Cet intervalle de dose correspond alors aux faibles doses et à la partie encore non déterminée de la courbe de la Figure 2.4. Cependant, à ce jour, aucune conséquence biologique radio-induite n'a été démontrée. Le modèle dans l'intervalle des faibles doses ne peut donc pas être identifié. Les troubles psychologiques mentionnés dans diverses études, comme la dépression, l'anxiété ou les troubles du sommeil, ne sont pas des conséquences directes de l'exposition aux RI (Christodouleas et al., 2011).

Les expositions volontaires et localisées à fortes doses sont étudiées à partir des patients traités par radiothérapie (Murrell et al., 2016). Nous ne nous attarderons pas sur ces études puisqu'une partie d'entre elles seront décrites dans la section 2.4.3 portant sur les effets détectés par imagerie par résonance magnétique (IRM).

2.2.4 Cas particulier de l'exposition *in utero*

Jusqu'ici les effets des RI présentés concernaient une population constituée d'enfants et d'adultes. Or les effets radio-induits sont également tératogéniques. Ils peuvent être considérés comme une sous-catégorie des effets stochastiques somatiques. Les conséquences d'une exposition *in utero* dépendent du stade du développement de l'embryon ou du fœtus, la dose retenue pour le fœtus étant celle reçue par l'utérus. Bien qu'une faible dose (100 mGy) n'est pas atteinte en imagerie diagnostique (rayons X ou scintigraphie), ce niveau d'exposition peut être obtenu dans le cas de procédures interventionnelles pelviennes (angiographie et fluoroscopie) ou d'exposition accidentelle. La Table 2.7 répertorie les effets principaux selon le stade de gestation. Dans la cohorte des survivants des bombardements d'Hiroshima et de Nagasaki, une dose seuil entre 0,12 et 0,2 Gy a été identifiée pour le déficit mental tandis que le seuil pour les malformations de type microcéphalie n'a pas été déterminé (Schull et Otake, 1999). Par ailleurs, le risque de développer une leucémie est augmenté pour les fœtus irradiés *in utero* à une dose supérieure à 500 mGy (Schull et Otake, 1999). De même, dans la cohorte des fœtus exposés durant la catastrophe nucléaire de Tchernobyl, le risque de développer un cancer de la thyroïde est significatif par rapport aux fœtus non exposés (Neta et al., 2014).

Stade de développement	Effets
Pré implantation (0 - 2)	Avortement spontané > 100 mGy
Organogenèse (3 - 8)	Possibles malformations, retard mental, développement de cancer
Organogenèse (9 - 15)	Vulnérabilité élevée : malformations, retard mental et de croissance, développement de cancer
Histogenèse (16 - 40)	Risques faibles

TABLE 2.7 – Effets radio-induits en fonction du stade de développement embryonnaire exprimés en semaines post-conception (Schull et al., 1990; Williams et Fletcher, 2010).

Bien que ces études épidémiologiques permettent d'établir les effets radio-induits dans diverses conditions d'irradiation, elles ne permettent pas de connaître et comprendre les mécanismes biologiques impliqués. Dans la section suivante, nous nous intéresserons donc aux effets radio-induits à l'échelle cellulaire et moléculaire.

2.3 Mécanismes biologiques

2.3.1 Interactions rayonnement-matière

Tout comme l'alcool ou le tabagisme, les RI font partie des stressés environnementaux pour les cellules de l'organisme. En fonction de leur nature et leur énergie, les RI interagissent avec la matière selon plusieurs processus cités dans la Table 2.8.

Particules	Interactions	Matière
α	ionisation excitation	électrons couche K électrons peu liés
β^-	ionisation excitation rayonnement de freinage	électrons couche K électrons peu liés noyau
β^+	annihilation	électron
Photons (X et γ)	effet photoélectrique effet Compton production de paire	électrons couche K électrons peu liés noyau

TABLE 2.8 – Interactions rayonnements-matière (Podgoršak et Agency, 2005).

Les rayonnements associés à des particules interagissent avec la matière en leur transférant de l'énergie. La particule est alors ralentie de façon progressive sur sa trajectoire. Cependant les rayonnements électromagnétiques ne transfèrent que très peu d'énergie à la matière. Ils sont alors atténués selon la densité et le numéro atomique de la matière qu'ils

traversent. Ces interactions rayonnement-matière initient des réactions physico-chimiques à l'origine des effets biologiques présentés précédemment. On recense deux types de réactions : les effets directs et les effets indirects des RI sur les cellules.

2.3.2 Mécanismes directs et indirects

Lorsque leur énergie est suffisante ($> 13,6$ eV), les RI vont ioniser l'ADN, les protéines et les lipides des cellules, il s'agit des effets directs de l'ADN. Comme reporté sur la Table 2.8, ces mécanismes concernent principalement les rayonnements de type α et β , et à l'inverse, les mécanismes indirects passent par l'intermédiaire de l'ionisation de la molécule d'eau, phénomène appelé radiolyse de l'eau. Le corps étant composé à 70% d'eau, la majorité des lésions radio-induites sont dues aux effets indirects des RI. La molécule d'eau une fois excitée (H_2O^*) ou ionisée (H_2O^+), génère deux radicaux libres H^\bullet et OH^\bullet . Il s'agit de molécules ou d'atomes qui portent un électron non apparié sur leur orbitale électronique la plus externe. Ces radicaux libres diffusent à des distances assez faibles et s'apparient rapidement pour former de nouvelles espèces radicalaires :



La présence d'oxygène peut intervenir et générer d'autres espèces radicalaires telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), l'hydroperoxyde (OOH^\bullet) et les peroxydes ($ROOH$). Ces espèces radicalaires dérivées de l'oxygène, appelées ERO, sont connues pour leur cytotoxicité. L'oxygène a alors un effet radiosensibilisant puisqu'il est à l'origine de l'augmentation du nombre d'ERO présentes dans les cellules irradiées. Après irradiation, des mécanismes d'amplification génèrent une densité élevée d'ERO hautement réactives qui sont à l'origine des dommages causés de façon indirecte (Limoli et al., 2004).

2.3.3 Lésions moléculaires radio-induites

Quel que soit le mécanisme impliqué, des lésions moléculaires sont provoquées par les ERO (effet indirect) ou les RI directement dans un délai de 10^{-6} secondes.

Les premières molécules impactées par ces dommages sont les lipides présents dans les membranes plasmiques et les organites. La dégradation des phospholipides par les RI mènent à des changements membranaires (rigidité, perméabilité, intégrité). La peroxydation des lipides des membranes conduit à des altérations de la signalisation intracellulaire ainsi que des modifications de la régulation de l'expression des gènes (Nambiar et al., 2011).

Les RI vont entraîner des modifications chimiques des protéines telles que l'oxydation, la carbonylation, les clivages peptidiques ou les restructurations avec pontage. L'ensemble

Lésions	Nombre de lésions endogènes	Nombre de lésions exogènes
Pontage ADN-Protéine	≥ 10	150
Pontage ADN-ADN	8	30
Dommages de bases	3 200	2 000
Cassures simple brin	10 000 - 55 000	1 000
Cassures double brin	8	40

TABLE 2.9 – Fréquence des lésions de l'ADN induites spontanément (lésions endogènes) ou par l'exposition aux RI (lésions exogènes). Fréquence déterminée par cellule et par Gy.

de ces dommages protéiques aboutissent à une dénaturation ou à une fragmentation de la protéine endommagée (Nambiar et al., 2011).

Les RI vont également impacter la molécule d'ADN et induire différents types de lésions : des cassures simples voire doubles-brin, des altérations des bases, des pontages inter- ou intra brin et des adduits (Figure 2.5) (Reisz et al., 2014; Nambiar et al., 2011).

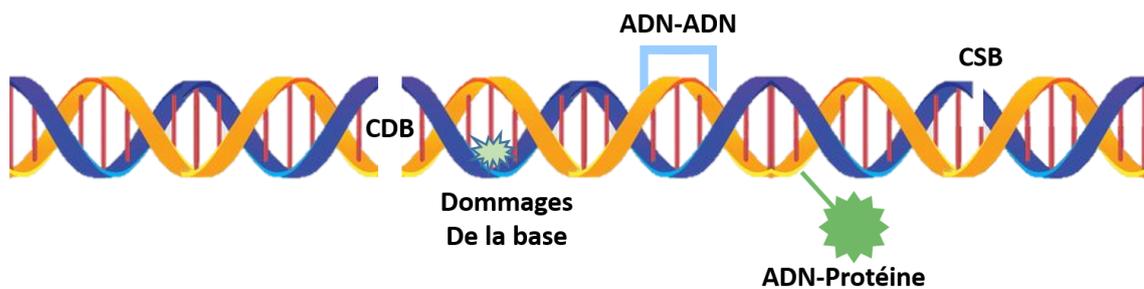


FIGURE 2.5 – Les différents types de dommages à l'ADN occasionnés par une exposition aux rayonnements ionisants. CDB : cassure double-brin ; CSB : cassure simple brin ; ADN-ADN : pont inter ou intra brins ; ADN-protéine : adduits ; dommages de la base : désamination, alkylation, oxydation, site abasique.

Les cassures double-brin (CDB) ne résultent pas de deux cassures simple-brin (CSB) localisées en regard sur les deux brins d'ADN mais sont le plus souvent causées par l'intermédiaire des ERO lorsque la direction du rayonnement passe suffisamment proche d'une molécule d'ADN. Ces différents types de lésions d'ADN radio-induites se produisent également de façon spontanée sous l'effet des radicaux libres générés par l'activité métabolique des cellules en présence de l'oxygène (métabolisme oxydatif dans les mitochondries, peroxydation des lipides). Contrairement aux radicaux libres endogènes, les radicaux libres radio-induits ne sont pas produits de façon homogène et sont hautement réactifs. La fréquence des occurrences de ces lésions spontanées et radio-induites est indiquée dans la Table 2.9.

En réponse aux dommages à l'ADN induits par les RI, une cascade d'événements est ordonnée de la sorte :

1. signalisation des dommages par les protéines détectrices (senseurs) ;

2. transmission du signal par les protéines de transduction du signal (transducteurs) ;
3. activation des protéines impliquées dans la réponse cellulaire (effecteurs). Selon le type de lésion de l'ADN détectée, différents mécanismes de réparation peuvent se mettre en place et aboutir à la survie ou à la mort de la cellule.

Bien que le nombre de CDB reste limité par rapport aux autres lésions, elles restent les plus délétères, car elles peuvent mener à une perte de l'information génétique voire à une instabilité génétique permanente.

Réparation des CDB de l'ADN

Deux principaux mécanismes sont impliqués dans la réparation des CDB : la suture non homologue des extrémités clivées (NHEJ) et la recombinaison homologue (HR) (Mao et al., 2008). Les mécanismes de réparations de l'ADN avec ces deux systèmes sont schématisés dans la Figure 2.6.

La suture (ou religation) non homologue (NHEJ) est la voie de réparation prépondérante des CDB qui est active tout au long du cycle cellulaire. Cette voie est souvent considérée comme intrinsèquement infidèle puisqu'elle peut entraîner une perte de matériel génétique. De plus, le nombre de réparations infidèles augmente avec la dose. À l'inverse, la voie HR est considérée comme plus fidèle. Par homologie, elle se base sur une chromatide sœur non endommagée pour synthétiser les brins complémentaires aux brins endommagés. Elle intervient uniquement aux phases S et G2 du cycle cellulaire.

La réponse cellulaire finale vis-à-vis des dommages affectant l'ADN se traduit *in fine* par trois situations distinctes (Figure 2.7) :

- la réparation des lésions (~ 10 minutes) ;
- la mort cellulaire (quelques heures voire quelques jours) via l'apoptose ou la catastrophe mitotique ;
- l'instabilité génomique (quelques jours à plusieurs années).

La sénescence est une autre conséquence de l'exposition aux RI qui peut se produire en cas de réparation non fidèle ou de non-réparation des CDB. Il s'agit d'un arrêt du cycle cellulaire à court terme (< 10 jours) avec ou sans raccourcissement des télomères (de Magalhães et Passos, 2018; Li et al., 2018).

2.3.4 Facteurs influant la réparation des lésions à l'ADN

Facteurs cellulaires

Le terme de radiosensibilité cellulaire est relié à la probabilité de mort cellulaire ou de mutations par unité de dose. Par opposition, la radiorésistance fait référence à la survie des cellules. La radiosensibilité cellulaire dépend de divers facteurs :

- La phase du cycle cellulaire. Malgré une incidence des lésions d'ADN équivalente au cours du cycle cellulaire, les mécanismes de réparation impliqués ne se manifestent pas de façon constante durant le cycle cellulaire. De plus, des points de

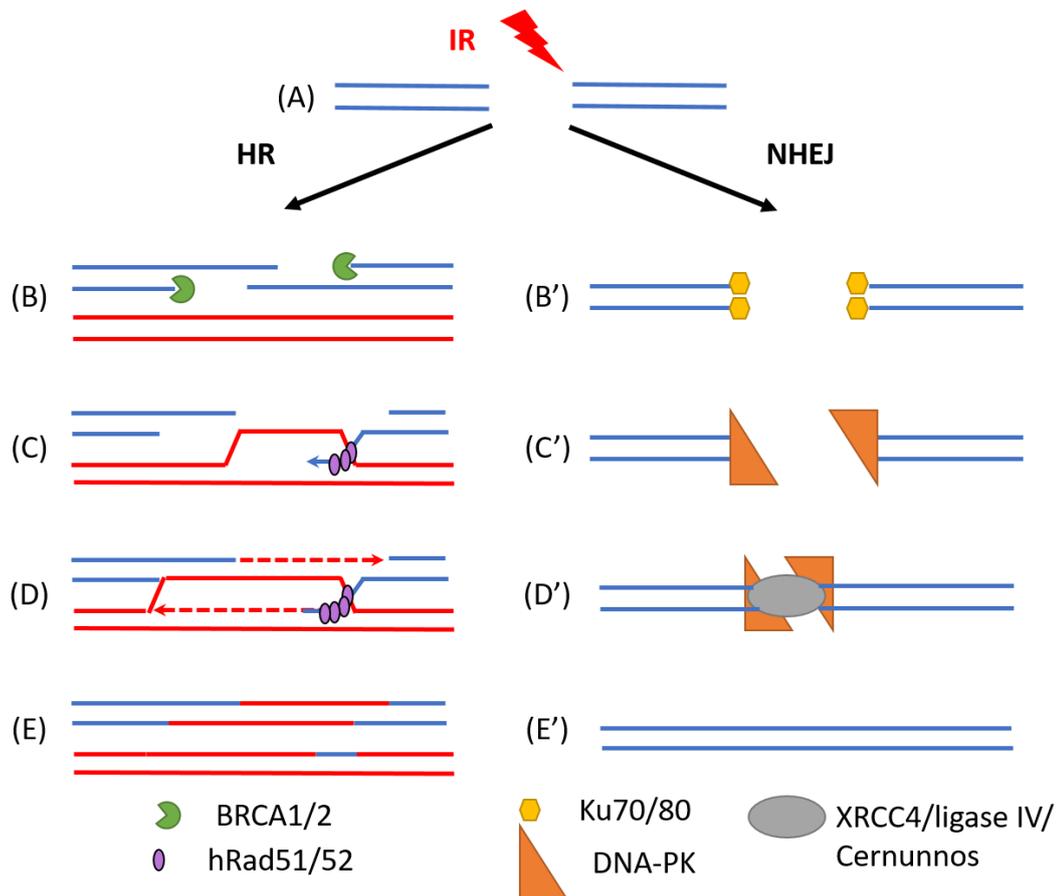


FIGURE 2.6 – Schéma des mécanismes de réparation en cas de CDB : HR (recombinaison homologue) et NHEJ (recombinaison non-homologue). (A) Les RI peuvent mener à une CDB. Pour HR : (B) Résection des extrémités 5' par BRCA1/2. (C) Stabilisation des extrémités et invasion d'une séquence homologue (brins rouges) par hRad51 et hRad52. (D) Réparation du brin d'ADN et formation d'une structure de Holliday. (E) Démantèlement de la structure Holliday avec ou sans crossing-over et CDB réparée fidèlement. Pour NHEJ : (B') Reconnaissance de la CDB et stabilisation de la structure par Ku70/Ku80. (C') Recrutement par DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase) des protéines permettant le façonnage du double-brin (endonucleases, Artemis) (D') Ligation des extrémités (XRCC4, ligase IV, Cernunnos) (E') CDB réparée de manière non fidèle (fautive) (Mao et al., 2008).

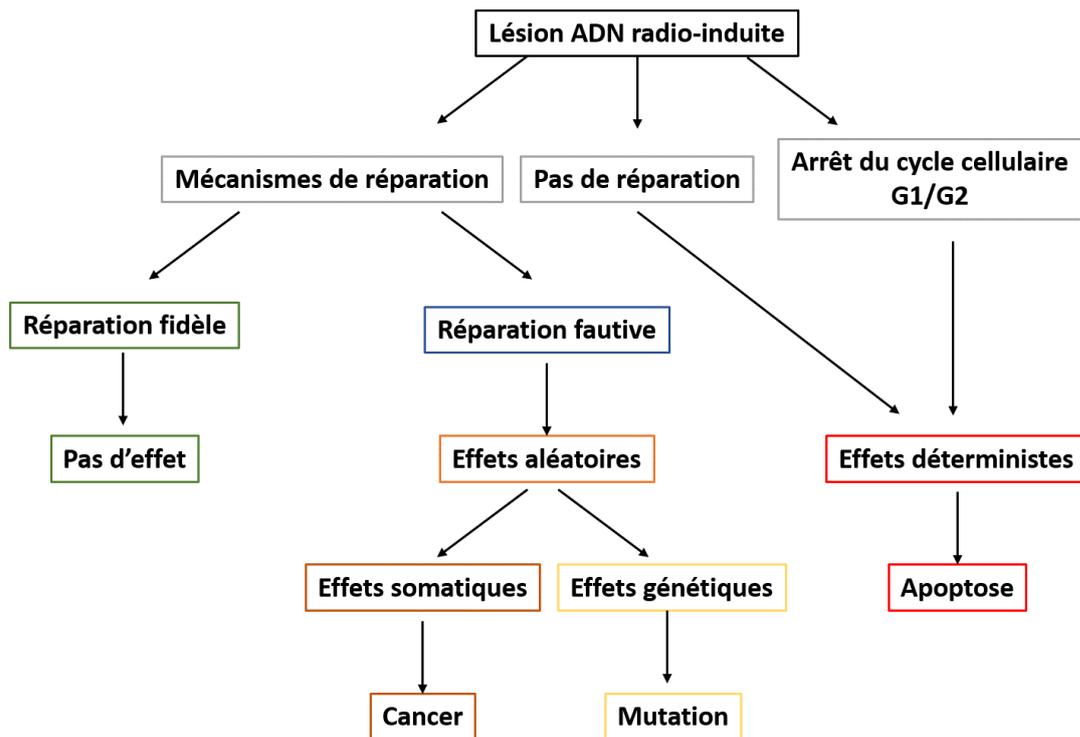


FIGURE 2.7 – Cascades d'événements : depuis la lésion ADN radio-induite jusqu'aux effets stochastiques (Kamiya et al., 2015) et déterministes (Fry, 2001).

contrôle ("checkpoints") permettent de suspendre le cycle cellulaire et d'activer les mécanismes de réparation de l'ADN (Figure 2.8).

- Les conditions d'oxygénation de la cellule : l'augmentation de radicaux libres en présence d'oxygène explique que les cellules bien oxygénées sont plus radiosensibles que les cellules hypoxiques (Lartigau et al., 2008). En revanche, il a été constaté qu'en conditions hypoxiques, la voie NHEJ est stimulée, ce qui favorise l'instabilité génétique par son infidélité.
- Le type cellulaire : la loi de Bergonié et Tribondeau (Haber et Rothstein, 1969) établit la radiosensibilité des tissus en fonction de sa capacité de division et de son degré de différenciation. D'après cette loi, les cellules souches ainsi que les progéniteurs sont particulièrement vulnérables. En effet, ces cellules sont très radiosensibles puisqu'elles présentent une forte capacité de division et sont peu différenciées.

Facteurs génétiques

Des facteurs individuels peuvent se combiner aux facteurs cellulaires et contribuer à l'accentuation ou à la diminution de la radiosensibilité. Une même dose de RI affecte les tissus de façon identique entre les individus. Néanmoins la signalisation et la réparation de ces lésions est quant à elle singulière à l'individu. Différents syndromes génétiques ont notamment été définis comme facteur de radiosensibilité tels que le syndrome A-T (Ataxia-Telangiectasia) (Borràs-Fresneda et al., 2016; Taylor et al., 1975) ou les mutations des

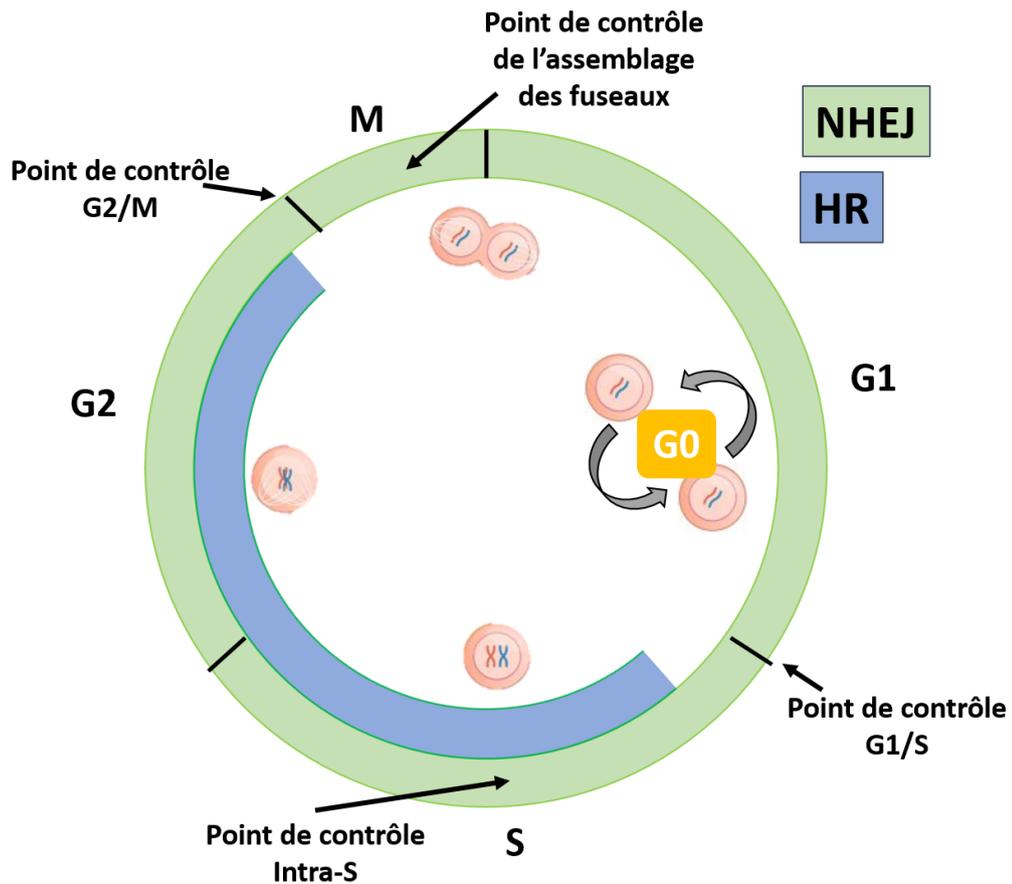


FIGURE 2.8 – Intervention des systèmes de réparation des CDB de l'ADN (NHEJ en vert et HR en bleu) en fonction du cycle cellulaire. Phase G1 : Préparation de la duplication du génome; Phase S : Duplication du génome; Phase G2 : Préparation de la division cellulaire; M : mitose (prophase, métaphase, anaphase, télophase). Le cycle G_0 est une étape du cycle cellulaire au cours duquel les cellules sont quiescentes.

gènes BRCA1/2 (Borràs-Fresneda et al., 2016; Leong et al., 2000). Cette radiosensibilité individuelle s'exprime, à la fois aux fortes et aux faibles doses de rayonnement.

Dans le contexte de cette thèse, nous nous intéresserons aux atteintes provoquées par l'exposition aux RI et nous nous focaliserons sur le cerveau en développement connu pour être très radiosensible.

2.3.5 Cas particulier du cerveau en développement

Développement du cerveau normal

Le développement du cerveau suit un processus précis et pré-défini. Le cortex est l'une des structures les plus importantes car il est le siège des fonctions neurocognitives par l'intégration des informations sensorielles en un plan d'actions.

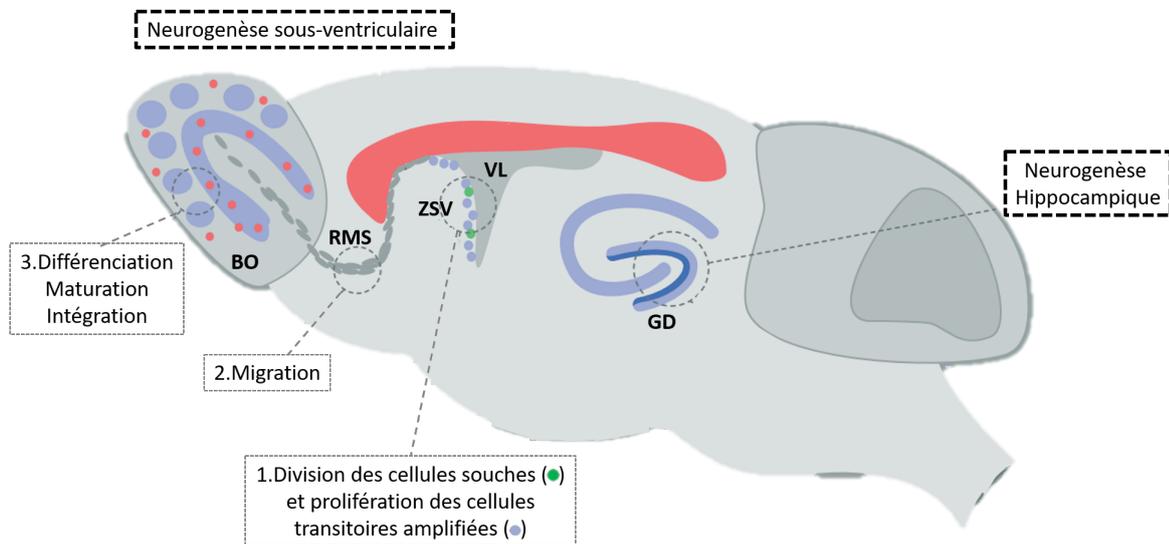


FIGURE 2.9 – Coupe sagittale du cerveau de souris avec les deux principaux sites de neurogenèse : la zone sous-ventriculaire (ZSV) et la zone sous-granulaire (ZSG) du gyrus denté (GD). La neurogenèse hippocampique et sous-ventriculaire débute dans la ZSG et la ZSV respectivement. Elle passe par trois étapes notées 1,2 et 3. La neurogenèse hippocampique donne majoritairement lieu à des cellules granulaires, interneurons et cellules gliales dans la région CA1 de l'hippocampe. La neurogenèse sous-ventriculaire aboutit à des neurones granulaires (cercles bleus) et périglomérulaires (cercles rouges) dans le bulbe olfactif (BO).

Comme le montre la Figure 2.10, la majorité des étapes de développement du néocortex se produisent au stade embryonnaire. La neurogenèse s'initie au stade embryonnaire et désigne l'ensemble du processus qui donne naissance à de nouvelles cellules matures et fonctionnelles capables de s'intégrer dans les circuits neuronaux existants. Elle passe par une phase de divisions cellulaires, de migration et de différenciation des neurones. Chez la souris du 11,5^{ème} au 17,5^{ème} jour de gestation, les neurones des couches corticales sont produits, à partir des cellules souches et progéniteurs neuronaux (CSPN), de la couche la plus profonde à la plus superficielle (Sakayori et al., 2013). En parallèle, d'autres processus

sont mis en place pour générer les autres types de cellules cérébrales comme les astrocytes ou les oligodendrocytes (Semple et al., 2013).

Pour la majorité des régions cérébrales, la synthèse de nouveaux neurones est terminée à la naissance. Cependant, au sein du gyrus denté (GD) de l'hippocampe et de la zone sous-ventriculaire (ZSV), la synthèse de nouveaux neurones se poursuit tout au long de la vie chez la souris (Figure 2.9), mais également chez l'Homme (Eriksson et al., 1998). Elle est principalement confinée dans deux niches neurogéniques : le GD et la ZSV qui produisent des cellules matures qui migrent ensuite respectivement vers l'hippocampe et le bulbe olfactif (BO) (pour la souris) ou le striatum (pour l'Homme).

En fonction du stade de développement un défaut dans ce processus, par exemple causé par une exposition aux RI, peut mener à des effets néfastes à court terme, mais aussi à long terme de façon irréversible, comme indiqué dans la Table 2.7.

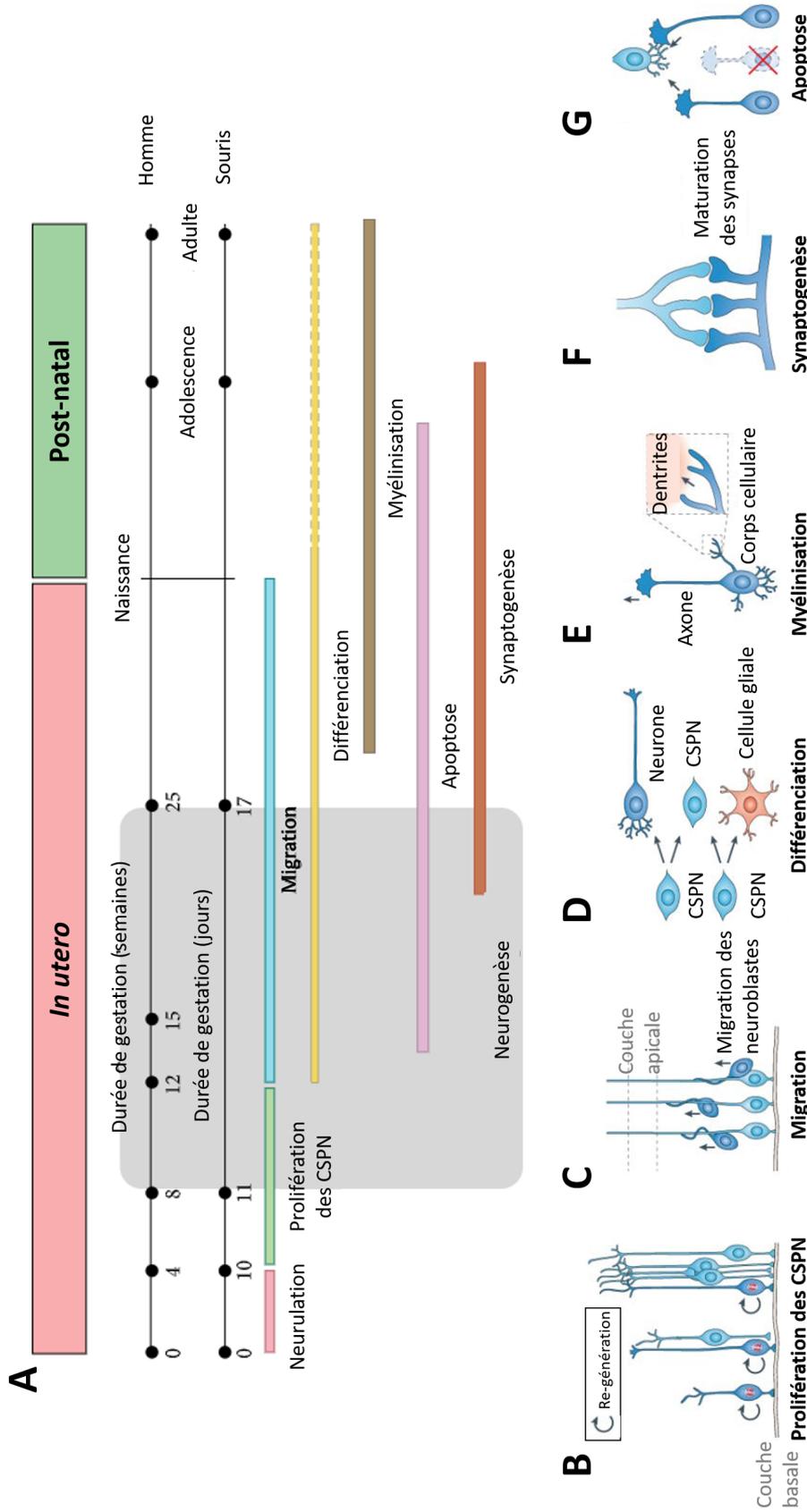


FIGURE 2.10 – (A) Chronologie des étapes de développement du cerveau chez l’Homme et chez le souris (Verreet et al., 2016b). (B) Après la fermeture du tube neural (neurulation), les cellules souches et progéniteurs neuronaux (CSPN) situés sur la couche basale de la ZSV se divisent et prolifèrent de façon symétrique. (C) Avec l’augmentation du nombre de cellules, les corps cellulaires des progéniteurs et des cellules post-mitotiques (neuroblastes) migrent de la couche basale vers la couche apicale. (D) Les progéniteurs se divisent de façon asymétrique en neurones, cellules gliales ou progéniteurs. (E) Une fois leur destination atteinte, les cellules différenciées étendent leurs terminaisons dendritiques et axonales. (F) Ensuite, les neurones deviennent matures et fonctionnels avec la mise en place de synapses permettant de connecter les neurones entre eux. (G) L’apoptose permet de réguler l’ensemble du circuit neuronal (Ronan et al., 2013).

Conséquences de l'irradiation sur le cerveau en développement à court et long terme

Les effets à court terme, soit 1 h à 24 h post-irradiation, sur le cerveau en développement se manifestent à l'échelle cellulaire. Des CDB sont induites chez l'embryon à partir d'une dose de 10 mGy à E 13,5 (Saha et al., 2014; Verreet et al., 2016b). D'autre part, le cycle cellulaire des cellules souches et progéniteurs neuronaux (CSPN) peut être stoppé pour permettre la réparation des CDB, par l'activation de point de contrôle situés en phase G2/M et intra-S. Néanmoins, les CDB peuvent ne pas être réparées et alors provoquer une apoptose des CSPN. En effet au stade embryonnaire (E 14,5), une dose de 50 mGy est suffisante pour détecter une apoptose des CSPN dans le cortex du cerveau de souris (Gatz et al., 2011; Verreet et al., 2016b).

À plus long terme, les effets de l'irradiation se manifestent au niveau de la structure du cerveau avec une microcéphalie (Schull et al., 1990) ou des malformations (Schull et al., 1990; Williams et Fletcher, 2010) (Table 2.7). Des déficits fonctionnels ont également été reportés, comme des atteintes cognitives (par exemple, une baisse du quotient intellectuel) (Schull et Otake, 1999) et des altérations motrices (Kimler et Norton, 1988; Gao et al., 2002), lesquelles pourraient s'expliquer par des altérations de la neurogenèse.

La Figure 2.11 résume les différentes atteintes cérébrales potentiellement induites par les RI. Comme détaillé dans les revues de Makale et al. (2017) et de Yang et al. (2017), ces atteintes n'ont pas seulement lieu sur le cerveau en développement mais aussi chez le cerveau adulte avec des radiosensibilités distinctes. La plupart de ces dimensions (cellulaires, inflammatoires, vasculaires et génétiques) sont accessibles par imagerie et place donc l'imagerie cellulaire, tissulaire et IRM comme une modalité pertinente et nécessaire pour étudier la radiophysiopathologie cérébrale.

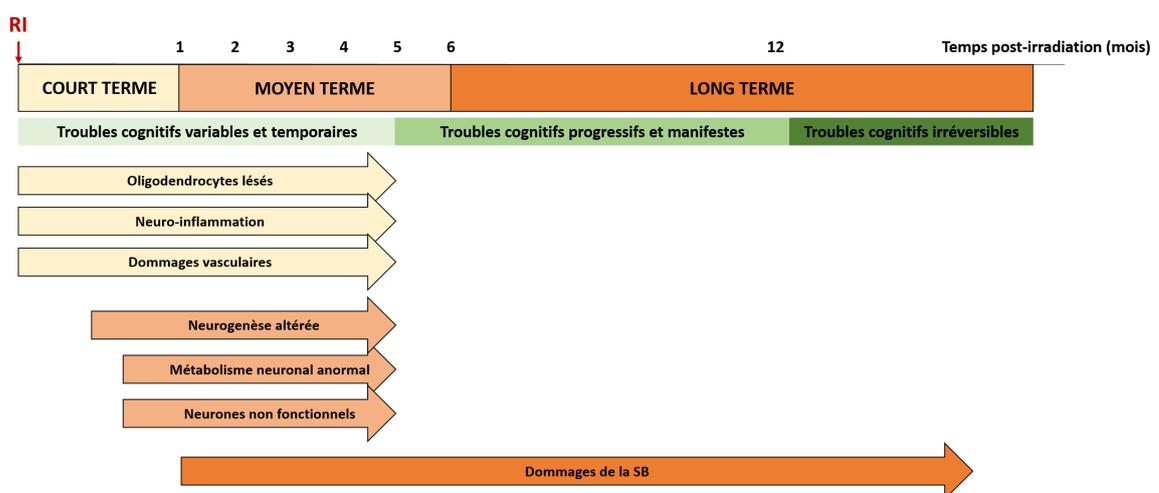


FIGURE 2.11 – Décours temporel des altérations cellulaires à court (jaune pâle), moyen (orange) et long (orange foncé) terme sur la cognition. Figure adaptée de Makale et al. (2017).

2.4 L'apport de l'imagerie en radiopathologie cérébrale

2.4.1 Études d'imagerie cellulaires et tissulaires (microscopie)

Une première approche consiste à observer et quantifier les atteintes radio-induites des cellules cérébrales en menant des études *in vitro* sur des cellules humaines ou animales (lignées de cellules primaires). Par exemple, les dommages à l'ADN peuvent être sondés par immunofluorescence à l'aide de l'histone γ H2AX phosphorylé, protéine détectrice des CDB. Ces études peuvent être menées sur des cellules récoltées à partir d'échantillons sanguins humains puis mises en culture (Borràs-Fresneda et al., 2016). Les effets des RI sur les CSPN ont été très étudiés *in vitro*, notamment dans diverses conditions d'irradiations (Limoli et al., 2004; Chen et al., 2015). Ces études ont ainsi montré que l'irradiation peut perturber le cycle cellulaire des CSPN à court terme sans impacter leur renouvellement à long terme.

La seconde approche concerne l'étude de tissus cérébraux *ex-vivo* provenant de modèles animaux, en général la souris. L'avantage par rapport aux études *in vitro*, est que l'on peut étudier la réponse des cellules cérébrales dans leur environnement, ce qui permet de considérer les interactions entre les différents types cellulaires. À partir de ces prélèvements tissulaires, il est possible de réaliser des études génomiques, transcriptomiques ou protéiques. La plupart des études *ex vivo* ont été menées à l'échelle cellulaire pour des analyses protéiques effectuées par des immunomarquages et également à l'échelle tissulaire par des colorations histologiques. L'ensemble de ces marquages permettent de détecter par microscopie différentes populations cellulaires, le processus de mort cellulaire (apoptose) ou encore des changements morphologiques. Quel que soit le protocole d'irradiation, il semble que chez le modèle souris, un déficit de neurogenèse soit à l'origine de la baisse du nombre de progéniteurs, de neurones matures et immatures ainsi que des oligodendrocytes immatures à long terme.

Les Figures 2.12 et 2.13 illustrent les différents types d'immuno-marquages réalisés sur des coupes de cerveau (études *ex vivo*) ou lignées de cellules souches neurales (études *in vitro*). Les Tables 2.11 et 2.10 reportent les principaux résultats obtenus à l'aide des marquages illustrés sur les Figures 2.12 et 2.13.

Coloration histologique ou immunomarquage	Cibles	Observations
Morphologie :		
H & E	Noyaux (acides nucléiques) : bleu/violet et cytoplasme : rose	Morphologie tissulaire modifiée dans la zone sous granulaire du GD
Inflammation :		
anti-GFAP	Astrocytes	↗ Activation astrocytaire dans l'hippocampe 1 an post-irradiation (Inflammation)
anti-Iba-1	Microglie et macrophages	Activation des cellules microgliales dans l'hippocampe 1 an post-irradiation
anti-CD3	Lymphocytes T	↗ du recrutement des cellules T dans la SB
anti-CD11c	Macrophages	↗ des macrophages majoritairement dans la SB (Inflammation)
anti-MHC-II	Macrophages	↗ Macrophages matures dans la SB
Vascularisation :		
anti-ICAM-1	Cellules endothéliales	Activation des cellules endothéliales dans l'hippocampe avec une morphologie hyper-ramifiée
anti-CD31	Cellules endothéliales	↗ Densité vasculaire et du diamètre des vaisseaux

TABLE 2.10 – Observations immunohistologiques des modifications cellulaires après irradiation sur des coupes de cerveau de souris à partir des photos présentées sur la Figure 2.12. GD : gyrus denté, SB : substance blanche.

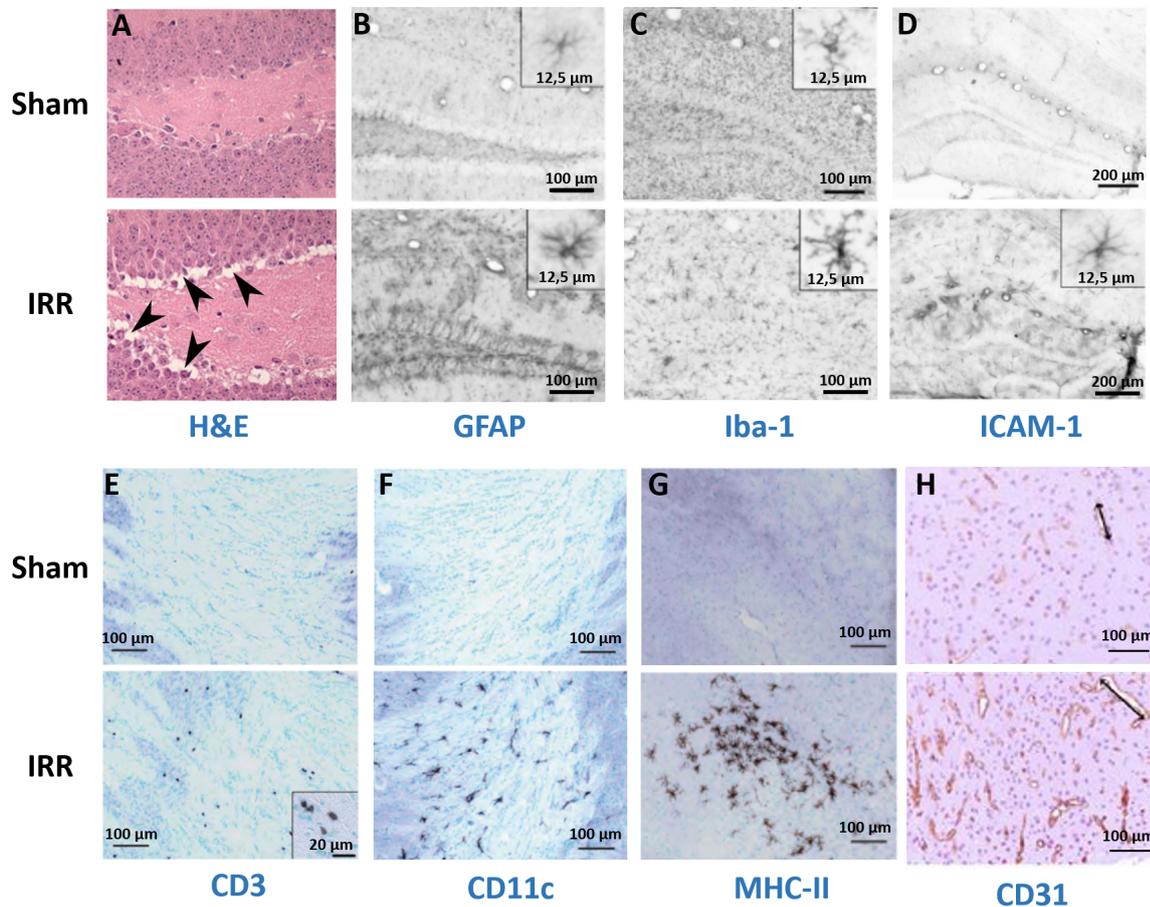


FIGURE 2.12 – Exemples d’immunomarquages réalisés *ex vivo* (A) : Coloration à l’hémaroxyline et éosine (H&E) sur une coupe du gyrus denté de souris irradiée à 7 Gy (bas) et non-irradiée (haut) (Gazdzinski et al., 2012). (B, C, D) : Immunomarquages sur une coupe de cerveau de l’hippocampe de souris irradiée à 35 Gy (bas) et non irradiée (haut) avec : (B) l’anti-corps anti-GFAP ("Glial Fibrillary Acidic Protein"), (C) l’anti-corps anti-Iba1 ("Ionized calcium binding adaptor molecule 1"), (D) l’anti-corps anti-ICAM-1 ("Intra-Cellular Adhesion Molecule 1") (Moravan et al., 2011). (E, F, G) : Immunomarquages d’une coupe de cerveau de souris irradiée à 35 Gy (bas) et non irradiée (haut) avec : (E) l’anti-corps anti-CD3 ("Cluster of Differentiation 3"), (F) l’anti-corps anti-CD11c ("Cluster of Differentiation 11c"), et (G) l’anti-corps anti-MHC-II ("Major Histocompatibility Complex II") avec une contre-coloration de vert de méthyle (Moravan et al., 2011). (H) Immunomarquage avec l’anti-corps CD31 sur une coupe de cerveau de souris irradiée à 3 x 2 Gy (Burrell et al., 2012).

Immunomarquage	Cibles	Observations
Dommages à l'ADN		
anti- γ H2AX	CDB de l'ADN (rouge/rose)	↗ du nombre de foci des CDB de l'ADN 30 minutes post-irradiation
Morphologie cellulaire		
DAPI	Noyaux (bleu)	Colocalisation avec d'autres cellules marquées
BrdU	Cellules en prolifération (orange)	Colocalisation avec d'autres cellules marquées
anti-Sox2	Cellules souches neuronales (vert)	↘ Progéniteurs neuronaux dans la ZSV 8 mois post-irradiation
anti-DCX	Neurones immatures (vert)	Pas de variations dans la ZSV 7 jours post-irradiation et ↘ Neurones immatures dans le BO 8 mois post-irradiation
anti-NeuN	Neurones matures (vert)	↘ Neurones matures dans le BO 8 mois post-irradiation
anti-Tuj1	Neurones immatures (rouge)	Différenciation des CSPN en neurones 5 jours post-irradiation
anti-GFAP	Astrocytes (vert)	Différenciation CSPN en astrocytes 5 jours post-irradiation
anti-NG2	Oligodendrocytes immatures (vert)	↗ Oligodendrocytes immatures dans le GD 2 mois post-irradiation
anti-O4	Oligodendrocytes matures (rouge foncé)	Pas de variations dans la ZSV 7 jours post-irradiation
anti-MBP	Myéline (rouge)	Démyélinisation dans le Cc

TABLE 2.11 – Observations des effets de l'irradiation sur la neurogenèse chez les souris : études *ex vivo* (immunohistologie) et études *in vitro* (immunocytologie) à partir des photos présentées dans la Figure 2.13. CDB : cassures double-brin, CSPN : cellules souches et progéniteurs neuronaux, ZSV : zone sous ventriculaire, BO : bulbe olfactif, GD : gyrus denté, Cc : corps calleux.

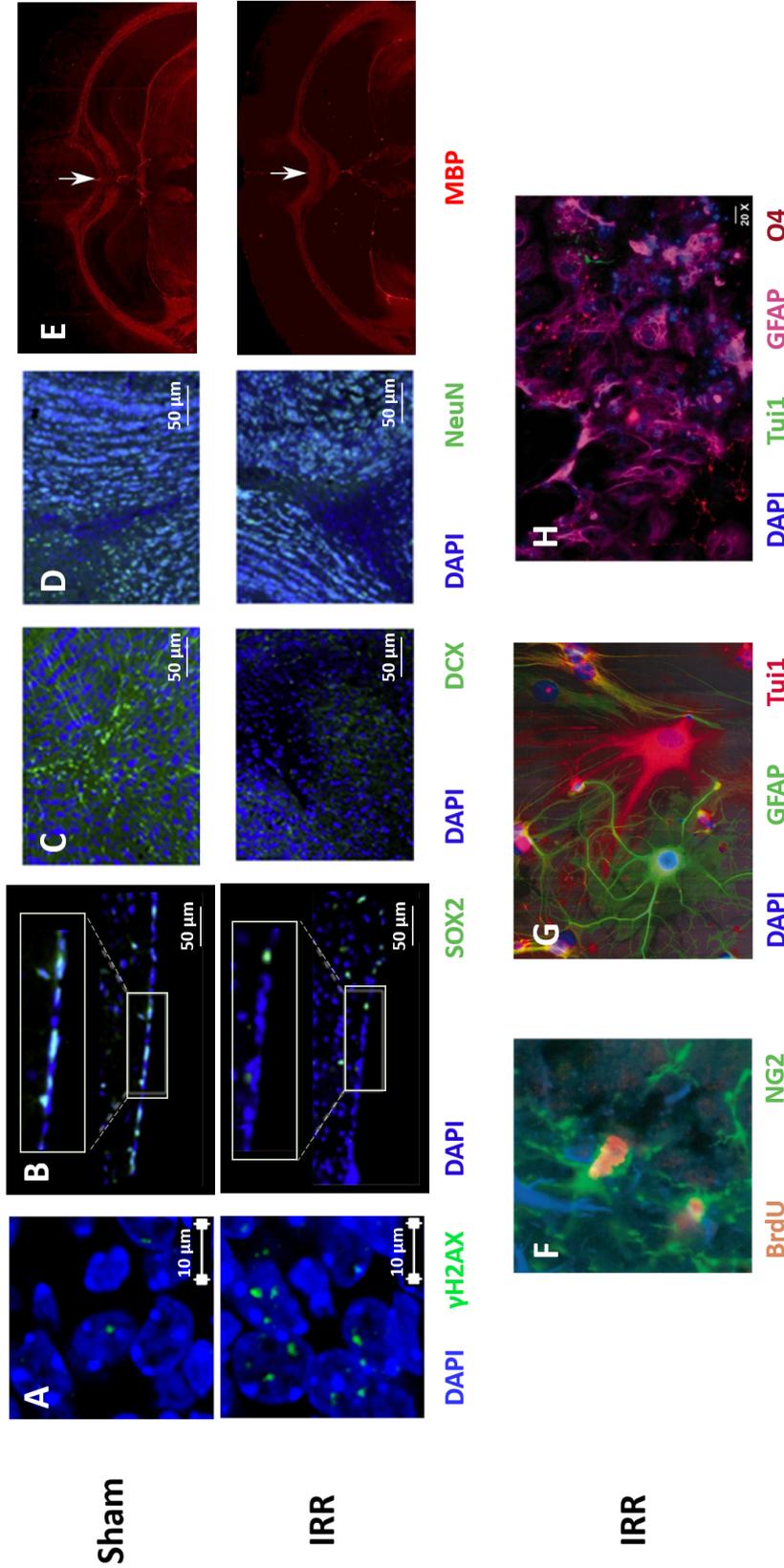


FIGURE 2.13 – Exemples d’immunomarquages réalisés *ex vivo*. (A) : Coupes de cerveau doublement marquées au DAPI (4’,6-diamidino-2-phénylindole) et avec l’anticorps anti- γ H2AX (phospho-histone H2AX) chez un modèle souris non-irradié (bas) et irradié à 1 Gy (bas) (Dos Santos et al., 2018). (B, C, D) : Coupes axiales de cerveau (ZSV) chez un modèle souris irradié à 3 x 15 Gy (haut) et non irradié (bas), doublement marquées au DAPI et avec les anticorps anti-Sox2 (B), anti-DCX (doublecortine, C) et anti-NeuN (D) (Pérès et al., 2018). (E) : Coupes axiales de cerveau de souris non irradiées (haut) et irradiées à 7 Gy (bas) marquées au MBP ("myelin basic protrein"). La flèche indique la diminution du marquage dans le corps calleux (Gazdzinski et al., 2012). (F) : Coupe axiale de cerveau (gyrus denté) chez un modèle souris irradié doublement marquée au BrdU (bromodésoxyuridine) et à l’anticorps anti-NG2 ("neuron-glia antigen 2") (Mizumatsu et al., 2003). (G) : Lignée de cellules souches neurales de l’hippocampe irradiée à 5 Gy et triplement marquée au DAPI et avec les anticorps anti-GFAP ("Glial Fibrillary Acid Proteine") et anti- β -III-tubuline (Limoli et al., 2004). (H) : Lignée de cellules souches neurales de ZSV irradiée à 8 Gy et quadruplement marquée au DAPI et avec les anticorps anti-GFAP, anti-Tuj1 ("Neuron-specific class III beta-tubulin") et anti-O4 ("oligodendrocyte marker O4") (Chen et al., 2015).

2.4.2 Études d'imagerie *in vivo* sur les modèles animaux

Alors que les études menées sur des cellules (*in vitro*) ou sur tissus (*ex vivo*) nous renseignent sur les conséquences microscopiques de l'irradiation pour un temps donné et dans une zone cérébrale donnée, l'imagerie *in vivo* permet d'étudier de façon plus globale et longitudinalement la réponse biologique de l'organisme face aux RI. Contrairement aux études épidémiologiques présentées dans la section 2.2.3, les études précliniques menées chez l'animal permettent de maîtriser les conditions d'irradiation ainsi que l'homogénéité génétique, ce qui permet d'augmenter la puissance statistique dans ces études. Parmi les différentes modalités d'imagerie, l'IRM (imagerie par résonance magnétique) fut la plus utilisée. Pour plus de détails sur l'IRM, notamment les principes physiques de résonance magnétique nucléaire (RMN), l'encodage du signal, les séquences et les principales modalités, se référer à l'annexe B. De par sa versatilité, l'IRM a permis de mettre en évidence des dommages morphologiques, structurels, vasculaires et métaboliques, notamment dans différents protocoles d'exposition aux RI du stade embryonnaire jusqu'à l'âge adulte, notamment chez la souris. La Table 2.12 reporte les différents types de dommages reportés par IRM dans le cadre d'études précliniques chez la souris exposée dans différentes conditions d'irradiation (selon la maturité du cerveau et de la dose de RI).

D'autres techniques comme la TEP permettent de remonter à des informations métaboliques similaires à celles dérivées de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (spectroscopie RMN). Des altérations métaboliques ont notamment été détectées dans un modèle d'irradiation cérébrale focalisée (sur un hémisphère) chez la souris. Ces souris présentaient pour les deux hémisphères (controlatéral et irradié) des niveaux élevés de captation de fluorodésoxyglucose (FDG) deux mois après irradiation, révélant une consommation du glucose plus importante (Kovács et al., 2018).

Compte-tenu du caractère quantitatif des paramètres estimés par imagerie biomédicale, en particulier par IRM, les études précliniques sur modèles animaux permettent d'identifier des biomarqueurs d'imagerie pouvant être pertinents pour détecter de manière non-invasive des dommages cérébraux radio-induits. Ainsi, il est envisageable de transposer ces observations chez l'Homme dans le but d'améliorer la prise en charge des patients traités par radiothérapie cérébrale (forte dose de RI) ou exposés accidentellement (faibles doses de RI).

2.4.3 Études chez les patients

Les études cliniques en neuro-imagerie ont une démarche plus applicative que celle des études précliniques menées sur des modèles animaux ou des études cellulaires. Elles sont souvent l'œuvre d'une recherche biomédicale et ont pour objectif de déterminer l'efficacité d'un traitement ou d'élaborer un raffinement thérapeutique. Les études cliniques radiobiologiques portent alors sur des cohortes de patients ayant été traités par radiothérapie dans le cadre d'une réduction ou d'une ablation de tumeurs primitives du cerveau ou de

Dose (Gy)	Observations	Référence
<i>In utero</i>		
0,3 - 1	Atrophie cérébrale dont Ctx, Str, Cer $\geq 30\%$	Verreet et al. (2016a)
1	Inflammation de l'Hip et du Cc (\searrow FA) Perte ou atrophie neuronale corticale (\searrow [NAA]) Dilatation des ventricules	Verreet et al. (2015)
	\searrow Vascularisation (\searrow diamètre artériel)	Saito et al. (2015)
Juvenile		
3	Atrophie de l'Hip	de Guzman et al. (2015)
5	Atrophies du BO, du pédoncule cérébral et de la capsule interne	de Guzman et al. (2015)
7	Atrophies de la SB et SG	Nieman et al. (2015) de Guzman et al. (2015) Gazdzinski et al. (2012)
Adulte		
2	\searrow Neurogenèse Hip (\searrow FA)	Kumar et al. (2013)
3	Œdème cytotoxique (\searrow MD, FA)	Trivedi et al. (2012)
5	Activation microgliale (\searrow MD, FA) dans l'Hip et CP \searrow Densité cellulaire (\searrow AD, RD, MD) dans l'Hip	Watve et al. (2018) Gupta et al. (2017)
8	Dilatation des ventricules Activation microgliale ou astrocytaire (\searrow FA, AD) Œdème cytotoxique (\searrow [Tau], [mI])	Trivedi et al. (2012) Trivedi et al. (2012) Gupta et al. (2013) Rana et al. (2013)
45	Nécrose (Hyperintensités T ₁ et T ₂)	Jiang et al. (2015)

TABLE 2.12 – Observations réalisées à partir d'études précliniques par IRM cérébrale dans différentes conditions d'irradiation chez la souris à différents stades de maturité du cerveau (exposition aux RI *in utero*, en période post-natale ou adulte). Ctx : cortex; Str : striatum; Cer : cervelet; Hip : hippocampe; Cc : corps calleux; BO : bulbe olfactif; SB : substance blanche; SG : substance grise; CP : CaudoPutamen. [Tau] : concentration moléculaire de Taurine; [mI] : concentration moléculaire de myo-inositol; [NAA] : concentration moléculaires de N-Acétyl-Aspartate. FA : fraction d'anisotropie; MD : diffusivité moyenne; AD : diffusivité axiale; RD : diffusivité radiale.

Protocole IRM	Observations	Références
Pondération T_1	Atrophie de l'Hip	Takeshita et al. (2019)
Pondération T_2	Nécrose de la SB / œdème (Hyper-intensités)	Ball et Ballard (1992)
	Micro-hémorragies (Hypo-intensités)	Ball et Ballard (1992)
Pondération T_1 + Agent de contraste (Gadolinium)	BHE non fonctionnelle ↗ Perfusion (↗ réhaussement du contraste)	Ball et Ballard (1992) Cao et al. (2009)
	↘ Densité vasculaire	Fahlström et al. (2018)
	↘ Épaisseur corticale	Karunamuni et al. (2016)
IRM de diffusion (DTI)	Démyélinisation (↘ FA) ↘ Densité axonale (↗ MD, AD, RD) dans le Cc	Nagesh et al. (2008) David et al. (2019)
Spectroscopie RMN	Mort cellulaire (↘ [NAA/Cr]) Apoptose (↘ [Cho/Cr])	Sundgren et al. (2009)

TABLE 2.13 – Observations réalisées à partir d'études IRM chez les patients traités par radiothérapie dans le cadre de pathologies cérébrales (tumeur primitive de faible ou haut grade et métastases). Hip : hippocampe; SB : substance blanche; Cc : corps calleux; BHE : barrière hémato encéphalique. DTI : imagerie du tenseur de diffusion; RMN : résonance magnétique nucléaire. FA : fraction d'anisotropie; MD : diffusivité moyenne; AD : diffusivité axiale; RD : diffusivité radiale. [NAA/Cr] : concentration moléculaire relative de N-Acétyl-Aspartate par rapport à la créatine; [Cho/Cr] : concentration moléculaire relative de choline par rapport à la créatine.

métastases cérébrales. Les comparaisons sont réalisées chez les patients avant le début du traitement par radiothérapie cérébrale focalisée (IRM de référence) et après le traitement. Même si les RI sont focalisés sur la tumeur (suivant un protocole de type "intensity-modulated radiation therapy" (IMRT)), en raison des marges considérées pour cibler entièrement la tumeur, les tissus environnants sont également atteints, mais à moindre dose. La Table 2.13 donne les principaux résultats d'études IRM sur les effets de la radiothérapie sur les régions saines de patients atteints de tumeurs cérébrales.

2.5 Bilan

Nous avons vu dans ce chapitre que la neuroimagerie, et l'IRM en particulier, est sensible à différentes atteintes cérébrales induites par l'exposition aux RI. Des altérations

volumétriques (atrophies ou dilatation), vasculaires (perfusion) et également sur la microstructure cérébrale ont été détectées dans des modèles animaux et chez des cohortes de patients.

Du fait de la maturation cérébrale incomplète aux stades embryonnaire et juvénile, ces périodes de la vie sont les plus radiosensibles. Néanmoins, l'investigation des effets d'une irradiation globale sur le cerveau sain, de plus est à ces âges, ne peut être réalisée chez l'Homme (hormis à l'aide d'études épidémiologiques pour lesquelles il est difficile de contrôler tous les paramètres).

C'est pourquoi les travaux de cette thèse sont menés sur un modèle souris exposé *in utero* ou au stade juvénile, dans le but de caractériser à long terme (à l'âge adulte) les effets d'une exposition globale dans un premier temps à forte dose et à faible dose à terme. Une approche à l'échelle du cerveau entier qui associe l'IRM anatomique et de diffusion a été utilisée à cet effet afin d'accéder aux informations volumétriques, vasculaires et microstructurelles.

Bibliographie

Okeanov Ae, Sosnovskaya Ey, and Priatkina Op. National cancer registry to assess trends after the Chernobyl accident. *SWISS MED WKLY*, page 6, 2004.

E. A. Ainsbury, E. Bakhanova, and J. F. Barquinero. Review of retrospective dosimetry techniques for external ionising radiation exposures. *147(4)* :573–592, 2011.

WilliamS Ball and Edgar T Ballard. Neurotoxicity of Radio/Chemotherapy In Children : Pathologic and MR Correlation. page 16, 1992.

Keith Baverstock and Dillwyn Williams. The Chernobyl Accident 20 Years On : An Assessment of the Health Consequences and the International Response. *Environ Health Perspect*, 114(9) :1312–1317, September 2006. ISSN 0091-6765, 1552-9924. doi : 10.1289/ehp.9113. URL <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.9113>.

Dimitry Bazyka, Anatoly Prisyazhnyuk, Natalya Gudzenko, Iryna Dyagil, David Belyi, Vadim Chumak, and Volodymyr Buzunov. Epidemiology of Late Health Effects in Ukrainian Chornobyl Cleanup Workers. *Health Physics*, 115(1) :161–169, July 2018. ISSN 0017-9078. doi : 10.1097/HP.0000000000000868. URL insights.ovid.com.

Autumn J. Bernal, Dana C. Dolinoy, Dale Huang, David A. Skaar, Caren Weinhouse, and Randy L. Jirtle. Adaptive radiation-induced epigenetic alterations mitigated by antioxidants. *FASEB J*, 27(2) :665–671, February 2013. ISSN 0892-6638. doi : 10.1096/fj.12-220350. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4046115/>.

Mireia Borràs-Fresneda, Joan-Francesc Barquinero, Maria Gomolka, Sabine Hornhardt, Ute Rössler, Gemma Armengol, and Leonardo Barrios. Differences in DNA Repair Capacity, Cell Death and Transcriptional Response after Irradiation between a Radiosensitive and a Radioresistant Cell Line. *Sci Rep*, 6, June 2016. ISSN 2045-2322. doi : 10.1038/srep27043. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4887990/>.

Kelly Burrell, Richard P Hill, and Gelareh Zadeh. High-resolution in-vivo analysis of normal brain response to cranial irradiation. *PLoS ONE*, 7(6), 2012. doi : 10.1080/09553002.2018.1466064.

- Yue Cao, Christina I. Tsien, Pia C. Sundgren, Vijaya Nagesh, Daniel Normolle, Henry Buchtel, Larry Junck, and Theodore S. Lawrence. Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging As a Biomarker for Prediction of Radiation-Induced Neurocognitive Dysfunction. *Clin Cancer Res*, 15(5) :1747–1754, March 2009. ISSN 1078-0432, 1557-3265. doi : 10.1158/1078-0432.CCR-08-1420. URL <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-08-1420>.
- Hongxin Chen, Matthew T Goodus, Sonia M de Toledo, Edouard I Azzam, Steven W Levison, and Nizar Souayah. Ionizing Radiation Perturbs Cell Cycle Progression of Neural Precursors in the Subventricular Zone Without Affecting Their Long-Term Self-Renewal. *ASN Neuro*, 7(3), March 2015. ISSN 1759-0914. doi : 10.1177/1759091415578026. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4461572/>.
- John P. Christodouleas, Robert D. Forrest, Christopher G. Ainsley, Zelig Tochner, Stephen M. Hahn, and Eli Glatstein. Short-Term and Long-Term Health Risks of Nuclear-Power-Plant Accidents. *New England Journal of Medicine*, 364(24) :2334–2341, June 2011. ISSN 0028-4793. doi : 10.1056/NEJMra1103676. URL <https://doi.org/10.1056/NEJMra1103676>.
- David E. Cohen and Randie H. Kim. The Legacy of the Radium Girls. *JAMA Dermatol*, 153(8) :801–801, August 2017. ISSN 2168-6068. doi : 10.1001/jamadermatol.2017.2576. URL <https://jamanetwork.com/journals/jamadermatology/fullarticle/2645827>.
- Institute of Medicine (US) Committee for Review and Evaluation of the Medical Use Program of the Nuclear Regulatory Commission, Kate-Louise D. Gottfried, and Gary Penn. *Clinical Applications of Ionizing Radiation*. National Academies Press (US), 1996. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK232715/>.
- Szabolcs David, Hamed Y Mesri, Victor A Bodiut, Steven H J Nagtegaal, Hesham El-halawani, Alberto de Luca, Marielle E P Philippens, Max A Viergever, Abdallah S R Mohamed, Yao Ding, Caroline Chung, Clifton D Fuller, Joost J C Verhoeff, and Alexander Leemans. Dose-dependent degeneration of non-cancerous brain tissue in post-radiotherapy patients : A diffusion tensor imaging study. preprint, *Oncology*, September 2019. URL <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/19005157>.
- A. Elizabeth de Guzman, Lisa M. Gazdzinski, Richard J. Alsop, James M. Stewart, David A. Jaffray, C. Shun Wong, and Brian J. Nieman. Treatment age, dose and sex determine neuroanatomical outcome in irradiated juvenile mice. *Radiat. Res.*, 183(5) : 541–549, May 2015. ISSN 1938-5404. doi : 10.1667/RR13854.1.
- João Pedro de Magalhães and João F. Passos. Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 170 :2–9, March 2018. ISSN

- 0047-6374. doi : 10.1016/j.mad.2017.07.001. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0047637417300787>.
- Mohamed Donya, Mark Radford, Ahmed ElGuindy, David Firmin, and Magdi H. Yacoub. Radiation in medicine : Origins, risks and aspirations. *Glob Cardiol Sci Pract*, 2014 (4) :437–448, December 2014. ISSN 2305-7823. doi : 10.5339/gcsp.2014.57. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4355517/>.
- M. Dos Santos, D. Kereselidze, C. Gloaguen, M.A. Benadjaoud, K. Tack, P. Lestaevel, and C. Durand. Development of whole brain versus targeted dentate gyrus irradiation model to explain low to moderate doses of exposure effects in mice. *Scientific Reports*, 8 :52–64, 2018. doi : 10.1038/s41598-018-35579-x.
- Peter S. Eriksson, Ekaterina Perfilieva, Thomas Björk-Eriksson, Ann-Marie Alborn, Claes Nordborg, Daniel A. Peterson, and Fred H. Gage. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4(11) :1313–1317, November 1998. ISSN 1078-8956, 1546-170X. doi : 10.1038/3305. URL http://www.nature.com/articles/nm1198_1313.
- Markus Fahlström, Erik Blomquist, Tufve Nyholm, and Elna-Marie Larsson. Perfusion Magnetic Resonance Imaging Changes in Normal Appearing Brain Tissue after Radiotherapy in Glioblastoma Patients may Confound Longitudinal Evaluation of Treatment Response. *Radiol Oncol*, 52(2) :143–151, June 2018. ISSN 1318-2099. doi : 10.2478/raon-2018-0022. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6043875/>.
- R. Fry. DETERMINISTIC EFFECTS. *Health Physics*, 80(4) :338–343, April 2001. ISSN 0017-9078. URL insights.ovid.com.
- Wei-Min Gao, Hui-Min Lu, Jin-Chan Dong, Wei Zhang, Xiang-Yan Zhou, Larry W Jenkins, and C. Edward Dixon. Postnatal growth, neurobehavioral and neurophysiologic changes of prenatal low-dose beta-radiation from tritiated water in mice. *Neurotoxicology and Teratology*, 24(2) :247–254, March 2002. ISSN 0892-0362. doi : 10.1016/S0892-0362(02)00202-7. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0892036202002027>.
- Susanne A. Gatz, Limei Ju, Ralph Gruber, Eva Hoffmann, Antony M. Carr, Zhao-Qi Wang, Cong Liu, and Penny A. Jeggo. Requirement for DNA Ligase IV during Embryonic Neuronal Development. *J Neurosci*, 31(27) :10088–10100, July 2011. ISSN 0270-6474. doi : 10.1523/JNEUROSCI.1324-11.2011. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3154654/>.
- Lisa M. Gazdzinski, Kyle Cormier, Fred G. Lu, Jason P. Lerch, C. Shun Wong, and Brian J. Nieman. Radiation-induced alterations in mouse brain development characterized by magnetic resonance imaging. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 84(5) : e631–638, December 2012. ISSN 1879-355X. doi : 10.1016/j.ijrobp.2012.06.053.

- Mamta Gupta, Poonam Rana, Richa Trivedi, B. S. Hemanth Kumar, Ahmad Raza Khan, Ravi Soni, R. K. S. Rathore, and Subash Khushu. Comparative evaluation of brain neurometabolites and DTI indices following whole body and cranial irradiation : a magnetic resonance imaging and spectroscopy study. *NMR Biomed*, 26(12) :1733–1741, December 2013. ISSN 1099-1492. doi : 10.1002/nbm.3010.
- Mamta Gupta, Sushanta Kumar Mishra, B. S. Hemanth Kumar, Subash Khushu, and Poonam Rana. Early detection of whole body radiation induced microstructural and neuroinflammatory changes in hippocampus : A diffusion tensor imaging and gene expression study. *Journal of Neuroscience Research*, 95(4) :1067–1078, 2017. ISSN 1097-4547. doi : 10.1002/jnr.23833. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jnr.23833>.
- Alan H. Haber and Barbara E. Rothstein. Radiosensitivity and Rate of Cell Division : "Law of Bergonié and Tribondeau". *Science*, 163(3873) :1338–1339, March 1969. ISSN 0036-8075, 1095-9203. doi : 10.1126/science.163.3873.1338. URL <https://science.sciencemag.org/content/163/3873/1338>.
- A. Hasegawa, K. Tanigawa, A. Ohtsuru, H. Yabe, M. Maeda, J. Shigemura, T. Ohira, T. Tominaga, M. Akashi, N. Hirohashi, T. Ishikawa, K. Kamiya, K. Shibuya, S. Yamashita, and R. K Chhem. Health effects of radiation and other health problems in the aftermath of nuclear accidents, with an emphasis on Fukushima | Elsevier Enhanced Reader. *The Lancet*, 1(386) :479–488, 2015. doi : 10.1016/S0140-6736(15)61106-0.
- George C. de Hevesy. Marie Curie and Her Contemporaries The Becquerel-Curie Memorial Lecture. *J Nucl Med*, 25(1) :116–131, January 1984. ISSN 0161-5505, 2159-662X. URL <http://jnm.snmjournals.org/content/25/1/116>.
- ICRP. Low dose extrapolation of radiation related cancer risk. Technical Report 60, 2004.
- Yasuhiro Ina and Kazuo Sakai. Activation of immunological network by chronic low-dose-rate irradiation in wild-type mouse strains : analysis of immune cell populations and surface molecules. *Int. J. Radiat. Biol.*, 81(10) :721–729, October 2005. ISSN 0955-3002. doi : 10.1080/09553000500519808.
- V. K. Ivanov, M. A. Maksiutov, S. Iu Chekin, A. V. Petrov, A. F. Tsyb, A. P. Biriukov, Z. G. Kruglova, and V. A. Matiash. The radiation risks of cerebrovascular diseases among the liquidators. *Radiats Biol Radioecol*, 45(3) :261–270, June 2005. ISSN 0869-8031.
- Xiaoyu Jiang, Liya Yuan, John A. Engelbach, Jeremy Cates, Carlos J. Perez-Torres, Feng Gao, Dinesh Thotala, Robert E. Drzymala, Robert E. Schmidt, Keith M. Rich, Dennis E. Hallahan, Joseph J. H. Ackerman, and Joel R. Garbow. A Gamma-Knife-Enabled Mouse Model of Cerebral Single-Hemisphere Delayed Radiation Necrosis. *PLoS ONE*, 10(10) :e0139596, 2015. ISSN 1932-6203. doi : 10.1371/journal.pone.0139596.

- Kenji Kamiya, Kotaro Ozasa, Suminori Akiba, Ohstura Niwa, Kazunori Kodama, Noboru Takamura, Elena K. Zaharieva, Yuko Kimura, and Richard Wakeford. Long-term effects of radiation exposure on health. *The Lancet*, 386(9992) :469–478, August 2015. ISSN 0140-6736, 1474-547X. doi : 10.1016/S0140-6736(15)61167-9. URL [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(15\)61167-9/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(15)61167-9/abstract).
- Roshan Karunamuni, Hauke Bartsch, Nate S. White, Vitali Moiseenko, Ruben Carmona, Deborah Marshall, Tyler M. Seibert, Carrie R. McDonald, Nikdokht Farid, Anithapriya Krishnan, Joshua Kuperman, Loren Mell, James B. Brewer, Anders M. Dale, and Jona A. Hattangadi-Gluth. Dose-dependent Cortical Thinning After Partial Brain Radiation in High-grade Glioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 94(2) : 297–304, February 2016. ISSN 0360-3016. doi : 10.1016/j.ijrobp.2015.10.026. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4747044/>.
- Bruce F. Kimler and Stata Norton. Behavioral changes and structural defects in rats irradiated in utero. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, 15 (5) :1171–1177, November 1988. ISSN 0360-3016. doi : 10.1016/0360-3016(88)90200-3. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0360301688902003>.
- Noémi Kovács, Krisztián Szigeti, Nikolett Hegedűs, Ildikó Horváth, Dániel S. Veres, Michael Bachmann, Ralf Bergmann, and Domokos Máthé. Multimodal PET/MRI Imaging Results Enable Monitoring the Side Effects of Radiation Therapy. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2018. doi : 10.1155/2018/5906471. URL <https://www.hindawi.com/journals/cmim/2018/5906471/>.
- Mayank Kumar, Seenu Haridas, Richa Trivedi, Subhash Khushu, and Kailash Manda. Early cognitive changes due to whole body gamma-irradiation : a behavioral and diffusion tensor imaging study in mice. *Exp. Neurol.*, 248 :360–368, October 2013. ISSN 1090-2430. doi : 10.1016/j.expneurol.2013.06.005.
- E. Lartigau, S. Dewas, and L. Gras. L’effet Oxygène, une cible ancienne toujours d’actualité? *Cancer/Radiothérapie*, 12(1) :42–49, January 2008. ISSN 12783218. doi : 10.1016/j.canrad.2007.12.003. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1278321807003356>.
- Trevor Leong, Jonathan Whitty, Michelle Keilar, Sharon Mifsud, Jonathan Ramsay, Geoffrey Birrell, Deon Venter, Melissa Southey, and Michael McKay. Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 cancer predisposition genes in radiation hypersensitive cancer patients. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, 48(4) :959–965, November 2000. ISSN 0360-3016. doi : 10.1016/S0360-3016(00)00728-8. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360301600007288>.
- Mengqian Li, Liting You, Jianxin Xue, and You Lu. Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence in Normal, Non-transformed Cells and the Involved DNA Da-

mage Response : A Mini Review. *Front Pharmacol*, 9, May 2018. ISSN 1663-9812. doi : 10.3389/fphar.2018.00522. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5972185/>.

Charles L. Limoli, Erich Giedzinski, Radoslaw Rola, Shinji Otsuka, Theo D. Palmer, and John R. Fike. Radiation Response of Neural Precursor Cells : Linking Cellular Sensitivity to Cell Cycle Checkpoints, Apoptosis and Oxidative Stress. *rare*, 161(1) : 17–27, January 2004. ISSN 0033-7587, 1938-5404. doi : 10.1667/RR3112. URL <https://bioone.org/journals/Radiation-Research/volume-161/issue-1/RR3112/Radiation-Response-of-Neural-Precursor-Cells--Linking-Cellular-Sensitivity/10.1667/RR3112.full>.

Milan T. Makale, Carrie R. McDonald, Jona Hattangadi-Gluth, and Santosh Kesari. Brain irradiation and long-term cognitive disability : Current concepts. *Nat Rev Neurol*, 13(1) :52–64, January 2017. ISSN 1759-4758. doi : 10.1038/nrneurol.2016.185. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5805381/>.

M Mancuso, E Pasquali, P Giardullo, S Leonardi, M Tanori, V Di Majo, S Pazzaglia, and A Saran. The Radiation Bystander Effect and its Potential Implications for Human Health. page 13, 2012.

Zhiyong Mao, Michael Bozzella, Andrei Seluanov, and Vera Gorbunova. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst)*, 7(10) :1765–1771, October 2008. ISSN 1568-7864. doi : 10.1016/j.dnarep.2008.06.018. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2695993/>.

Shinichiro Mizumatsu, Michelle L Monje, and Duncan R Morhardt. Extreme Sensitivity of Adult Neurogenesis to Low Doses of X-Irradiation. *Cancer Res*, 63(14) :4021–4027, 2003.

Michael J. Moravan, John A. Olschowka, Jacqueline P. Williams, and M. Kerry O'Banion. Cranial Irradiation Leads to Acute and Persistent Neuroinflammation with Delayed Increases in T-Cell Infiltration and CD11c Expression in C57BL/6 Mouse Brain. *rare*, 176(4) :459–473, July 2011. ISSN 0033-7587, 1938-5404. doi : 10.1667/RR2587.1.

Donna H. Murrell, Niloufar Zarghami, Michael D. Jensen, Ann F. Chambers, Eugene Wong, and Paula J. Foster. Evaluating Changes to Blood-Brain Barrier Integrity in Brain Metastasis over Time and after Radiation Treatment. *Transl Oncol*, 9(3) :219–227, May 2016. ISSN 1936-5233. doi : 10.1016/j.tranon.2016.04.006. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4907987/>.

Vijaya Nagesh, Christina I. Tsien, Thomas L. Chenevert, Brian D. Ross, Theodore S. Lawrence, Larry Junick, and Yue Cao. Radiation-Induced Changes in Normal-Appearing White Matter in Patients With Cerebral Tumors : A Diffusion Tensor

- Imaging Study. *International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics*, 70(4) : 1002–1010, March 2008. ISSN 03603016. doi : 10.1016/j.ijrobp.2007.08.020. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360301607037686>.
- Dhanya Nambiar, Paulraj Rajamani, and Rana P. Singh. Effects of phytochemicals on ionization radiation-mediated carcinogenesis and cancer therapy. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 728(3) :139–157, November 2011. ISSN 1383-5742. doi : 10.1016/j.mrrev.2011.07.005. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574211000755>.
- Gila Neta, Maureen Hatch, Cari M. Kitahara, Evgenia Ostroumova, Elena V. Bolshova, Valery P. Tereschenko, Mykola D. Tronko, and Alina V. Brenner. In Utero Exposure to Iodine-131 from Chernobyl Fallout and Anthropometric Characteristics in Adolescence. *Radiat Res*, 181(3) :293–301, March 2014. ISSN 0033-7587. doi : 10.1667/RR13304.1. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4068270/>.
- Brian J. Nieman, A. Elizabeth de Guzman, Lisa M. Gazdzinski, Jason P. Lerch, M. Mal-lar Chakravarty, Jon Pipitone, Douglas Strother, Chris Fryer, Eric Bouffet, Suzanne Laughlin, Normand Laperriere, Lily Riggs, Jovanka Skocic, and Donald J. Mabbott. White and Gray Matter Abnormalities After Cranial Radiation in Children and Mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 93(4) :882–891, November 2015. ISSN 1879-355X. doi : 10.1016/j.ijrobp.2015.07.2293.
- International Commission on Radiological Protection. *Nonstochastic effects of ionizing radiation : a report of a task group of Committee 1 of the ICRP*. Number 41 in ICRP publication. Pergamon Pr, Oxford, 1. ed edition, 1984. ISBN 978-0-08-032333-6. OCLC : 833911616.
- International Commission on Radiological Protection. *RBE for deterministic effects : a report of a Task Group : Adopted by the Commission in October 1989*. Number 58 in ICRP publication. Pergamon Pr, Oxford u.a, 1990. ISBN 978-0-08-040173-7. OCLC : 231100235.
- International Commission on Radiological Protection. *The biological basis for dose li-mitation in the skin : a report of a task group of Committee 1 of the International Commission on Radiological Protection ; adopted by the commission in november 1991*. Number 59 in ICRP publication. Pergamon Pr, Oxford, 1992. ISBN 978-0-08-041143-9. OCLC : 28889288.
- International Commission on Radiological Protection. *The 2007 Recommendations of the Internation Commission on Radiobiological Protection*. Number 37 in ICRP publica-tion. Pergamon Pr, Oxford, 2007. ISBN 0978-0-7020-3048-2.

- E. B. Podgoršak and International Atomic Energy Agency, editors. *Radiation oncology physics : a handbook for teachers and students*. International Atomic Energy Agency, Vienna, 2005. ISBN 978-92-0-107304-4. OCLC : ocm61877454.
- Elodie Anne Pérès, Olivier Etienne, Antoine Grigis, Fawzi Boumezbeur, François Dominique Boussin, and Denis Le Bihan. Longitudinal Study of Irradiation-Induced Brain Microstructural Alterations With S-Index, a Diffusion MRI Biomarker, and MR Spectroscopy. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*, 102(4) : 1244–1254, November 2018. ISSN 0360-3016. doi : 10.1016/j.ijrobp.2018.01.070. URL [https://www.redjournal.org/article/S0360-3016\(18\)30184-6/abstract](https://www.redjournal.org/article/S0360-3016(18)30184-6/abstract).
- T.V. Ramachandran. Background radiation, people and the environment. *Iran. J. Radiat. Res*, 9(2) :63–76, 2011.
- Poonam Rana, Ahmad Raza Khan, Shilpi Modi, B. S. Hemanth Kumar, Salim Javed, Rajendra Prasad Tripathi, and Subash Khushu. Altered brain metabolism after whole body irradiation in mice : A preliminary in vivo ¹ H MRS study. *International Journal of Radiation Biology*, 89(3) :212–218, March 2013. ISSN 0955-3002, 1362-3095. doi : 10.3109/09553002.2013.734944. URL <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/09553002.2013.734944>.
- Amy B. Reed. The history of radiation use in medicine. *Journal of Vascular Surgery*, 53(1) :3S–5S, January 2011. ISSN 07415214. doi : 10.1016/j.jvs.2010.07.024. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0741521410017271>.
- Julie A. Reisz, Nidhi Bansal, Jiang Qian, Weiling Zhao, and Cristina M. Furdui. Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules—Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection. *Antioxid Redox Signal*, 21(2) :260–292, July 2014. ISSN 1523-0864. doi : 10.1089/ars.2013.5489. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4060780/>.
- Jehna L. Ronan, Wei Wu, and Gerald R. Crabtree. From neural development to cognition : unexpected roles for chromatin. *Nat Rev Genet*, 14(5) :347–359, May 2013. ISSN 1471-0064. doi : 10.1038/nrg3413. URL <https://www.nature.com/articles/nrg3413>.
- Shreya Saha, Lisa Woodbine, Jackie Haines, Margaret Coster, Nicole Rickett, Lara Barazzuol, Elizabeth Ainsbury, Zenon Sienkiewicz, and Penny Jeggo. Increased apoptosis and DNA double-strand breaks in the embryonic mouse brain in response to very low-dose X-rays but not 50 Hz magnetic fields. *J R Soc Interface*, 11(100), November 2014. ISSN 1742-5689. doi : 10.1098/rsif.2014.0783. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4191111/>.
- Shigeyoshi Saito, Kazuhiko Sawada, Yuki Mori, Yoshichika Yoshioka, and Kenya Murase. Brain and arterial abnormalities following prenatal X-ray irradiation in mice assessed

- by magnetic resonance imaging and angiography. *Congenit Anom (Kyoto)*, 55(2) : 103–106, May 2015. ISSN 1741-4520. doi : 10.1111/cga.12101.
- Nobuyuki Sakayori, Ryuichi Kimura, and Noriko Osumi. Impact of Lipid Nutrition on Neural Stem/Progenitor Cells, 2013. URL <https://www.hindawi.com/journals/sci/2013/973508/>.
- William J Schull and Masanori Otake. Cognitive Function and Prenatal Exposure to Ionizing Radiation. *Teratology*, 59(4) :222–226, 1999.
- William J. Schull, Stata Norton, and Ronald P. Jensh. Ionizing radiation and the developing brain. *Neurotoxicology and Teratology*, 12(3) :249–260, May 1990. ISSN 0892-0362. doi : 10.1016/0892-0362(90)90096-U. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/089203629090096U>.
- H. Schöllnberger, R. E. J. Mitchel, J. L. Redpath, D. J. Crawford-Brown, and W. Hofmann. Detrimental and Protective Bystander Effects : A Model Approach. *Radiat Res*, 168(5) :614–626, November 2007. ISSN 0033-7587. doi : 10.1667/rr0742.1. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3088356/>.
- Bridgette D. Semple, Klas Blomgren, Kayleen Gimlin, Donna M. Ferriero, and Linda J. Noble-Haesslein. Brain development in rodents and humans : Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*, 0 :1–16, 2013. ISSN 0301-0082. doi : 10.1016/j.pneurobio.2013.04.001. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3737272/>.
- P.C. Sundgren, V. Nagesh, A. Elias, C. Tsien, L. Junck, D.M. Gomez Hassan, T.S. Lawrence, T.L. Chenevert, L. Rogers, P. McKeever, and Y. Cao. Metabolic alterations : A biomarker for radiation-induced normal brain injury-an MR spectroscopy study. *J. Magn. Reson. Imaging*, 29(2) :291–297, February 2009. ISSN 10531807, 15222586. doi : 10.1002/jmri.21657. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/jmri.21657>.
- Yohei Takeshita, Keita Watanabe, Shingo Kakeda, Toshihiko Hamamura, Koichiro Sugimoto, Hiromi Masaki, Issei Ueda, Natsuki Igata, Takayuki Ohguri, and Yukunori Korogi. Early volume reduction of the hippocampus after whole-brain radiation therapy : an automated brain structure segmentation study. *Jpn J Radiol*, October 2019. ISSN 1867-108X. doi : 10.1007/s11604-019-00895-3. URL <https://doi.org/10.1007/s11604-019-00895-3>.
- A. M. R. Taylor, D. G. Harnden, C. F. Arlett, S. A. Harcourt, A. R. Lehmann, S. Stevens, and B. A. Bridges. Ataxia telangiectasia : a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature*, 258(5534) :427–429, December 1975. ISSN 1476-4687. doi : 10.1038/258427a0. URL <https://www.nature.com/articles/258427a0>.

- Richa Trivedi, Ahmad Raza Khan, Poonam Rana, Seenu Haridas, B. S. Hemanth Kumar, Kailash Manda, Ram K. S. Rathore, Rajendra P. Tripathi, and Subash Khushu. Radiation-induced early changes in the brain and behavior : serial diffusion tensor imaging and behavioral evaluation after graded doses of radiation. *J. Neurosci. Res.*, 90 (10) :2009–2019, October 2012. ISSN 1097-4547. doi : 10.1002/jnr.23073.
- Cathy Vakil. Radiation and medical procedures. *Can Fam Physician*, 63(10) :774–775, October 2017. ISSN 0008-350X. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5638477/>.
- Tine Verreet, Roel Quintens, Debby Van Dam, Mieke Verslegers, Mirella Tanori, Arianna Casciati, Mieke Neefs, Liselotte Leysen, Arlette Michaux, Ann Janssen, Emiliano D’Agostino, Greetje Vande Velde, Sarah Baatout, Lieve Moons, Simonetta Pazzaglia, Anna Saran, Uwe Himmelreich, Peter Paul De Deyn, and Mohammed Abderrafi Benotmane. A multidisciplinary approach unravels early and persistent effects of X-ray exposure at the onset of prenatal neurogenesis. *J Neurodev Disord*, 7(1), 2015. ISSN 1866-1947. doi : 10.1186/1866-1955-7-3. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4448911/>.
- Tine Verreet, Janaki Raman Rangarajan, Roel Quintens, Mieke Verslegers, Adrian C. Lo, Kristof Govaerts, Mieke Neefs, Liselotte Leysen, Sarah Baatout, Frederik Maes, Uwe Himmelreich, Rudi D’Hooge, Lieve Moons, and Mohammed A. Benotmane. Persistent Impact of In utero Irradiation on Mouse Brain Structure and Function Characterized by MR Imaging and Behavioral Analysis. *Front Behav Neurosci*, 10 :83, 2016a. ISSN 1662-5153. doi : 10.3389/fnbeh.2016.00083.
- Tine Verreet, Mieke Verslegers, Roel Quintens, Sarah Baatout, and Mohammed A. Benotmane. Current Evidence for Developmental, Structural, and Functional Brain Defects following Prenatal Radiation Exposure. *Neural Plasticity*, 2016b. doi : 10.1155/2016/1243527. URL <https://www.hindawi.com/journals/np/2016/1243527/>.
- Charles W. Lloyd and Scott Townsend. *Space Radiation*. NASA Human Research Program Engagement and Communications. 2019.
- Alan E Waltar. The Medical, Agricultural, and Industrial Applications of Nuclear Technology. page 12, 2003.
- Apurva Watve, Mamta Gupta, Subash Khushu, and Poonam Rana. Longitudinal changes in gray matter regions after cranial radiation and comparative analysis with whole body radiation : a DTI study. *Int. J. Radiat. Biol.*, 94(6) :532–541, 2018. ISSN 1362-3095. doi : 10.1080/09553002.2018.1466064.
- Pamela M. Williams and Stacy Fletcher. Health Effects of Prenatal Radiation Exposure. *AFP*, 82(5) :488–493, September 2010. ISSN 0002-838X, 1532-0650. URL <https://www.aafp.org/afp/2010/0901/p488.html>.

Lianhong Yang, Jianhua Yang, Guoqian Li, Yi Li, Rong Wu, Jinping Cheng, and Yamei Tang. Pathophysiological Responses in Rat and Mouse Models of Radiation-Induced Brain Injury. *Mol Neurobiol*, 54(2) :1022–1032, 2017. ISSN 0893-7648. doi : 10.1007/s12035-015-9628-x. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5310567/>.

Chapitre 3

L'imagerie par résonance magnétique de diffusion : origine, séquence et modèles

L'objectif de ce chapitre est de présenter les bases physiques sur lesquelles repose l'imagerie par résonance magnétique (IRM) de diffusion. La méthode et les modèles permettant de remonter indirectement aux informations microstructurelles des tissus imagés en diffusion seront également précisés dans ce chapitre.

3.1 La diffusion des spins : du mouvement brownien à la diffusion restreinte et anisotrope

En un mot, le principe de l'IRM de diffusion va profiter de l'aimantation élémentaire de chaque noyau induite par le champ magnétique et "suivre" les déplacements de cette aimantation suite au processus de diffusion moléculaire. Pour l'encodage spatial, on va à nouveau utiliser des impulsions de gradients de champ magnétique, mais bien plus intenses que pour la production des images du fait qu'il faille encoder des déplacements microscopiques. Le signal IRM va donc bien dépendre de ces mouvements microscopiques, mais la résolution des images restant macroscopique, on aura affaire à une paramétrisation du phénomène au sein de chaque voxel. C'est exactement ce qui a motivé Einstein à travailler sur les liens entre diffusion et mouvement brownien (sa thèse de physique et l'article de 1905 (Einstein, 1926) établissant un lien entre ces deux phénomènes). Au début du 20^{ème} siècle, l'existence des atomes et des molécules était controversée, d'autant qu'ils ne pouvaient pas être "vus" par les instruments de l'époque. L'idée d'Einstein a été d'élaborer l'hypothèse que la diffusion (phénomène macroscopique visible décrit en particulier par les équations de Fick) était gouvernée par le mouvement brownien (invisible) des atomes animés par leur énergie cinétique. Si ces atomes existaient (microscopiquement) son modèle permettait de calculer exactement ce qui était observable (macroscopiquement) par la

diffusion, prouvant ainsi, indirectement, l'existence des atomes et molécules. Jean Perrin fut le premier à utiliser l'équation d'Einstein pour la diffusion pour déterminer l'existence et la taille de la molécule d'eau en 1909 (Perrin, 1909), ce qui lui a valu le prix Nobel.

De manière similaire, l'IRM de diffusion renseigne sur le parcours moléculaire de l'eau (si on considère l'IRM du noyau d'hydrogène, mais d'autres noyaux sont également utilisables) et les obstacles que celles-ci vont rencontrer (membranes cellulaires, fibres, etc.). Le coefficient de diffusion apparent (ADC) qui en résultera à l'échelle du voxel reflétera alors la structure microscopique du tissu, réalisant ainsi une sorte de biopsie virtuelle.

3.1.1 Cas idéal de la diffusion libre

Dans un milieu de température non nulle, les particules possèdent une énergie cinétique d'agitation qui engendre leur déplacement permanent et provoque des chocs entre particules. Le mouvement des particules entre chaque collision est appelé libre parcours moyen. Il est défini par la probabilité de déplacement de la position \vec{r}_0 à \vec{r} entre l'instant $t = 0$ et l'instant t :

$$P(\vec{r}/\vec{r}_0, t) = \left(\frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \right)^3 \exp \left(\frac{-(\vec{r} - \vec{r}_0)^2}{4Dt} \right) \quad (3.1)$$

Il est supposé indépendant pour chacune des particules, tout comme sa direction après chaque collision. Il s'agit d'un processus microscopique stochastique qui donne naissance à l'échelle macroscopique au phénomène de diffusion. La formalisation mathématique de la diffusion d'une particule fut émise par Albert Einstein (Perrin, 1909; Einstein, 1926) en 1905. Il définit le coefficient de diffusion D . L'équation d'Einstein généralisée aux mouvements de multiples dimensions est donnée par l'équation suivante :

$$D = \frac{\langle \vec{r}^2 \rangle}{2nT_d} \quad (3.2)$$

avec $\langle \vec{r}^2 \rangle$ le déplacement quadratique moyen de dimension n (1D, 2D ou 3D) d'une particule pendant une durée T_d . Cependant sa validité reste limitée dans le cas de la diffusion libre, autrement dit lorsque la distribution des déplacements est décrite par une gaussienne (Figure 3.1, A). Les particules ont la même probabilité de se déplacer dans toutes les directions de l'espace. Le libre parcours moyen est alors identique, quelle que soit la direction. Par exemple, dans un verre d'eau les molécules d'eau diffusent aléatoirement et vérifient les conditions de diffusion libre jusqu'à ce qu'elles rencontrent la paroi du verre lorsque la durée T_d est suffisamment longue. Dans les tissus cérébraux, la diffusion libre est un phénomène que l'on peut observer uniquement dans le liquide cébrospinal (LCS), à condition que la durée T_d ne soit pas trop longue.

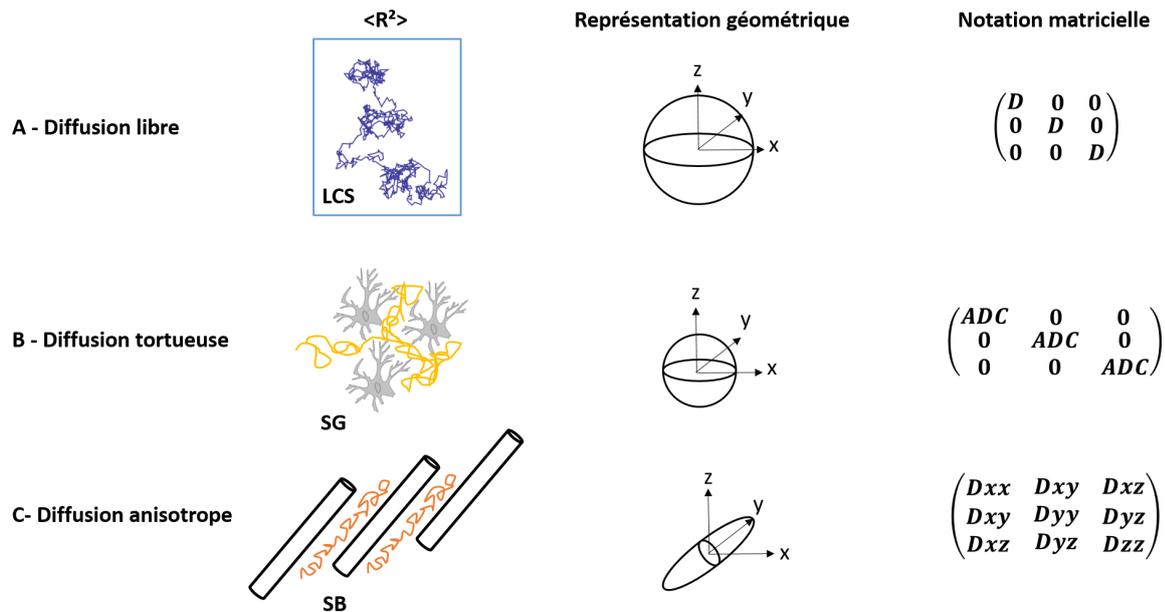


FIGURE 3.1 – Les différents types de diffusion. Dans l'eau libre, la diffusion libre s'applique (A). Dans le milieu extracellulaire la diffusion peut être tortueuse (B) et anisotrope (C). Le déplacement quadratique moyen pour la diffusion intracellulaire (restreinte et anisotrope) n'est pas schématisé sur cette Figure, mais la représentation géométrique et la notation matricielle sont les mêmes que pour la diffusion intracellulaire.

3.1.2 La diffusion en milieu biologique

La diffusion libre est un cas idéal qui n'est pas vérifié dans les tissus biologiques définis comme complexes et hétérogènes. Dans cet environnement la diffusion est qualifiée d'entravée et tortueuse, de restreinte et parfois d'anisotrope (Beaulieu, 2002).

Diffusions entravée et tortueuse

Les tissus biologiques peuvent être modélisés en deux types de compartiments : le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire. L'intérieur d'une cellule est constitué d'un cytosquelette (microtubules, microfilaments) et d'organites (noyau, mitochondries, ribosomes ...) qui agissent comme des obstacles et limitent le déplacement des particules dans cet espace. De plus, l'espace intracellulaire est délimité par des membranes qui confinent plus ou moins les déplacements moléculaires au sein de la cellule en fonction de leur perméabilité. Ces structures ne permettent donc pas la diffusion libre des molécules, la diffusion est alors qualifiée de restreinte si les molécules ne peuvent sortir du compartiment intracellulaire et d'entravée sinon.

La diffusion dans l'espace extracellulaire n'implique pas de cloisonnement. Cependant, elle est aussi contrainte par les membranes cellulaires (Figure 3.1, B). Elle est qualifiée de tortueuse en raison de l'encombrement de l'espace par ces membranes.

Du fait de la diffusion restreinte ou tortueuse, la diffusion est quantifiée par l'ADC. Il

vérifie l'inégalité $ADC < D$, le coefficient de diffusion D faisant référence à la quantification de la diffusion libre (section 3.1.1). Dans le cas de la diffusion restreinte, comme pour la diffusion libre, les molécules se déplacent sans direction préférentielle. Par conséquent le coefficient D dans le cas de la diffusion libre et l'ADC dans le cas de la diffusion restreinte sont des valeurs scalaires indépendantes de la direction de diffusion.

En plus de dépendre de la géométrie, l'ADC dépend également des conditions d'observation. En effet, pour un temps de diffusion court, l'ADC sera peu sensible à la géométrie puisque les molécules n'auront pas le temps de rencontrer les obstacles. Dans ce cas la diffusion peut être considérée comme pseudo-libre et dépendra de la température et de la viscosité du milieu. A contrario, pour des temps de diffusion relativement longs, la dépendance de l'ADC à la géométrie augmente. La distance quadratique parcourue pour $t \rightarrow \infty$ devient nulle dans le cas d'une diffusion restreinte avec membranes imperméables. Dans le cas d'une diffusion tortueuse, la distance parcourue tend vers l'infini lorsque $t \rightarrow \infty$. L'ADC est alors indépendant du temps de diffusion et est régi par l'équation : $ADC = \frac{D}{T^2}$, avec T la tortuosité.

Autres sources de déplacement

Au sein des cellules, en parallèle du phénomène de diffusion, des transports actifs existent. Tout comme la diffusion, ils nécessitent un apport énergétique. Ils peuvent être membranaires ou assistés. Par exemple, les transports membranaires permettent le passage de molécules (pompe Na^+/K^+). Les transports assistés reposent sur le déplacement de molécules par des protéines motrices qui se déplacent en changeant de conformation.

La micro circulation sanguine est une autre forme de déplacement. Les molécules (d'eau) dans les vaisseaux sanguins sont déplacées par le plasma en mouvement.

Diffusion anisotrope

Certains tissus présentent des organisations anisotropes, par exemple les cellules musculaires ou les axones (fibres de la substance blanche (SB)). En première approximation, ces cellules peuvent être assimilées à des cylindres. On comprend alors intuitivement que la diffusion dans ces cylindres est moins entravée que la diffusion à travers les membranes cellulaires, avec ou sans myéline pour la SB. La diffusion est alors qualifiée d'anisotrope et il devient nécessaire de calculer un coefficient de diffusion pour les différentes orientations (Figure 3.1, C). La notation scalaire n'est donc plus appropriée et la diffusion est maintenant quantifiée à l'aide d'un tenseur de diffusion \hat{D} de dimensions 3×3 .

Comme évoqué précédemment, l'IRM peut être sensibilisée au mouvement des molécules d'eau. Cette pondération du signal pour la diffusion de composés a été formalisée dès 1965 par Stejskal et Tanner (Stejskal et Tanner, 1965).

3.2 Séquence et modèles de l'IRM de diffusion

3.2.1 La séquence PGSE

La séquence "pulsed gradient spin echo" (PGSE) est représentée sur la Figure 3.2. Elle est dotée de deux gradients de champ magnétique supplémentaires, par rapport à la séquence d'écho de spin (SE) décrite en annexe dans la section B.2.6, appelés gradients de diffusion (G_{diff}). Ils sont de même durée δ , séparés par un intervalle de temps Δ et sont placés de part et d'autre de l'impulsion 180° de refocalisation. Le premier G_{diff} induit un déphasage $\Delta\phi$ qui peut être compensé par le deuxième G_{diff} . Cette compensation a lieu uniquement si les spins sont immobiles suivant la direction imposée par G_{diff} pendant le temps de diffusion Td . Dans le cas d'une séquence PGSE, il est défini par :

$$Td = \delta - \frac{\Delta}{3} \quad (3.3)$$

L'ajout de ces gradients G_{diff} labellise donc les spins en mouvement selon la direction des gradients de diffusion. La Figure 3.2 donne de façon schématique les phases des spins mobiles (en rouge) et immobiles (en bleu) dans la direction de G_{diff} lors du déroulement temporel de la séquence. Dans le cas des spins immobiles pendant le temps de diffusion Td , le libre parcours moyen est nul. Le signal RMN enregistré est donc identique à celui obtenu à partir d'une séquence SE (courbe bleue, Figure 3.2). Par contre dans le cas de spins mobiles dans la direction de G_{diff} pendant le même intervalle de temps Td , le déplacement induit un déphasage et le signal RMN enregistré résultant est atténué par rapport à celui d'une séquence SE (courbe rouge, Figure 3.2).

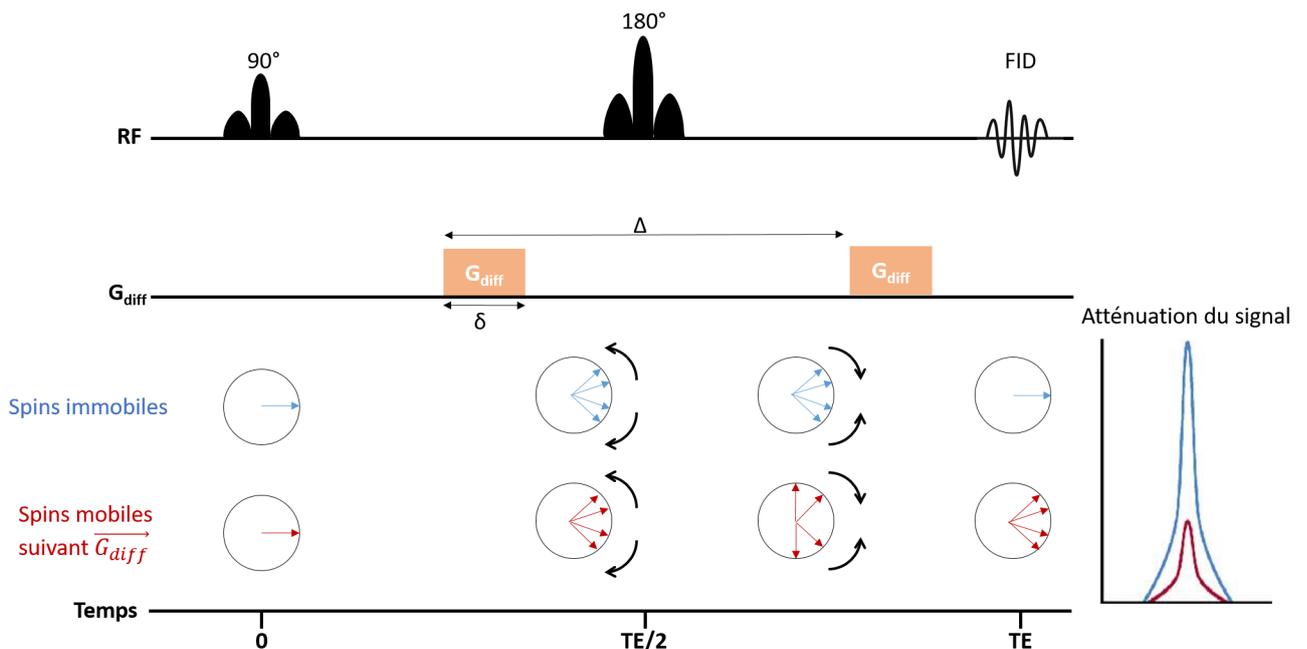


FIGURE 3.2 – L'encodage du mouvement de diffusion par la séquence PGSE.

La séquence PGSE est donc sensible à la diffusion des spins et fait partie du panel de séquences disponibles pour ce que l'on nomme l'IRM de diffusion. La pondération de diffusion est définie par la valeur du paramètre b exprimée en s/mm^2 selon l'équation (Le Bihan et Breton, 1985) :

$$b = \gamma^2 \int_0^{TE} \left[\int_0^t G(t) dt' \right]^2 dt \quad (3.4)$$

Pour une séquence PGSE, la pondération de diffusion est égale à :

$$b = \gamma^2 \times G_{diff}^2 \times \delta^2 \times \left(\delta - \frac{\Delta}{3} \right) \quad (3.5)$$

La forme des gradients de diffusion, leurs intensités ainsi que leurs durées et l'intervalle de temps entre les gradients peuvent être paramétrés de façon à obtenir la pondération de diffusion désirée. Le signal obtenu à partir de cette séquence PGSE est décrit par l'équation :

$$S(b) = S(b=0) \exp(-b \times D) \quad (3.6)$$

L'intensité du signal est donc dépendante de la pondération de diffusion appliquée. Toutefois, des signaux inappropriés peuvent apparaître sur les images IRM reconstruites avec une augmentation de l'intensité du signal dans une zone de l'image où il n'est pas censé en avoir, ou à l'inverse, une diminution de l'intensité du signal où il est censé y en avoir beaucoup. Ces signaux inappropriés sont appelés artefacts et il est important de les reconnaître, car ils peuvent masquer des lésions et/ou dégrader la qualité de l'image. Dans ce cas, un traitement d'images peut parfois s'appliquer a posteriori pour les corriger ou à minima les diminuer.

3.2.2 Artefacts majeurs en IRM de diffusion

Certains artefacts sont inhérents à l'équipement ou à la méthode de reconstruction de l'image tandis que d'autres sont d'origine physiologique.

En IRM de diffusion, les artefacts liés aux mouvements de l'échantillon *in vivo*, aussi appelés "ghosting", sont fréquents (Le Bihan et al., 2006; Zaitsev et al., 2015). Ils se manifestent par une réplique dans la direction de l'encodage de phase de l'échantillon imagé. Même si les mouvements sont souvent contraints par un équipement stéréotaxique (mors à dents et barres d'oreilles chez les rongeurs), les mouvements physiologiques comme la respiration, les battements cardiaques ou la pulsativité du LCS ne peuvent être exclus *in vivo*. La stabilité de ces paramètres physiologiques (à l'aide d'une anesthésie chez les rongeurs) peut néanmoins limiter l'apparition de ces artefacts, tout comme l'utilisation de bandes de saturation positionnées en dehors du champ de vue (en bas du cerveau en neuro-imagerie) pour diminuer le signal du flux sanguin entrant par exemple. Les séquences dites "rapides" peuvent "geler" les mouvements sur la période de l'acquisition (si la période d'acquisition est assez courte) et ainsi limiter l'apparition de ces artefacts (Zaitsev et al.,

2015). D'autres méthodes passent par la synchronisation des acquisitions avec le cycle respiratoire ou cardiaque, mais augmentent en contrepartie le temps d'acquisition (Skare et Andersson, 2001).

D'autres artefacts sont directement causés par le système et notamment les gradients de champ magnétique qui peuvent être non-linéaires et provoquer des distorsions dans les images reconstruites (anatomiques ou pondérées en diffusion) (Bammer et al., 2003). Cette non-linéarité peut par exemple s'exprimer par la reconstruction d'une image de légo avec des arêtes arrondies, alors qu'elles sont initialement droites.

La source majeure d'artefact réside néanmoins dans les courants de Foucault, qui apparaissent lorsque les gradients sont commutés rapidement. Comme c'est le cas avec l'encodage spatial "echo planar imaging" (EPI) décrit dans l'annexe B, souvent utilisé avec la séquence PGSE pour accélérer l'encodage (Jezzard et al., 1998). Ils proviennent de toute partie conductrice du système et génèrent à leur tour des champs magnétiques qui se combinent avec les gradients de champ magnétique utiles à l'encodage spatial. Les gradients locaux "réels" vus par les spins sont alors différents de ceux programmés pour produire et reconstruire les images. Cette différence n'étant pas prise en compte dans le logiciel de reconstruction, des distorsions de type contraction, dilatation, décalage ou cisaillement global apparaissent. Dans le cas de l'IRM de diffusion, ces distorsions augmentent avec la valeur de b (Figure 3.3) et sont faciles à identifier lorsque l'on compare les images acquises avec et sans un encodage EPI. L'encodage EPI est également intrinsèquement plus sensible aux décalages fréquentiels causés par les hétérogénéités de champ magnétique B_0 .

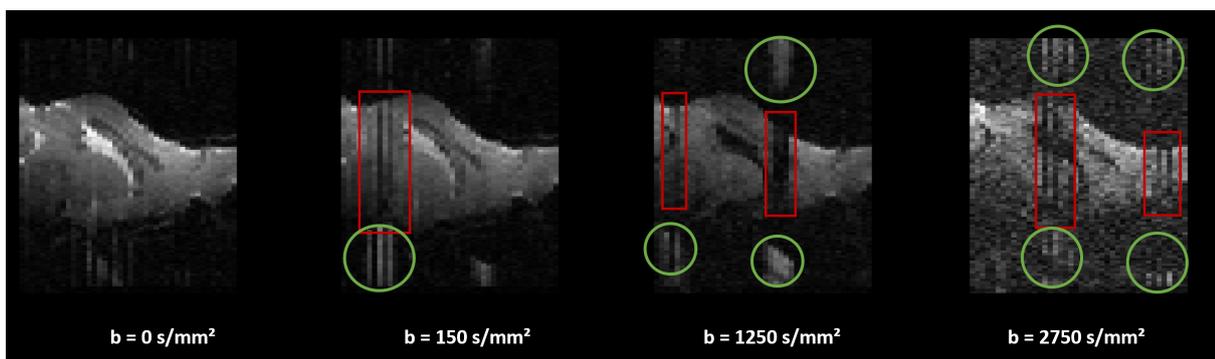


FIGURE 3.3 – Exemples d'artefacts présents sur des images IRM pondérées en diffusion acquises avec un encodage de type EPI pour des valeurs de b croissantes. Les encadrés verts correspondent au signal qui ne devrait pas exister tandis que les encadrés rouges correspondent à du signal manquant.

3.2.3 Modèle de diffusion gaussienne

À partir de l'équation (3.6), il est possible d'extraire le paramètre quantitatif D , soit à l'échelle d'une région d'intérêt soit à l'échelle du voxel, à partir de l'équation suivante :

$$D = \frac{\ln\left(\frac{S_{b_0}}{S_{b_1}}\right)}{b_1 - b_0}, \quad (3.7)$$

avec $S(b_1)$ et $S(b_0)$ l'intensité des signaux IRM obtenus aux pondérations b_1 et b_0 ($b_1 > b_0$). D correspond alors à la pente du logarithme de l'intensité du signal IRM en fonction du paramètre b . De façon générale, une seule des images IRM est pondérée en diffusion ($b_1, S(b_1)$), tandis que l'autre image correspond à l'image sans pondération de diffusion (appelée A_0) est obtenue avec $b_0 = 0$ s/mm². L'intensité du signal diminue de façon exponentielle avec la pondération de diffusion et donc l'atténuation du signal IRM augmente. Les hypo-intensités sur les images IRM pondérées en diffusion, correspondent donc à des fortes valeurs de D et inversement.

Cette équation (3.7) est valable dans les milieux où la diffusion est libre (gaussienne) et isotrope, comme dans les solutions dont les dimensions du contenant (d) vérifient $d \gg r$, avec r le rayon moyen des particules. Dans les milieux biologiques, qui ne satisfont pas la diffusion libre, l'atténuation de l'intensité du signal IRM peut néanmoins quantifier le processus de diffusion par le paramètre ADC. Concrètement, cela consiste à remplacer le paramètre D par ADC dans l'équation (3.7). Calculer la valeur ADC revient donc à résoudre un problème inverse dans le but de caractériser le processus de diffusion dans sa globalité. La valeur d'ADC calculée dépend de la direction de l'encodage du processus de diffusion (si le milieu n'est pas isotrope). Pour obtenir une valeur d'ADC plus robuste, l'acquisition des images IRM pondérées en diffusion peut s'effectuer suivant plusieurs directions de diffusion non colinéaires (en général 3), avant d'être moyennées. Ainsi, la valeur d'ADC obtenue est équivalente à une "Trace".

En routine clinique, les valeurs usuelles de pondération de diffusion utilisées sont $b_0 = 0$ et $b_1 = 1000$ s/mm² dans le cas du cerveau. Pour une meilleure estimation du paramètre ADC, l'acquisition de l'image pondérée en diffusion (b_1) est réalisée suivant les 3 directions principales de diffusion (Ox), (Oy) et (Oz), correspondant aux axes orthogonaux du scanner IRM, avant d'être moyennée.

En réalité l'approximation gaussienne est assez éloignée de la réalité des milieux biologiques. Son adoption mène à des erreurs systématiques sur l'estimation de l'ADC (Figure 3.4). Il est donc préférable d'adopter des modèles plus complexes, mais plus proches de la réalité.

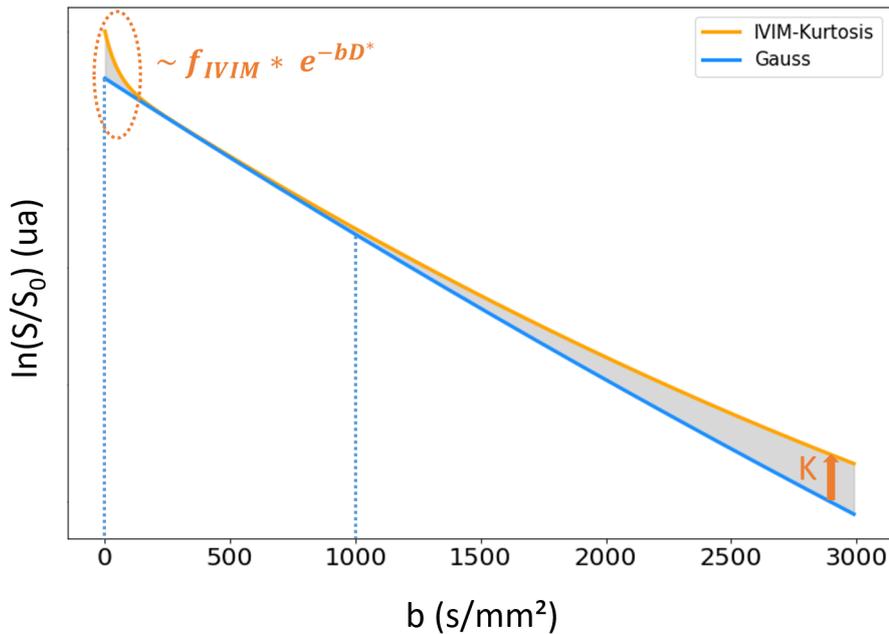


FIGURE 3.4 – Logarithme de l'atténuation du signal IRM de diffusion en fonction de sa pondération en diffusion. La courbe bleue est générée à partir du modèle gaussien (mono-exponentiel, équation (3.6)). La courbe orange est obtenue à partir du modèle non gaussien IVIM-Kurtosis (équation (3.14)). Les paramètres f_{IVIM} , D^* , ADC_0 et K ont été fixés à 0,02, 2×10^{-2} , 7×10^{-5} et 0,03 respectivement.

3.2.4 Modèle de diffusion non gaussienne

La nécessité des modèles mathématiques non gaussiens

L'ADC quantifie le processus de diffusion des molécules dans son ensemble et inclut d'autres sources de déplacements comme la perfusion, mais également des obstacles aux déplacements comme l'encombrement du milieu. La valeur d'ADC seule (et donc le modèle gaussien) ne permet donc pas de séparer les différentes contributions du processus de diffusion. C'est pourquoi d'autres modèles plus complexes sont utilisés afin de caractériser la diffusion non gaussienne. La Figure 3.4 illustre deux origines de la non-validité du modèle gaussien (courbe bleue) pour les tissus biologiques.

Pour les hautes valeurs de pondération de diffusion ($b > 1000$ s/mm²) ainsi que pour les faibles valeurs de pondération de diffusion ($b < 400$ s/mm²), le modèle gaussien (courbe bleue) sous-estime le logarithme de l'atténuation du signal (courbe orange). D'autres modèles ont donc été introduits pour mieux ajuster la courbe orange. Parmi les plus connus, on peut citer le modèle biexponentiel (Niendorf et al., 1996), "intra voxel incoherent motion" (IVIM) (Iima et Le Bihan, 2015; Le Bihan, 2019), Kurtosis (Chabert et al., 2004; Jensen et al., 2005) et exponentiel variable ("stretch-ADC") (Bennett et al., 2003).

Le modèle biexponentiel

Le modèle biexponentiel est un modèle construit phénoménologiquement. Il considère un système de deux compartiments distincts indépendants (en l'absence d'échanges moléculaires inter compartiments). Par conséquent, l'atténuation du signal IRM est égale à la somme des contributions de chacun des compartiments (*fast* et *slow*) (Niendorf et al., 1996) :

$$\frac{S(b)}{S(b=0)} = f_{slow} \times \exp(-bD_{slow}) + f_{fast} \times \exp(-bD_{fast}) \quad (3.8)$$

Les compartiments *slow* et *fast* font référence aux compartiments dont la diffusion est respectivement "lente" et "rapide". Ils sont définis par f , la fraction volumique ($f_{slow} + f_{fast} = 1$) et D , le coefficient de diffusion du compartiment. Ce modèle est valide pour des temps de diffusion (T_d) courts, c'est-à-dire pour $T_d \ll t$ avec T_d le temps moyen passé par les molécules dans les deux compartiments.

Au contraire si l'on considère $T_d \gg t$, l'échange entre les milieux "rapide" et "lent" est complet. L'atténuation du signal est alors modélisée par l'équation (Niendorf et al., 1996) :

$$\frac{S(b)}{S(b=0)} = \exp[-b(D_{fast} + D_{slow})] = \exp[-b \times ADC] \quad (3.9)$$

En théorie, par la résolution du problème inverse, ce modèle permet d'estimer les paramètres f_{fast} , f_{slow} , D_{fast} et D_{slow} . Une des limites de ce modèle réside dans l'identification des deux compartiments. Il a souvent été question d'associer le compartiment "rapide" avec le milieu extracellulaire et le compartiment "lent" avec le milieu intracellulaire. Cependant les fractions volumiques associées aux milieux intracellulaire et extracellulaire n'étant pas en adéquation avec les valeurs de f_{fast} et f_{slow} estimées, cette interprétation ne peut être corroborée.

Même si le modèle biexponentiel est plus adéquat que le modèle gaussien pour ajuster la courbe d'atténuation du signal, nous avons choisi de ne pas l'utiliser pour nos données.

Le modèle exponentiel variable

Le modèle exponentiel variable permet la quantification, à l'échelle du voxel, de l'hétérogénéité de la distribution des coefficients de diffusion. Il s'agit d'un modèle empirique traduit mathématiquement par (Bennett et al., 2003) :

$$\frac{S(b)}{S(b=0)} = \exp[-(b \times DDC)^\alpha] \quad (3.10)$$

avec α un paramètre variable compris entre 0 et 1 qui quantifie la déviation du signal par rapport à une mono-exponentielle et DDC la distribution du coefficient de diffusion. Pour $\alpha = 1$, la distribution du coefficient de diffusion est très homogène alors qu'une valeur de α inférieure à 1 est obtenue par la superposition de différents ensembles de protons (caractérisés par une valeur de coefficient de diffusion distinct) au sein d'un même voxel.

Le modèle IVIM

Une des causes de la déviation de l'atténuation du signal par rapport au modèle gaussien peut être attribuée à la micro circulation (perfusion), qui augmente la valeur du coefficient de diffusion aux faibles valeurs de b (Figure 3.4). Les molécules d'eau, présentes dans le flux sanguin, diffusent dans les capillaires qui sont orientés de façon aléatoire. La perfusion s'apparente à un processus de diffusion pour lequel l'IRM de diffusion y est sensible : c'est ce que l'on appelle l'IVIM (Le Bihan et Johansen-Berg, 2012; Le Bihan, 2019). Pour distinguer la diffusion libre de la diffusion IVIM, les paramètres D^* et D_b sont introduits pour quantifier la "pseudo-diffusion" (similaire à la diffusion libre du fait de l'orientation aléatoire des capillaires sanguins) et la diffusion des molécules d'eau dans le sang. L'atténuation du signal IRM est égale à la somme des contributions IVIM et de diffusion libre (Fournet, 2016) :

$$S(b) = S(b = 0) [(1 - f_{IVIM}) \exp(-bD) + f_{IVIM} \times F_{IVIM}(b)] \quad (3.11)$$

avec f_{IVIM} , la fraction volumique des vaisseaux sanguins. La contribution IVIM peut elle-même être modélisée par une fonction :

— mono-exponentielle (Le Bihan, 2019) :

$$F_{IVIM}(b) = \exp(-b(D^* + D_b))$$

— biexponentielle (Fournet et al., 2017) :

$$F_{IVIM}(b) = \exp(-bD_b) (f_{slow} \times \exp(-bD^*_{slow}) + f_{fast} \times \exp(-bD^*_{fast}))$$

— sinus cardinal (Le Bihan, 2019).

Par la suite on considère $D^* = D^* + D_b$. L'effet IVIM est visible uniquement aux faibles valeurs de pondération de diffusion, c'est-à-dire dans l'intervalle où la valeur de D^* est plus élevée que celle de D . L'intégration de la composante IVIM dans notre modèle ne suffit donc pas pour modéliser l'intégralité de l'atténuation du signal et plus particulièrement aux fortes valeurs de b .

Le modèle Kurtosis

Des modèles empiriques ont modélisé la déviation par rapport à l'ajustement mono-exponentiel de la courbe d'atténuation du signal comme le modèle Kurtosis (aussi appelé modèle polynomial). La diffusion moléculaire est décrite par une distribution de probabilité du déplacement. Dans le cas d'une diffusion libre, on rappelle que cette distribution est gaussienne. Cependant dans les tissus biologiques, la présence d'obstacles dans le milieu est en partie responsable (ainsi que l'IVIM) d'une non-gaussianité de cette distribution. Le degré de non-gaussianité de la distribution peut être estimé à l'aide du paramètre

adimensionné du Kurtosis (K) défini par :

$$K = \frac{M_4}{M_2^2} - 3 \quad (3.12)$$

avec M_n le $n^{\text{ème}}$ moment de la distribution centré par rapport à la valeur moyenne (Charbert et al., 2004; Jensen et al., 2005; Wu et Cheung, 2010). La Figure 3.5 présente trois distributions avec K , aussi appelé coefficient d'aplatissement, nul, positif ou négatif.

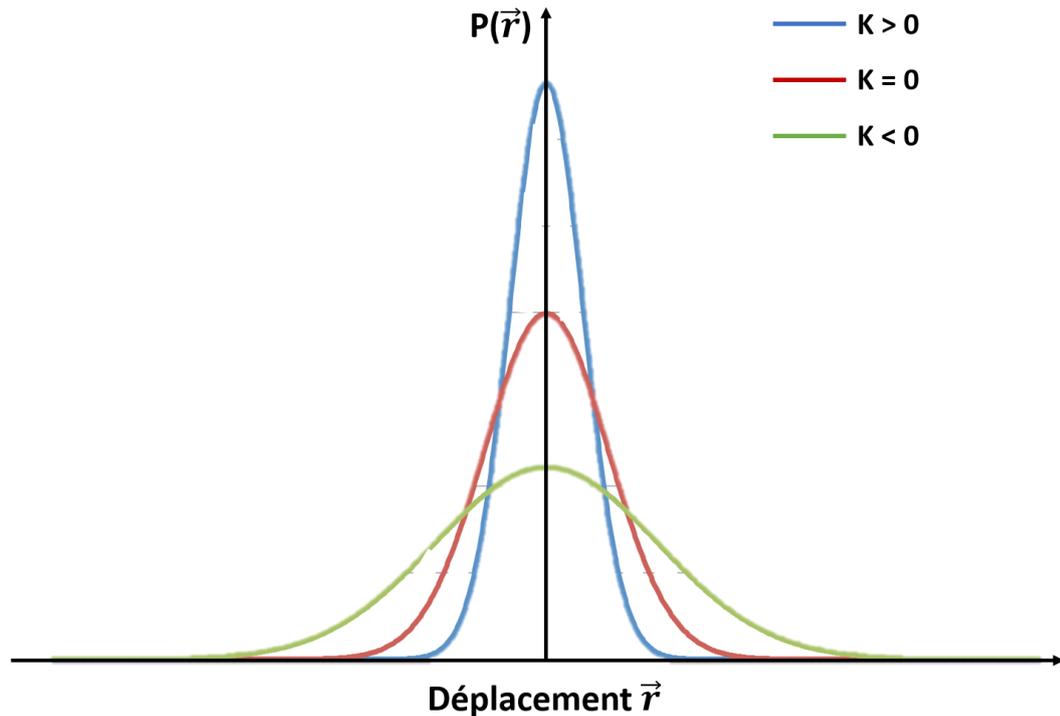


FIGURE 3.5 – Signe du Kurtosis pour une distribution gaussienne (rouge), une distribution pointue (bleu) et une distribution aplatie (vert).

Le modèle du Kurtosis est un modèle mathématique qui utilise le développement en série de Taylor du logarithme du signal (Jensen et Helpert, 2010) :

$$\ln \left(\frac{S(b)}{S(b=0)} \right) = -bADC + \frac{1}{6} (bADC)^2 K + O(b^3) \quad (3.13)$$

avec ADC , le coefficient de diffusion apparent.

Le modèle IVIM-Kurtosis

Au cours de cette thèse, nous avons choisi d'utiliser un modèle qui tient compte à la fois de la perfusion (IVIM) et de l'encombrement (Kurtosis) : le modèle IVIM-Kurtosis. Le signal IRM acquis avec une pondération de diffusion b peut être ajusté avec l'équation

suivante (Iima et Le Bihan, 2015) :

$$S(b) = S(b=0) \left\{ f_{IVIM} \times \exp(-bD^*) + (1 - f_{IVIM}) \times \exp \left[-bADC_0 + (bADC_0)^2 \frac{K}{6} \right] \right\} \quad (3.14)$$

Le signal IRM pondéré en diffusion ainsi décrit nécessite l'acquisition du signal non pondéré en diffusion ($S(b=0)$) et dépend de quatre paramètres :

- f_{IVIM} : la fraction volumique du flux sanguin dans le tissu ;
- D^* : le pseudo coefficient de diffusion associé à la perfusion sanguine ;
- ADC_0 : le coefficient de diffusion théorique atteint lorsque la valeur de b tend vers 0 (souvent assimilé à la pente à l'origine du logarithme de l'atténuation du signal) ;
- K : le Kurtosis.

Les paramètres à ajuster étant des scalaires, ce modèle ne nécessite pas l'acquisition de multiples directions de diffusion, hormis pour les moyenner. Toutefois, l'emploi de ce modèle requiert l'acquisition de multiples images pondérées en diffusion. Les faibles valeurs de b assurent l'estimation des paramètres liés au phénomène de perfusion (D^* , ADC_0 et f_{IVIM}) tandis que les des fortes valeurs de b sont utilisés pour estimer l'encombrement du milieu (ADC_0 et K).

Le concept du "Signature Index"

La caractérisation de la diffusion non gaussienne a également été réalisée à l'aide d'une nouvelle approche : le S-Index (SI). Le principe de cette approche, introduit par Denis Le Bihan (Iima et Le Bihan, 2015), consiste à comparer directement les signaux acquis en IRM de diffusion dans le tissu imagé avec ceux de tissus de référence, sans passer par un modèle biophysique ou biologique. Comme nous l'avons vu, les modèles existants reposent sur des hypothèses simplificatrices pas toujours validées et une série de paramètres à estimer, ce qui requiert l'utilisation de jeux de données acquis dans de nombreuses conditions (par exemple multiples valeurs de b), et donc des temps d'acquisition longs et parfois prohibitifs à l'égard de la stabilité physiologique des sujets examinés. De plus les méthodes d'estimation des paramètres des modèles sont sensibles au bruit des données et les résultats peuvent être très variables.

Dans le cadre de notre étude deux tissus de référence "signatures", A et B, ont été utilisés pour maximiser la détection d'une légère prolifération et une raréfaction cellulaire (celle-ci étant attendue lors d'une irradiation). Le S-Index (SI) est calculé comme une distance algébrique relative $Sdist(V)$ entre les signaux acquis, S_V , et les signaux "signatures", S_R , pour un noyau de valeurs de b prédéterminé ("key b values", b_k).

$$Sdist(V) = \sum_{b_k \in \text{keybvalues}} (-1)^{G(b_k)} \left[\frac{S_V(b_k) - S_R(b_k)}{S_R(b_k)} \right], \quad (3.15)$$

avec $G(b_k)$ une fonction qui tient compte du sens de la dérivée $\frac{\partial S}{\partial b}$. Cette distance est

ensuite normalisée, $SnI(V)$. Dans le cas de deux tissus, A et B, on obtient :

$$SnI(V) = \left\{ \max \left[\frac{Sdist(V)}{Sdist(A)}, 0 \right] - \max \left[\frac{Sdist(V)}{Sdist(B)}, 0 \right] \right\} \quad (3.16)$$

qui prend la valeur +1 quand les signaux du tissu V sont identiques à ceux de A, et -1 pour le tissu B. Le SI est finalement obtenu par un simple changement d'échelle :

$$SI = (SnI(V) + 1) \times 25 + 25 \quad (3.17)$$

Un tissu V aura donc un SI de 75 s'il est identique à A (du point de vue diffusionnel) et 25 pour B (Iima et al., 2015). En pratique il a été démontré par Iima et al. (2015) que deux valeurs de b (b_{low} et b_{high}) suffisent généralement pour obtenir un SI avec une précision suffisante pour classifier les tissus, à condition que ces valeurs de b soient optimisées pour donner une sensibilité maximale du signal pondéré en diffusion à la diffusion gaussienne, à la diffusion non gaussienne et à la pseudo-diffusion (IVIM).

Géométriquement l'approche du SI consiste à faire une rotation et un redressement des courbes d'atténuation du signal $S = f(b)$ telle que l'atténuation devient une droite horizontale pour un tissu neutre entre A et B. Dans ce nouvel espace, les tissus ayant un profil de signal au-dessus de la droite neutre sont de type A et ceux ayant un profil de signal sous la droite neutre sont de type B. En pratique c'est souvent la pente de la droite entre b_{low} et b_{high} qui contribue le plus à la valeur du SI (positive pour le type A et négative pour le type B). Quantitativement la proximité du signal étudié avec ceux des signaux A et B est donné par le SI dont les valeurs peuvent être supérieures à 75 ou inférieures à 25 (Figure 3.6). Ces valeurs extrêmes suggèrent que les propriétés tissulaires du tissu V à l'échelle microscopique sont plus marquées sur celles des tissus A et B. Par exemple, si le tissu A correspond à une légère prolifération cellulaire, un SI de 100 suggère une très forte prolifération cellulaire (tumeur). Au contraire si le tissu B correspond à une légère raréfaction cellulaire un SI de 5 peut correspondre à de l'œdème ou une nécrose. Deux étapes sont donc nécessaires, une fois pour toutes, pour permettre ensuite le traitement de toutes les données de l'étude :

1. La première étape est d'établir le noyau de valeurs de b. Ces valeurs sont obtenues une fois pour toutes pour un tissu représentatif donné en maximisant $\frac{\partial S}{\partial b}$, analytiquement ou numériquement, pour chacune des composantes (IVIM, diffusion gaussienne et diffusion non gaussienne). Pour cela, dans le cadre de notre étude des signaux ont été obtenus avec 20 valeurs de b (voir chapitre 4) sur une petite cohorte de souris saines non irradiées à partir de régions d'intérêt globales sur le cerveau. En utilisant le modèle IVIM/Kurtosis, les paramètres moyens suivants ont été obtenus : $f_{IVIM} = 0,02$; $D^* = 4 \times 10^{-2} \text{ mm}^2/\text{s}$; $ADC_0 = 7 \times 10^{-4} \text{ mm}^2/\text{s}$ et $K = 0,7$. Avec ces paramètres la sensibilité optimale pour f_{IVIM} et D^* est obtenue avec $b = 400 \text{ s}/\text{mm}^2$ (par exemple moins d'un pour cent de variation de $S(V)$ quand f_{IVIM} passe à 0,04 ou quand D^* passe à 2×10^{-2}). La sensibilité optimale pour

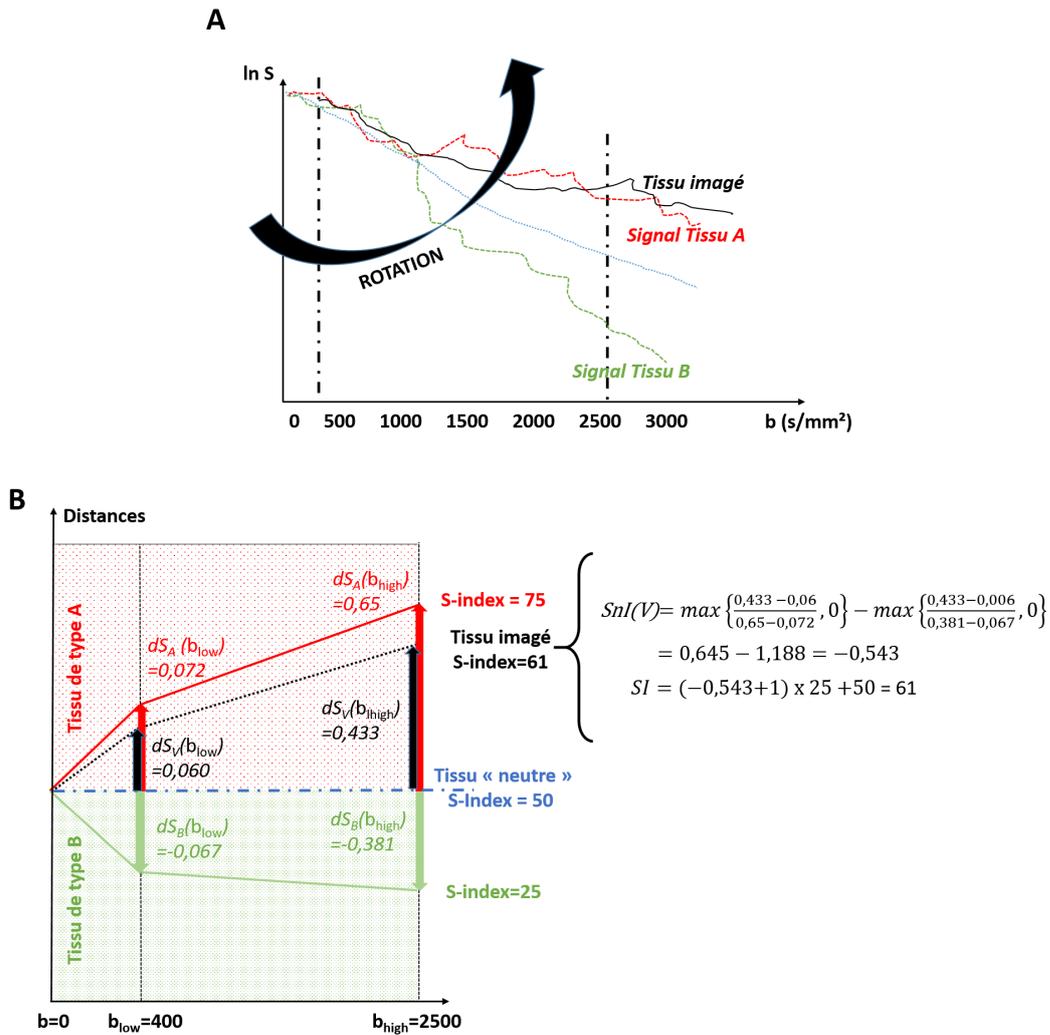


FIGURE 3.6 – (A) Exemple d'atténuation du signal en fonction de b pour un tissu A, B, neutre et imagé. (B) Calcul du SI d'un tissu V à partir des signaux signatures des tissus A et B.

ADC_0 est obtenue pour $b = 1800 \text{ s/mm}^2$ (par exemple 19% de variation de $S(V)$ quand ADC_0 passe à $9 \times 10^{-4} \text{ mm}^2/\text{s}$). Celle pour K augmente sans maximum défini. Dans ces conditions, en tenant compte de la diminution du rapport signal sur bruit (SNR) avec l'augmentation de b , la valeur de b optimale pour ADC_0 et K est de 2500 s/mm^2 (par exemple 37 % de variation de $S(V)$ quand ADC_0 passe de 7 à $9 \times 10^{-4} \text{ mm}^2/\text{s}$ et K de $0,7$ à 1). Les valeurs de b_{low} et b_{high} pour l'ensemble des études ont donc été de 400 et de 2500 s/mm^2 , respectivement. Ces valeurs garantissent la plus grande dynamique de sensibilité pour détecter dans un tissu une augmentation de perfusion (f_{IVIM}), une diminution de la diffusion gaussienne (ADC_0) et une augmentation de la non-gaussianité (K), correspondant à une augmentation de la densité cellulaire, et la situation inverse pour une perte de densité cellulaire.

- La seconde étape est d'établir la valeur des signaux "signatures" pour ces valeurs de b . Idéalement, ces valeurs sont obtenues à partir de signaux réels acquis pour les tissus de référence A et B. Dans le cas où nous ne disposons pas de ces signaux, ceux-ci sont simulés à partir de signaux réels en utilisant un modèle d'IRM de diffusion le plus réaliste possible (donnant une représentation de l'atténuation du signal la plus fidèle possible). Il est important de noter que ce modèle n'est utilisé que pour générer des signaux de référence une fois pour toutes, mais pas pour calculer le SI à proprement parler. Dans le cadre de cette étude les signaux A et B ont été arbitrairement générés en partant du signal cérébral global obtenu chez des souris saines non irradiées (également utilisées pour déterminer les valeurs de b_{low} et b_{high}), en altérant les valeurs de f_{IVIM} , ADC_0 et K dans un sens (diffusion plus entravée, correspondant à une petite augmentation de la densité cellulaire) et dans l'autre (diffusion moins entravée, correspondant à une petite diminution de densité cellulaire). À partir de ces paramètres "signatures" les signaux S_A et S_B pour b_{low}

Tissus	ADC_0 ($10^{-4} \text{ mm}^2/\text{s}$)	K	f_{IVIM} (%)	D^* ($10^{-2} \text{ mm}^2/\text{s}$)
Neutre moyen	7,0	0,7	2	2
A (- restreinte)	7,5	0,6	1	1
B (+ restreinte)	6,5	0,8	3	3

TABLE 3.1 – Valeurs des paramètres ADC_0 , K , f_{IVIM} et D^* utilisées pour la simulation des signaux A et B, correspondant à une diffusion moins et plus restreinte respectivement par rapport à un tissu neutre moyen.

et b_{high} ont été reconstitués une fois pour toutes avec le modèle IVIM/Kurtosis. Il est important de noter que les valeurs de SI vont varier de manière importante selon les régions cérébrales, la nature tissulaire de celles-ci s'écartant évidemment plus ou moins du "tissu neutre moyen". La SB, en particulier, aura des valeurs de SI élevées en lien avec la compacité des fibres axonales myélinisées. La substance grise (SG) aura, elle, des valeurs de SI plus basses (Figure 3.7). Dans le cadre de cette étude ce ne sont donc pas les valeurs de SI de base pour chaque région qui sont

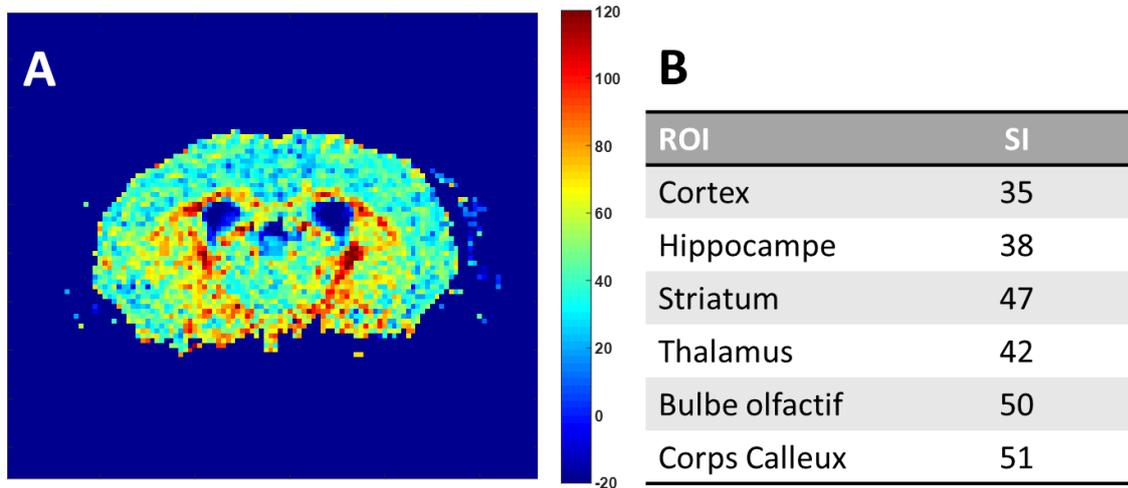


FIGURE 3.7 – (A) Exemple de carte paramétrique SI sur une coupe axiale de cerveau de souris saine non irradiée et (B) exemples de valeurs de SI pour différentes régions cérébrales chez une souris saine non irradiée.

importantes, mais les modifications éventuelles de ces valeurs après irradiation. Si celle-ci s'accompagne d'une perte cellulaire, on s'attend donc à une diminution du SI en proportion de cette perte cellulaire. Une forte diminution du SI pourrait toutefois aussi correspondre à la présence d'un œdème ou de nécrose.

3.2.5 Modèle de diffusion anisotrope

Modèle DTI gaussien

Les précédents modèles décrits (mono-exponentiel, mono-exponentiel variable, bi-exponentiel, IVIM, Kurtosis) peuvent être étendus afin de caractériser la diffusion des spins à l'échelle du voxel, notamment dans les milieux anisotropes comme la SB. Par exemple, si on considère le modèle gaussien, l'ADC varie en fonction de la direction et ne peut donc plus être limité par une valeur scalaire. La diffusion est alors représentée mathématiquement par un tenseur de dimension 3x3 (Kingsley, 2006) :

$$\hat{D} = \begin{pmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ & D_{yy} & D_{yz} \\ & & D_{zz} \end{pmatrix} \quad (3.18)$$

Le tenseur de diffusion étant symétrique le nombre d'inconnus est réduit à 6. Pour résoudre un système d'équations à 6 inconnues, 7 images pondérées en diffusion au minimum doivent être acquises : 6 pondérées en diffusion avec des directions non colinéaires et 1 sans pondération de diffusion. Ces directions de diffusion (orientées suivant \vec{G}_{diff}) doivent échantillonner l'angle solide 4π de l'espace de façon homogène. L'orientation de ces directions de diffusion peut être définie à l'aide d'un algorithme reposant sur la répulsion électrostatique de particules chargées (Jones et al., 1999).

L'ajustement du signal IRM sur le modèle gaussien et anisotrope est régi par l'équation :

$$S(b) = S(b = 0) \times \exp(-\widehat{b}\widehat{D}) \quad (3.19)$$

\widehat{b} et \widehat{D} étant maintenant des tenseurs 3x3.

La résolution du système d'équations passe par la diagonalisation de \widehat{D} qui correspond au tenseur de diffusion dans le référentiel des vecteurs propres ($\vec{e}_1, \vec{e}_2, \vec{e}_3$) orienté avec la structure imagée et non plus le référentiel ($\vec{X}, \vec{Y}, \vec{Z}$) du scanner :

$$\widehat{D} = \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3 \end{pmatrix} \quad (3.20)$$

Les valeurs propres associées λ_1, λ_2 et λ_3 , quant à elles, correspondent à l'ADC selon les axes propres. Ces valeurs permettent d'obtenir :

- la fraction d'anisotropie (FA). Elle nous renseigne sur le degré d'anisotropie du milieu. Il s'agit d'un paramètre dont la valeur est comprise entre 0 et 1. Plus la valeur s'approche de 0, plus le milieu est isotrope. Au contraire plus la valeur s'approche de 1 et plus le milieu est anisotrope. Elle est calculée à partir de l'équation suivante :

$$FA = \sqrt{\frac{3}{2} \frac{\sqrt{(\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2 + (\lambda_3 - \lambda_1)^2}}{\sqrt{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}}} \quad (3.21)$$

- la diffusivité moyenne (MD) est la trace de \widehat{D} divisée par 3. Elle est assimilée à l'ADC des milieux isotropes et décrit l'amplitude du mouvement de diffusion moyennée sur les directions
- la diffusivité axiale (AD) est égale à la valeur propre λ_1 de \widehat{D} . Elle indique l'amplitude du mouvement de diffusion suivant la direction de diffusion privilégiée (la plus élevée).
- la diffusivité radiale (RD) est égale à la moyenne des valeurs propres λ_2 et λ_3 et nous indique l'amplitude du mouvement de diffusion dans la direction de diffusion perpendiculaire à celle privilégiée.

L'anisotropie cérébrale est souvent représentée à l'aide de la carte paramétrique de FA (comme sur la Figure 3.8), dont l'intensité est proportionnelle à la valeur de FA et les couleurs rouge, vert et bleu codent les axes de diffusion droite-gauche, antérieur-postérieur, inférieur-supérieur respectivement.

Un point important à noter est que dans le cadre de cette étude, tous les paramètres estimés avec le modèle d'imagerie du tenseur de diffusion (DTI) sont obtenus en utilisant les "key b values" du SI (dans notre cas 400 et 2500 s/mm²) et non les valeurs habituelles du DTI (en général 0 et 1000 s/mm²). Les valeurs attendues seront donc différentes avec ces valeurs de b "shiftées" (valeurs plus basses pour la MD, plus hautes pour FA). Pour éviter toute confusion (en particulier quand ces valeurs sont comparées à celles de la littérature) nous avons fait précéder ces quantités de la lettre "s" pour "shifted" (sMD,

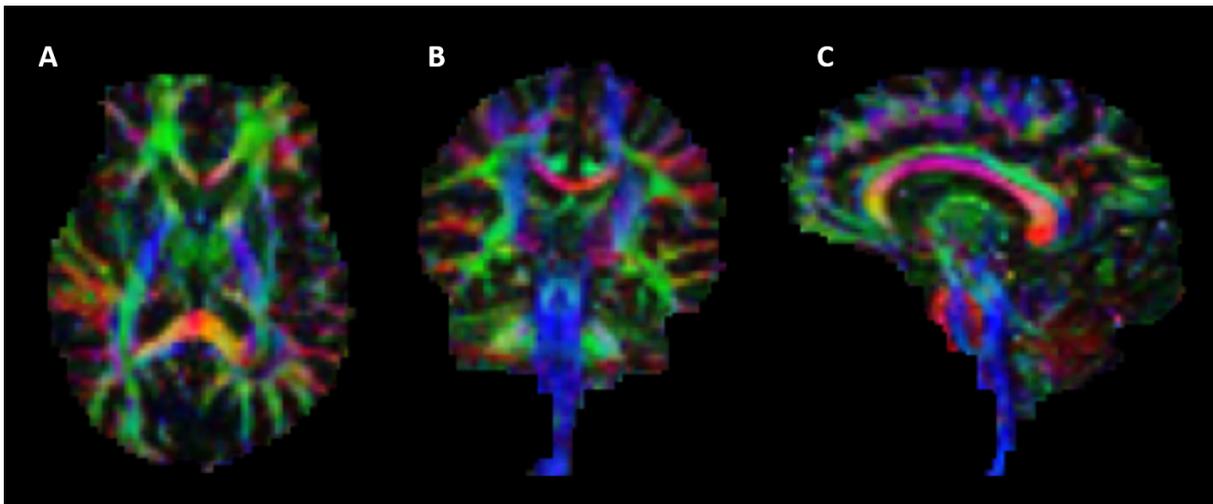


FIGURE 3.8 – Cartes de FA et tractogramme des fibres de substance blanche du cerveau humain (Van Steenkiste et al., 2016). Coupe axiale (A), coronale (B) et sagittale (C) de la carte de FA avec les couleurs rouge, vert et bleu qui codent pour les directions de diffusion droite-gauche, antérieur-postérieur, inférieur-supérieur respectivement.

sFA, etc) (Figure 3.9).

Modèle DTI non gaussien

Le modèle original DTI est limité par son hypothèse de diffusion gaussienne qui ne reflète pas fidèlement la diffusion dans les tissus biologiques. D'autres modèles se basent sur une approche non gaussienne pour une caractérisation plus complète, mais nécessitent un nombre plus conséquent d'acquisitions. Par exemple, le modèle d'imagerie du tenseur de Kurtosis (DKI) nécessite l'acquisition d'au minimum 15 directions pour calculer à l'échelle du voxel le tenseur de Kurtosis de dimensions 4×4 . Le Kurtosis moyen (MK), axial (AK) et radial (RK) sont estimés de façon similaire aux paramètres MD, AD, RD obtenus à l'aide du modèle DTI (Jensen et Helpert, 2010). Cette approche n'est pas très utilisée en pratique, car elle nécessite de très gros sets de données et des temps d'acquisition trop longs.

Tractographie

L'anisotropie, calculée avec le modèle DTI ou DKI est caractérisée de façon discrète (à l'échelle du voxel) avec le tenseur de diffusion. Cependant il existe des approches continues qui visent à calculer un tractogramme (Figure 3.10). Des méthodes numériques réunissent par une courbe les voxels contigus avec la même direction préférentielle de diffusion \vec{e}_1 (Conturo et al., 1999; Mori et al., 1999; Jones et Leemans, 2011; Le Bihan, 2003). Dans le cas du cerveau, cette méthode de tractographie est utilisée pour visualiser les faisceaux de SB.

Au-delà de ces approches, se développent d'autres techniques plus raffinées comme l'IRM de diffusion à haute résolution angulaire (HARDI) (Hosey et al., 2005; Chiang

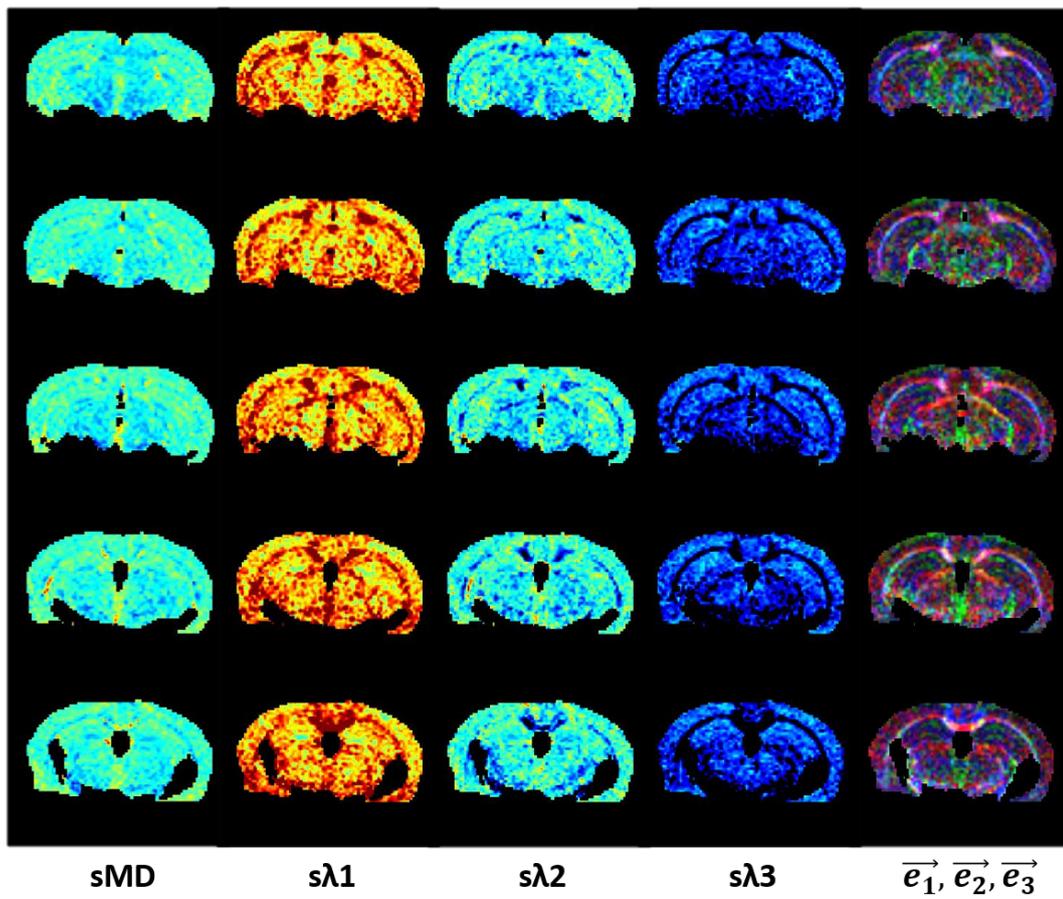


FIGURE 3.9 – Cartes paramétriques de sMD, $s\lambda_1$, $s\lambda_2$, $s\lambda_3$ et de l'orientation des vecteurs $\vec{e}_1, \vec{e}_2, \vec{e}_3$ (de gauche à droite) chez une souris saine non irradiée.

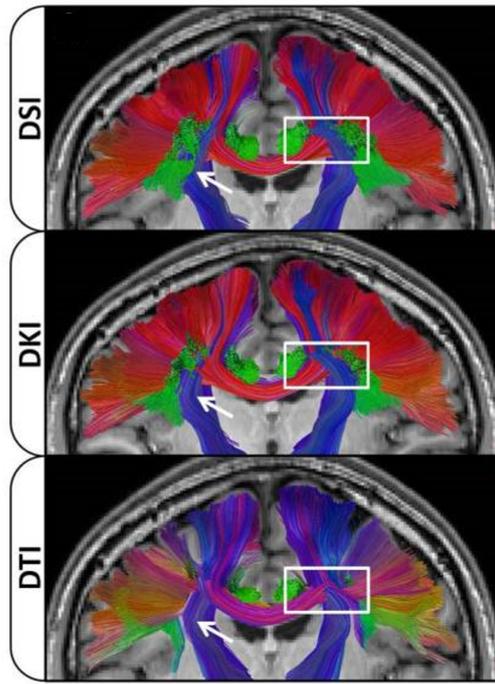


FIGURE 3.10 – Tractogrammes calculés par DTI, DKI et DSI superposés sur la coupe coronale anatomique pondérée T_1 correspondante (Glenn et al., 2016). Les données ont été acquises chez 3 volontaires sains et les données présentées correspondent à la moyenne. Les orientations gauche-droite, inférieure-supérieure, antérieure-postérieure sont représentées en rouge, bleu et vert. La détection de fibres apparaît plus sensible avec la méthode de DSI (flèche blanche). Le cadre blanc délimite une région avec un croisement de fibres de la SB. Les modèles DTI et DKI sont moins fiables dans la résolution de croisements de fibres complexes par rapport au modèle DSI.

et al., 2008) ou l'imagerie du spectre de diffusion (DSI) (Glenn et al., 2016; Wedeen et al., 2008). Elles ont pour but de reconstruire les tractogrammes avec des configurations complexes telles que les croisements de fibres ou la présence multiple de fibres au sein d'un voxel.

3.2.6 Diffusion anisotrope et S-Index

La présence d'une diffusion anisotrope implique une étape supplémentaire dans le calcul du SI. Le SI est dépendant des profils des signaux et ceux-ci dépendent dans ce cas de l'orientation des tissus par rapport au système de gradients. Les valeurs de SI ne sont donc pas, par principe, invariantes pour la rotation. Pour remédier à cette limitation, le SI n'est pas calculé sur les acquisitions pour chaque direction, mais sur la moyenne géométrique des signaux sur l'ensemble des directions.

Dans le cadre de la diffusion gaussienne, on peut montrer que la moyenne géométrique des signaux est bien invariante pour la rotation, les effets d'anisotropie disparaissant complètement si les directions d'encodage de la diffusion ont bien été réparties de manière homogène sur un angle solide de 4π , et si la somme des termes croisés pour les valeurs de b sur l'ensemble des directions est nulle ou négligeable.

Le SI calculé à partir des moyennes géométriques des signaux est donc bien invariant pour la rotation. Si la diffusion est non-gaussienne, il faut recourir à une moyenne spatiale beaucoup plus complexe avec au minimum 15 directions, comme expliqué plus haut avec le tenseur du Kurtosis. Toutefois on peut montrer que les signaux moyennés à partir de 6 directions permettent de réduire considérablement les effets de l'anisotropie de sorte que les conséquences d'une rotation dans l'espace sur les signaux moyennés deviennent négligeables (Fournet et al., 2019).

Il est toutefois possible aussi de définir des grandeurs dérivées du SI qui expriment l'anisotropie (et donc ses variations dans le cadre d'une irradiation). Pour cela les signaux tissulaires $S(V)$ sont extrapolés pour b_{low} et b_{high} pour chacune des directions propres \vec{e}_1 , \vec{e}_2 et \vec{e}_3 à partir des valeurs λ_1 , λ_2 et λ_3 en utilisant un modèle de diffusion gaussienne (mono-exponentielle). En effet, bien que la diffusion soit non gaussienne, seules importent les valeurs des signaux pour b_{low} et b_{high} , indépendamment de l'allure du signal entre ces valeurs de b . Comme les valeurs λ_1 , λ_2 et λ_3 sont obtenues à partir des signaux acquis avec ces valeurs de b , l'effet de courbure des signaux lié à la diffusion non gaussienne est intrinsèquement pris en compte (en clair, les signaux obtenus avec b_{high} relativement aux signaux obtenus avec b_{low} sont plus élevés qu'en présence de diffusion gaussienne).

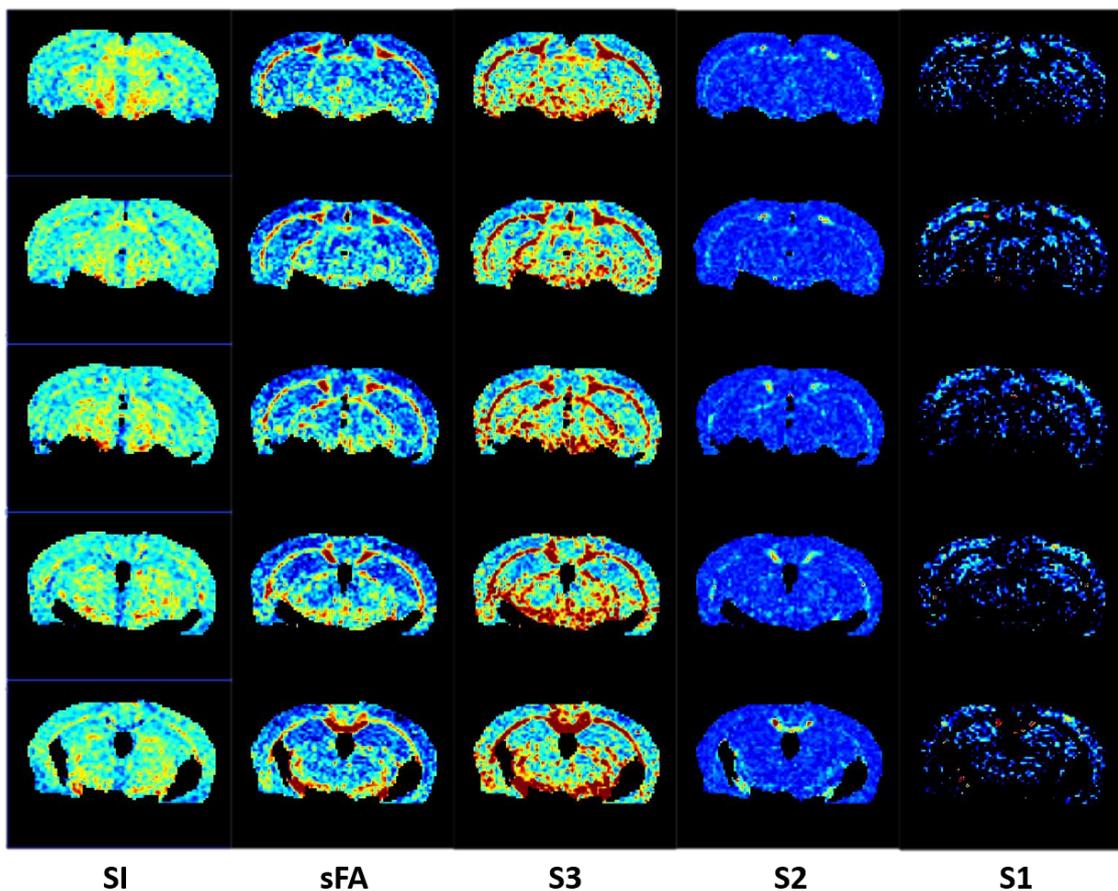


FIGURE 3.11 – Cartes paramétriques de SI, sFA, S3, S2 et S1 (de gauche à droite) chez une souris saine non irradiée.

Les signaux reconstitués $S1(V)$, $S2(V)$ et $S3(V)$ permettent ensuite de calculer un SI $SI1$, $SI2$ et $SI3$ correspondant à chaque direction propre \vec{e}_1 , \vec{e}_2 et \vec{e}_3 . Si la diffusion est isotrope on a : $SI1 = SI2 = SI3 = SI$. La déviation $SI_{1,2,3}$ du SI reflète le degré d'anisotropie de diffusion avec dans ce cas $SI1 < SI2 < SI3$ ($SI2$ est en général voisin de $\frac{SI1+SI2+SI3}{3}$ et de SI). La quantité $S3 = SI3 - SI$ est donc par exemple un marqueur de l'anisotropie et de la SB (comparable à FA, mais différente par construction, car faisant appel à des

tissus "signatures"). La quantité $S1 = S11 - S1$ (négative en présence d'anisotropie) sera maximale dans les régions ne présentant pas ou peu d'anisotropie, comme la SG (Figure 3.11).

Bibliographie

R. Bammer, M. Markl, A. Barnett, B. Acar, M. T. Alley, N. J. Pelc, G. H. Glover, and M. E. Moseley. Analysis and generalized correction of the effect of spatial gradient field distortions in diffusion-weighted imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, 50(3) :560–569, 2003. ISSN 1522-2594. doi : 10.1002/mrm.10545. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mrm.10545>.

Christian Beaulieu. The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system - a technical review. *NMR in Biomedicine*, 15(7-8) :435–455, 2002. ISSN 0952-3480, 1099-1492. doi : 10.1002/nbm.782. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/nbm.782>.

Kevin M. Bennett, Kathleen M. Schmainda, Raoqiong Bennett (Tong), Daniel B. Rowe, Hanbing Lu, and James S. Hyde. Characterization of continuously distributed cortical water diffusion rates with a stretched-exponential model. *Magnetic Resonance in Medicine*, 50(4) :727–734, 2003. ISSN 0740-3194. doi : 10.1002/mrm.10581. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mrm.10581>.

S Chabert, C C Meca, and D Le Bihan. Relevance of the information about the diffusion distribution in vivo given by kurtosis in q-space imaging. page 1, 2004.

Ming-Chang Chiang, Marina Barysheva, Agatha D. Lee, Sarah Madsen, Andrea D. Klunder, Arthur W. Toga, Katie L. McMahon, Greig I. de Zubicaray, Matthew Meredith, Margaret J. Wright, Anuj Srivastava, Nikolay Balov, and Paul M. Thompson. Brain Fiber Architecture, Genetics, and Intelligence : A High Angular Resolution Diffusion Imaging (HARDI) Study. *Med Image Comput Comput Assist Interv*, 11(Pt 1) :1060–1067, 2008. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3073165/>.

Thomas E. Conturo, Nicolas F. Lori, Thomas S. Cull, Erbil Akbudak, Abraham Z. Snyder, Joshua S. Shimony, Robert C. McKinstry, Harold Burton, and Marcus E. Raichle. Tracking neuronal fiber pathways in the living human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(18) :10422–10427, 1999. ISSN 0027-8424. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC17904/>.

Albert Einstein. Investigation on the theory of the brownian movement. 1926.

Gabrielle Fournet. *IVIM : Modeling, experimental validation and application to animal models*. PhD thesis, Université Paris Saclay, 2016.

- Gabrielle Fournet, Jing-Rebecca Li, Alex M Cerjanic, Bradley P Sutton, Luisa Ciobanu, and Denis Le Bihan. A two-pool model to describe the IVIM cerebral perfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 37(8) :2987–3000, 2017. ISSN 0271-678X. doi : 10.1177/0271678X16681310. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5536805/>.
- Gabrielle Fournet, Luisa Ciobanu, and Denis Le Bihan. IVIM Models : Advantages, Disadvantages, and Analysis Pitfalls. In *Intravoxel incoherent motion (IVIM) MRI : principles and applications*. Singapour, panstafor edition, 2019. URL <https://www.nlb.gov.sg/biblio/203992999>.
- G. Russell Glenn, Li-Wei Kuo, Yi-Ping Chao, Chu-Yu Lee, Joseph A. Helpert, and Jens H. Jensen. Mapping the Orientation of White Matter Fiber Bundles : A Comparative Study between Diffusion Tensor Imaging (DTI), Diffusional Kurtosis Imaging (DKI), and Diffusion Spectrum Imaging (DSI). *AJNR Am J Neuroradiol*, 37(7) :1216–1222, 2016. ISSN 0195-6108. doi : 10.3174/ajnr.A4714. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4946981/>.
- Tim Hosey, Guy Williams, and Richard Ansorge. Inference of multiple fiber orientations in high angular resolution diffusion imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, 54(6) :1480–1489, 2005. ISSN 1522-2594. doi : 10.1002/mrm.20723. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mrm.20723>.
- Mami Iima and Denis Le Bihan. Clinical Intravoxel Incoherent Motion and Diffusion MR Imaging : Past, Present, and Future. *Radiology*, 278(1) :13–32, 2015. ISSN 0033-8419. doi : 10.1148/radiol.2015150244. URL <https://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiol.2015150244>.
- Mami Iima, Kojiro Yano, Masako Kataoka, Masaki Umehana, K. Murata, Shotaro Kanao, Kaori Togashi, and Denis Le Bihan. Quantitative non-Gaussian diffusion and intravoxel incoherent motion magnetic resonance imaging : differentiation of malignant and benign breast lesions. *Investigative radiology*, 50(4) :205–211, 2015. doi : 10.1097/RLI.0000000000000094.
- Jens H. Jensen and Joseph A. Helpert. MRI quantification of non-Gaussian water diffusion by kurtosis analysis. *NMR Biomed.*, 23(7) :698–710, 2010. ISSN 09523480. doi : 10.1002/nbm.1518. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/nbm.1518>.
- Jens H. Jensen, Joseph A. Helpert, Anita Ramani, Hanzhang Lu, and Kyle Kaczynski. Diffusional kurtosis imaging : The quantification of non-gaussian water diffusion by means of magnetic resonance imaging. *Magn. Reson. Med.*, 53(6) :1432–1440, 2005. ISSN 0740-3194, 1522-2594. doi : 10.1002/mrm.20508. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/mrm.20508>.

- P. Jezzard, A. S. Barnett, and C. Pierpaoli. Characterization of and correction for eddy current artifacts in echo planar diffusion imaging. *Magn Reson Med*, 39(5) :801–812, 1998. ISSN 0740-3194. doi : 10.1002/mrm.1910390518.
- D K Jones, M A Horsfield, and A Simmons. Optimal strategies for measuring diffusion in anisotropic systems by magnetic resonance imaging. *Magn. Reson. Med.*, page 11, 1999.
- Derek K. Jones and Alexander Leemans. Diffusion Tensor Imaging. 711 :127–144, 2011.
- Peter B. Kingsley. Introduction to diffusion tensor imaging mathematics : Part II. Anisotropy, diffusion-weighting factors, and gradient encoding schemes. *Concepts Magn. Reson.*, 28A(2) :123–154, 2006. ISSN 1546-6086, 1552-5023. doi : 10.1002/cmr.a.20049. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/cmr.a.20049>.
- Denis Le Bihan. Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. *Nat Rev Neurosci*, 4(6) :469–480, 2003. ISSN 1471-003X, 1471-0048. doi : 10.1038/nrn1119. URL <http://www.nature.com/articles/nrn1119>.
- Denis Le Bihan. What can we see with IVIM MRI? *NeuroImage*, 187 :56–67, 2019. ISSN 1053-8119. doi : 10.1016/j.neuroimage.2017.12.062. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811917310868>.
- Denis Le Bihan and E. Breton. Imagerie de diffusion in-vivo par résonance magnétique nucléaire. 1985.
- Denis Le Bihan and Heidi Johansen-Berg. Diffusion MRI at 25 : Exploring brain tissue structure and function. *Neuroimage*, 61(2) :324–341, 2012. ISSN 1053-8119. doi : 10.1016/j.neuroimage.2011.11.006. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3683822/>.
- Denis Le Bihan, Cyril Poupon, Alexis Amadon, and Franck Lethimonnier. Artifacts and pitfalls in diffusion MRI. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 24(3) :478–488, 2006. ISSN 1522-2586. doi : 10.1002/jmri.20683. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmri.20683>.
- Susumu Mori, Barbara J. Crain, V. P. Chacko, and Peter C. M. Van Zijl. Three-dimensional tracking of axonal projections in the brain by magnetic resonance imaging. *Annals of Neurology*, 45(2) :265–269, 1999. ISSN 1531-8249. doi : 10.1002/1531-8249(199902)45:2<265::AID-ANA21>3.0.CO;2-3. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1531-8249%28199902%2945%3A2%3C265%3A%3AAID-ANA21%3E3.0.CO%3B2-3>.
- Thoralf Niendorf, Rick M. Dijkhuizen, David G. Norris, Menno van Lookeren Campagne, and Klaas Nicolay. Biexponential diffusion attenuation in various states of brain tissue :

- Implications for diffusion-weighted imaging. *Magn. Reson. Med.*, 36(6) :847–857, 1996. ISSN 07403194, 15222594. doi : 10.1002/mrm.1910360607. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/mrm.1910360607>.
- Jean Perrin. Mouvement Brownien et réalité moléculaire. In *Annales de chimie et de physique*, pages 5–114. Paris, masson et cie edition, 1909.
- Stefan Skare and Jesper L. R. Andersson. On the effects of gating in diffusion imaging of the brain using single shot EPI. *Magnetic Resonance Imaging*, 19(8) :1125–1128, 2001. ISSN 0730-725X. doi : 10.1016/S0730-725X(01)00415-5. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0730725X01004155>.
- E. O. Stejskal and J. E. Tanner. Spin diffusion measurements : Spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *The Journal of Chemical Physics*, 42(1) :288–292, 1965. ISSN 0021-9606, 1089-7690. doi : 10.1063/1.1695690.
- Gwendolyn Van Steenkiste, Ben Jeurissen, Jelle Veraart, Arnold J. den Dekker, Paul M. Parizel, Dirk H. J. Poot, and Jan Sijbers. Super-resolution reconstruction of diffusion parameters from diffusion-weighted images with different slice orientations : SRR of Diffusion Parameters. *Magn. Reson. Med.*, 75(1) :181–195, 2016. ISSN 07403194. doi : 10.1002/mrm.25597. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/mrm.25597>.
- V. J. Wedeen, R. P. Wang, J. D. Schmahmann, T. Benner, W. Y. I. Tseng, G. Dai, D. N. Pandya, P. Hagmann, H. D’Arceuil, and A. J. de Crespigny. Diffusion spectrum magnetic resonance imaging (DSI) tractography of crossing fibers. *NeuroImage*, 41(4) :1267–1277, 2008. ISSN 1053-8119. doi : 10.1016/j.neuroimage.2008.03.036. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S105381190800253X>.
- Ed X. Wu and Matthew M. Cheung. MR diffusion kurtosis imaging for neural tissue characterization. *NMR in Biomedicine*, 23(7) :836–848, 2010. ISSN 1099-1492. doi : 10.1002/nbm.1506. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/nbm.1506>.
- Maxim Zaitsev, Julian. Maclaren, and Michael Herbst. Motion Artefacts in MRI : a Complex Problem with Many Partial Solutions. *J Magn Reson Imaging*, 42(4) :887–901, 2015. ISSN 1053-1807. doi : 10.1002/jmri.24850. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4517972/>.

Chapitre 4

Contributions méthodologiques apportées au cours de la thèse

Nous avons vu dans le chapitre précédent que l'imagerie par résonance magnétique (IRM), et en particulier l'IRM de diffusion était un outil sensible à la détection des lésions radio-induites chez les modèles animaux et chez les patients. Ce chapitre a pour objectif de présenter la méthodologie mise en place pour les diverses études radiobiologiques réalisées au cours de la thèse ainsi que le pipeline d'analyse de données dédié et mis en place.

4.1 Présentation des équipements

4.1.1 Irradiateur

Les différents protocoles d'irradiation auxquels sont soumises les cohortes de souris sont réalisés avec un irradiateur auto blindé de type GSR-D1 fabriqué par l'entreprise Gamma Service Medical GmbH illustré sur la figure 4.1. Une source de Césium 137 (^{137}Cs) émet des rayonnements ionisants (RI) de type γ avec une demi-vie de 30 ans.

Pour chaque expérimentation réalisée à un temps t , le débit de dose de référence mesuré à t_0 est corrigé par le facteur de décroissance radioactive égal à : $\exp\left[-\frac{\ln(2)}{30 \times 365,25} \times (t - t_0)\right]$ avec $t - t_0$ en jours.

En 2018, selon la configuration de l'installation, il était possible d'atteindre des débits de dose allant de 10 mGy/min à 2,8 Gy/min. En effet le manipulateur dispose de plaques de plomb plates et coniques (Figure 4.1, C) de diverses épaisseurs qu'il peut disposer sur différents niveaux de l'irradiateur. Plus le nombre de plaques est important, moins le débit dose est élevé.

Cette installation permet d'irradier jusqu'à 5 souris, corps entier, placées dans une boîte de plexiglass (Figure 4.1, A). L'anesthésie des souris n'est pas nécessaire puisque leurs déplacements sont contraints par les dimensions de la boîte. Nous avons exploré deux doses d'irradiation : une forte dose (1 Gy) et une faible dose (100 mGy). Le protocole d'irradiation forte dose consiste à placer la boîte en plexiglass dans laquelle sont disposées

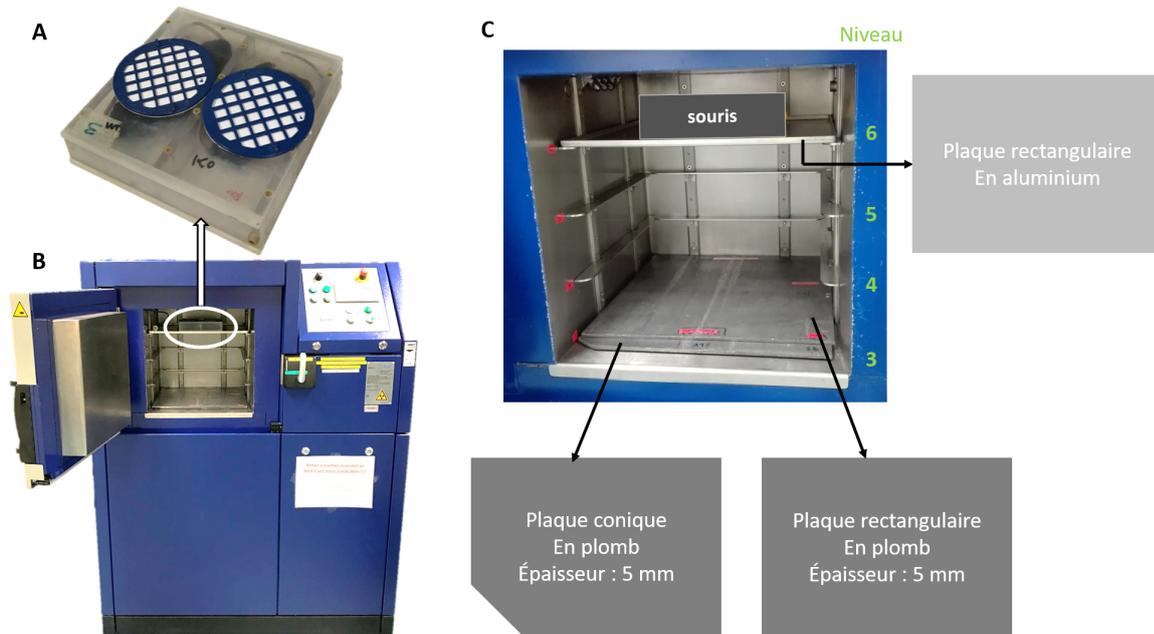


FIGURE 4.1 – (A) Boîte en plexiglas dans laquelle sont disposées les souris, (B) vue d’ensemble de l’irradiateur auto blindé © Gamma Service Medical et (C) zoom sur la chambre d’irradiation.

les souris à irradier sur le 6^{ème} niveau de l’irradiateur. Dans cette configuration le débit de dose atteint est de 0,75 Gy/min, avec une isodose de 100%. Ce qui signifie que, quelle que soit la position des souris à l’intérieur de la boîte, elles reçoivent corps entier le même débit de dose. La dose totale de 1 Gy est atteinte au bout de 80 secondes à l’intérieur de l’irradiateur. Le protocole d’irradiation faible dose utilise une autre configuration de l’irradiateur, avec l’ajout sur le 3^{ème} niveau d’une plaque de plomb rectangulaire superposée à une plaque de plomb conique d’épaisseur 5 mm. La boîte en plexiglass contenant les souris est toujours placée sur le 6^{ème} niveau de l’irradiateur, mais le débit dose est fixé à 100 mGy/min. La dose de 100 mGy est délivrée en laissant les souris pendant 1 minute dans l’irradiateur, avec une isodose de 100%.

4.1.2 Équipements IRM

Toutes les acquisitions IRM ont été réalisées sur le scanner 11,7 T (Bruker) de NeuroSpin (Figure 4.2, A). Le signal détecté en IRM est proportionnel à B_0 , ce qui suscite l’utilisation des ultras hauts champs et plus particulièrement du scanner préclinique 11,7 T par rapport au 7 T dont nous disposons à NeuroSpin. L’imageur 17 T de NeuroSpin n’a pas été retenu, car il ne dispose pas de la cryo-plateforme dédiée à l’imagerie cérébrale chez la souris. Il s’agit d’une antenne surfacique à deux canaux refroidie à 25 Kelvins (Figure 4.2, B). Ce système nous permet de diminuer le bruit électronique et ainsi de gagner un facteur d’environ 2,5 sur le rapport signal sur bruit (SNR) par rapport à une antenne standard.

Ainsi le SNR obtenu à l’aide du système 11,7 T équipé de l’antenne cryogénique devrait

tout de même être similaire, voire plus important, que celui obtenu à l'aide du scanner IRM 17,2 T seul dont nous disposons.

Ce scanner est doté de gradients de champs magnétiques linéaires suivant les trois directions de l'espace (X, Y, Z) caractérisés par une puissance maximale de 760 mT/m et un temps de montée de 100 μ s. Les variations de champ magnétique induites par l'application de ces gradients permettent la localisation spatiale (annexe B, section B.3.2), mais également l'encodage des mouvements de diffusions des molécules d'eau (chapitre 3, section 3.2). L'espace disponible correspondant à l'intérieur des gradients est de 8,9 cm, ce qui nous permet d'imager de petits animaux (souris) ou des échantillons.

Le système Paravision 6.0.1 fourni par Bruker permet, via une interface graphique, de paramétrer les différentes séquences IRM ou spectroscopie RMN, de visualiser, de reconstruire et d'analyser les spectres ou images acquis avec le scanner IRM 11,7 T.

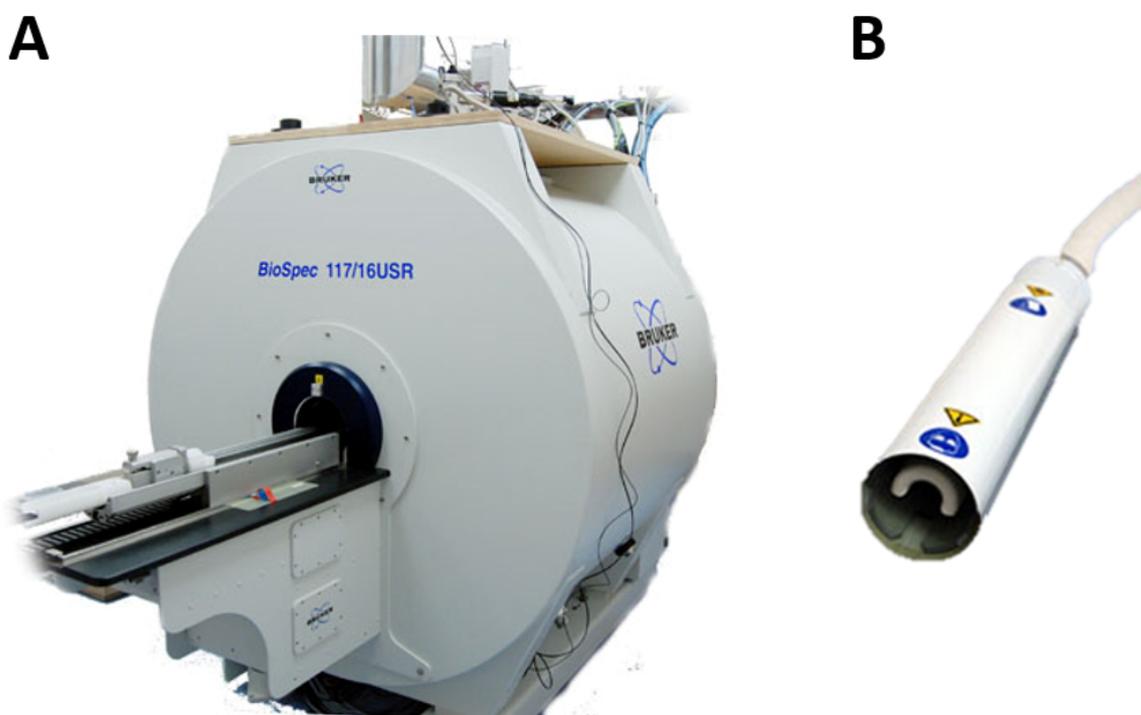


FIGURE 4.2 – (A) Scanner préclinique 11,7 T et (B) antenne cryogénique de surface en émission et réception utilisés pour les acquisitions IRM.

4.2 Protocole IRM et optimisations des paramètres d'acquisition

4.2.1 Les différentes étapes du protocole

Au cours de la thèse, des études *in vitro* dans un premier temps et *in vivo* chez la souris dans un second temps ont été menées. La Figure 4.3 décrit, avec les repères temporels, les

différentes étapes du protocole d'acquisition IRM, de l'installation à la fin des acquisitions réalisées.

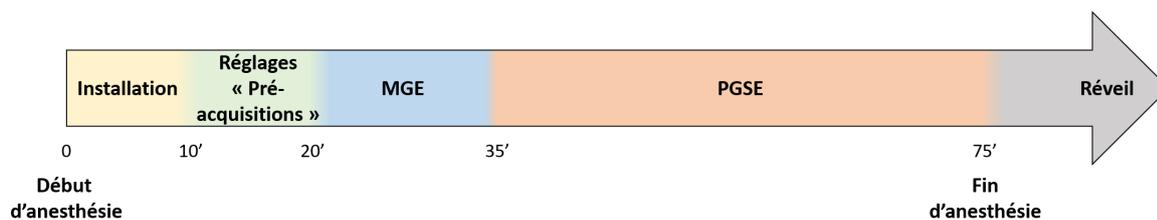


FIGURE 4.3 – Chronologie du protocole IRM en minutes.

4.2.2 Installation et set-up animal

Pour les études *in vitro*, les échantillons sont simplement disposés en contact avec l'antenne et centrés dans l'aimant.

Pour les études *in vivo*, les souris sont anesthésiées à l'isoflurane, un agent anesthésique volatil, dans un mélange d'air (50%) et d'oxygène (50%). En pratique nous procédons à une induction à 3-4% afin de placer l'animal sur le lit IRM en position sphinx. Le lit est chauffé à l'aide d'une circulation d'eau chaude pour laquelle nous pouvons contrôler sa température. Une sonde de température et un capteur sont placés de façon à monitorer les paramètres physiologiques comme la température et la respiration de l'animal. L'anesthésie est ensuite diminuée autour de 2-3 % le temps de positionner la tête de l'animal dans un cadre stéréotaxique composé de barres d'oreilles et d'un mors à dents afin de limiter les mouvements au cours des acquisitions. Au total, les souris sont anesthésiées à l'isoflurane pendant 75 minutes environ, temps d'installation, réglages propres aux séquences, et acquisitions compris. En moyenne 1,5 à 2% d'isoflurane permettent de maintenir la stabilité de l'animal au cours des acquisitions avec un rythme respiratoire compris entre 60 et 80 respirations par minute et une température de 37 ± 1 °C.

4.2.3 Réglages pré acquisitions

Avant d'acquérir les images IRM, des réglages sont nécessaires pour limiter les biais et ainsi assurer la robustesse des images inter sujets. La qualité des images IRM dépend en particulier de la fréquence de résonance, de la puissance des impulsions radiofréquences (RF) et de l'homogénéité du champ magnétique au sein de l'échantillon. Dans cette section, nous nous intéressons aux réglages effectués pour l'intégralité des acquisitions IRM en amont des acquisitions. Au total, environ 10 minutes sont nécessaires pour la réalisation de ces réglages "pré acquisitions".

De façon générale une fois l'objet d'intérêt placé dans le scanner, les effets de susceptibilité magnétique sont à l'origine d'une distribution légèrement inhomogène du champ magnétique statique. Or la fréquence de Larmor dépend de ce champ magnétique (annexeB).

Par conséquent, la fréquence de Larmor de l'objet d'intérêt est légèrement modifiée. L'antenne doit alors être ajustée de façon à ce que sa fréquence de résonance corresponde à celle de l'objet à imager (accord de fréquence de l'antenne). De plus lorsqu'un signal est émis vers l'antenne, une partie de ce signal est reflétée vers sa source ce qui entraîne des pertes. La réflexion minimale est obtenue lorsque l'impédance de l'antenne et de la source, ici l'objet d'étude est égale. L'adaptation de l'impédance a pour but de maximiser la transmission d'énergie entre l'antenne et l'objet d'étude. Les antennes (émettrices ou réceptrices) peuvent être assimilées à des circuits électriques qui emmagasinent l'énergie électrique dans un condensateur de capacité C et l'énergie magnétique dans une bobine d'inductance L . Les accords de fréquence et d'impédance consistent à régler les capacités C des condensateurs de l'antenne (Gruber et al., 2018). En pratique, une courbe de syntonisation permet de visualiser l'accord des capacités en temps réel. On considère que les accords sont corrects lorsque la fréquence est centrée en zéro et la largeur de bande la plus petite possible.

Des hétérogénéités de champ magnétique peuvent être causées par la simple présence de l'objet dans le champ magnétique. Pour pallier à la présence de ces hétérogénéités, des techniques de compensation du champ magnétique au sein de l'objet d'étude, aussi appelées "shimming", sont utilisées pour les corriger. De petites variations de champ magnétique sont produites par des bobines de "shims" afin de les compenser. L'IRM à haut champ fait souvent appel à un "shim" de second ordre pour homogénéiser le champ magnétique sur l'ensemble du cerveau. En particulier, la méthode implémentée par Bruker et appelée "Adjust Shim 1st and 2nd order" réalise ce "shim" de façon itérative au second ordre sans localisation. La qualité du "shim" était contrôlée à l'aide des paramètres appelés dans Paravision 6.0.1 "GS normalized area[0]" et "GS normalized area[1]" qui correspondent à l'aire du signal IRM (signal de précession libre (FID) ou écho) pour les deux canaux de l'antenne cryogénique utilisée.

La puissance des impulsions RF doit être calibrée pour réaliser des impulsions d'un angle de 90° (et indirectement 180°) au sein du cerveau (en fait une bande centrale de l'image). La puissance des autres types d'impulsions est déduite de cette calibration. Pour nos expérimentations nous avons choisi une bande d'épaisseur 2 mm, positionnée suivant l'orientation du cortex sur une coupe sagittale et dont la borne supérieure coïncide avec le haut du cortex (Figure 4.4). En général, la puissance de référence était de l'ordre de 20 mW. Le gain de la chaîne amplificatrice est aussi réglé pour maximiser l'amplitude des signaux tout en évitant une saturation du récepteur. Certaines séquences (notamment celles avec un encodage de type "echo planar imaging" ou EPI) nécessitent d'autres réglages dédiés pour corriger de petites erreurs au niveau des impulsions de gradient.

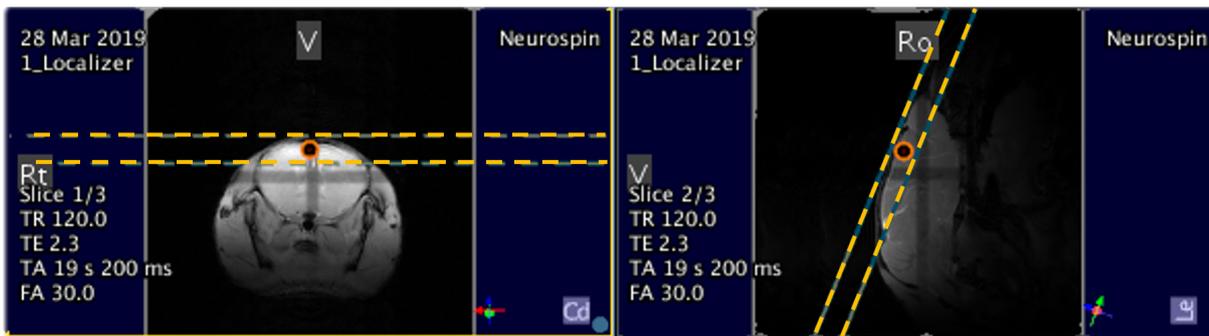


FIGURE 4.4 – Interface Paravision 6.0.1 pour la calibration de la puissance de référence. La bande d'épaisseur 2 mm, positionnée sur une coupe axiale (gauche) et sagittale (droite), apparaît en pointillés jaunes, le point noir et rouge correspond au centre de la bande. Le centre de la croix (en noir) représente la position du centre du scanner.

4.2.4 Séquence anatomique : Multi Gradient Echo vs Turbo Rapid Imaging with Refocusing Echoes

Nous disposons à NeuroSpin avec le scanner 11,7 T de deux propositions types de séquences IRM pour obtenir des images "anatomiques" (contraste de base T_1 , T_2) : une séquence "multi gradient echo" (MGE) (voir annexe B, section B.9) et une séquence "turbo rapid imaging with refocusing echoes" (TurboRARE) (voir annexe B, section B.2.6).

Nous avons donc utilisé les paramètres de ces deux séquences, déjà optimisés dans le laboratoire et présentés dans la Table 4.1.

Paramètres	MGE	TurboRARE
Type	écho de gradient	écho de spin
Dimensions	3D	3D
Orientation	Coronale	Coronale
Temps d'acquisition	15 min	6,5 min
TR	90 ms	2,5 s
TE	2,2 ms	30 ms
Nombres échos	14	1
Délai temporel entre deux échos consécutifs	2 ms	5 ms
Angle de bascule	17°	90°
FOV	$1,6 \times 1,28 \times 0,8 \text{ cm}^3$	$1,59 \times 1,44 \times 0,78 \text{ cm}^3$
Résolution	$0,1 \times 0,1 \times 0,1 \text{ mm}^3$	$0,15 \times 0,15 \times 0,3 \text{ mm}^3$
Facteur d'accélération	1	16

TABLE 4.1 – Paramètres des deux séquences anatomiques envisagées : MGE et TurboRARE. TR : temps de répétition, TE : temps d'écho, FOV = champ de vue.

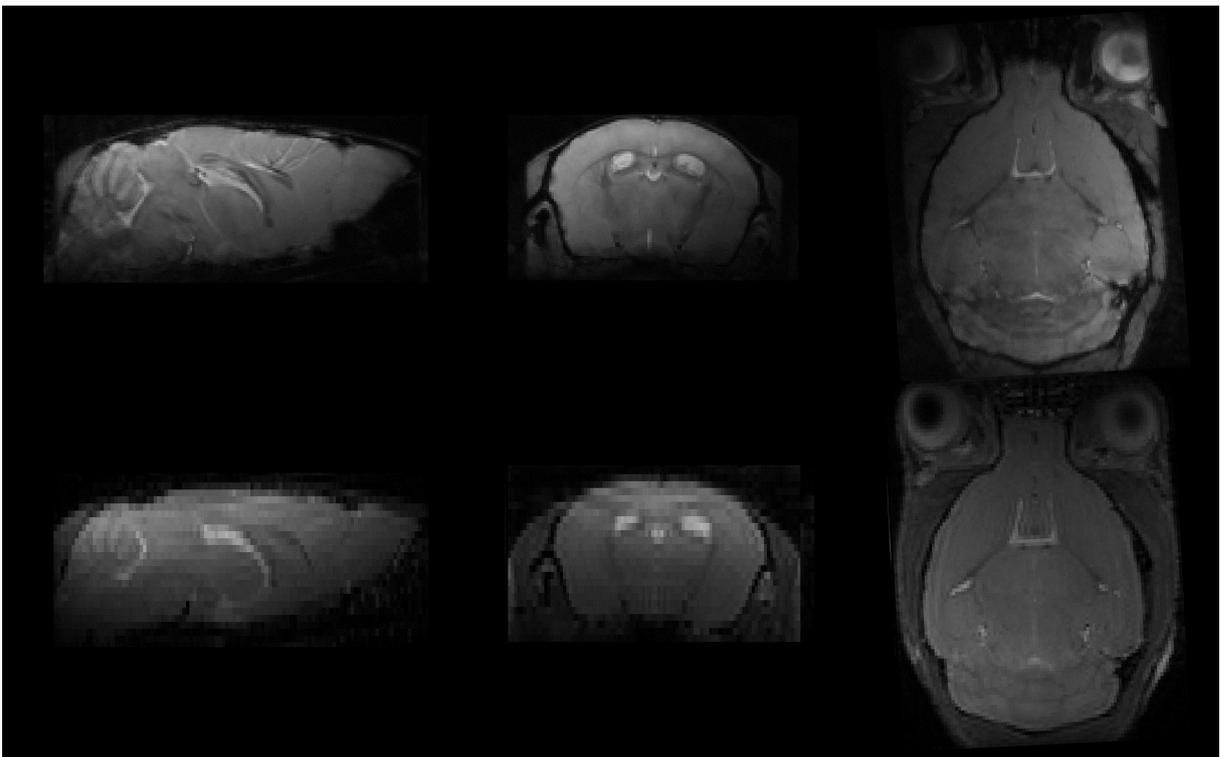


FIGURE 4.5 – Images acquises avec la séquence MGE (haut) et TurboRARE (bas) et reconstruites en magnitude en orientation sagittale, axiale et coronale de gauche à droite.

Nous avons évalué les images obtenues avec ces deux types de séquences sur des souris sauvages adultes non irradiées. En dépit d'un temps d'acquisition plus long, nous avons opté pour la séquence MGE. En effet la séquence TurboRARE bénéficie d'une accélération de l'encodage spatial d'un facteur 16, c'est-à-dire que 16 lignes de l'espace de Fourier sont encodées en un seul temps de répétition (temps de répétition (TR)) contre une seule ligne pour les séquences non accélérées comme la MGE (voir annexe B pour des informations complémentaires). Néanmoins, lorsque l'on compare les images MGE et TurboRARE, on remarque d'une part que les images MGE présentent une meilleure résolution spatiale du fait des paramètres choisis (Table 4.1) et d'autre part que les images TurboRARE présentent des artefacts de Gibbs (lignes répétées parallèlement dans l'axe haut bas du cerveau, ici la direction d'encodage de phase, sur la Figure 4.5, coupe sagittale et axiale) au niveau du haut du cerveau. Il s'agit d'un artefact de reconstruction causé par l'échantillonnage incomplet de l'espace de Fourier aux hautes fréquences, qui est extrapolé et se traduit après transformée de Fourier par une répétition du signal dans la direction d'encodage de phase dans l'espace image. De plus, contrairement aux antennes volumiques, l'antenne cryogénique surfacique présente un profil d'excitation et de réception non homogène dans l'axe haut bas du cerveau, ce qui cause la perte de signal dans les zones éloignées de l'antenne par rapport aux zones plus proches, plus marquées dans la séquence TurboRARE que dans la séquence MGE. D'après la Figure 4.5, les images acquises avec une séquence MGE sont donc plus adaptées (car mieux résolues et moins artefactées) au développement d'un traitement d'images semi-automatique.

4.2.5 Séquence de diffusion

Paramètres généraux d'acquisition

À l'issue de l'acquisition des images MGE, l'animal est anesthésié depuis plus de 35 minutes (Figure 4.3). La stabilité physiologique de l'animal est alors atteinte. L'acquisition des images pondérées en diffusion, sensibles aux mouvements, peut alors commencer. Les ajustements de trajectoire du k-space sont calculés à partir de la fonction "adjust trajectory", implémentée sur Paravision 6.0.1, avant de réellement débiter les acquisitions. La séquence choisie est une séquence "pulsed gradient spin echo" (PGSE), présentée dans le chapitre 3, section 3.2. Des gradients supplémentaires (appelés "spoilers") ont été ajoutés à la fin de la séquence PGSE de base afin d'éliminer le signal résiduel qui persistait suite à la relaxation incomplète de l'aimantation transversale à la fin du temps TR et qui aurait contaminé le signal de l'acquisition suivante.

Initialement, notre protocole de diffusion comprend l'acquisition de 3 images A0 ($b = 0 \text{ s/mm}^2$) et 19 images pondérées en diffusion avec des valeurs de b variant de 10 à 3000 s/mm^2 : 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 400, 600, 800, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750, 3000. Ces images sont acquises suivant 6 gradients de direction non colinéaires, et distribuées de façon homogène dans l'espace pour couvrir 4π : $[1 \ 0 \ 1]$; $[-1 \ 0 \ 1]$; $[0 \ 1 \ 1]$; $[0 \ -1 \ 1]$; $[1 \ 1 \ 0]$; $[-1 \ 1 \ 0]$. Afin d'augmenter le SNR, les acquisitions IRM sont répétées trois fois. Au total, nous consacrons 40 min du protocole d'imagerie IRM pour acquérir 351 volumes ($3 \times 6 \times 19 + 3 \times 3$). Les paramètres plus généraux sont résumés dans la Table 4.2.

Paramètres	Valeurs
Dimensions	2D
Orientation	Axiale
Bande passante	250 kHz
Temps d'acquisition par répétition	12 min
TR	3 s
TE	25,5 ms
Nombres de segments	2
FOV	$1,12 \times 0,96 \times 0,8 \text{ cm}^2$
Résolution	$0,125 \times 0,125 \text{ mm}^2$
Nombre de coupes	42
Épaisseur de coupe	0,225 mm
Espace inter coupes	0,025 mm

TABLE 4.2 – Paramètres généraux de la séquence d'IRM de diffusion. TR : temps de répétition, TE : temps d'écho, FOV = champ de vue.

Observations préliminaires

À partir d'acquisitions préliminaires nous avons observé une déviation entre les valeurs de b d'entrée et la valeur effective de b ($b_{eff} = \frac{b_{xx} + b_{yy} + b_{zz}}{3}$) calculée à partir de la matrice

\widehat{b} par le système Paravision 6.0.1 (Figure 4.6, A), ce qui peut être à l'origine de biais dans l'estimation des paramètres qui caractérisent la diffusion isotrope (ADC, K, S-Index (SI),...). De plus, nous avons également noté que : $b_{xy} + b_{xz} + b_{yz} \neq 0$ (Figure 4.6, B), ce qui peut introduire une anisotropie artificielle lors des estimations des paramètres FA, AD, RD, etc. (mais aussi de sFA, sAD, sRD etc.).

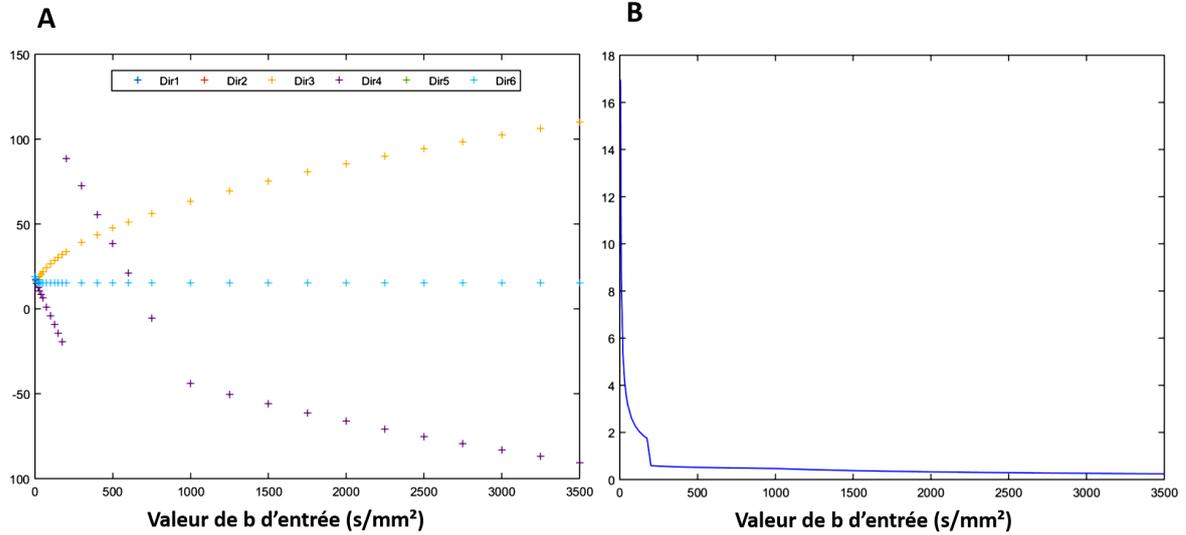


FIGURE 4.6 – (A) Variation entre la valeur de b effective et la valeur de b d'entrée en (s/mm^2) pour les 6 directions de diffusion acquises. Les points des directions numéro 1 et 3, 2 et 4, 5 et 6 coïncident. (B) Somme des termes croisés sur la valeur de b effective en %.

L'élément b_{ij} de la matrice \widehat{b} s'exprime comme suit (Mattiello et al., 1994, 1997) :

$$b_{ij} = \gamma^2 \int_0^{TE} \left(\int_0^t G(t') dt' - 2 \times \epsilon(t) \int_0^{\frac{TE}{2}} G(t') dt' \right) \left(\int_0^t G(t') dt' - 2 \times \epsilon(t) \int_0^{\frac{TE}{2}} G(t') dt' \right)^T dt \quad (4.1)$$

avec $G = \begin{pmatrix} G_x \\ G_y \\ G_z \end{pmatrix}$ et $\epsilon(t)$ la fonction porte définie par :

- $\epsilon(t)=0$ pour $t < TE$, TE étant le temps d'écho
- $\epsilon(t)=1$ pour $t \geq TE$

L'élément b_{ij} est alors fonction des différents gradients appliqués au cours de la séquence (diffusion, "spoilers", imagerie) et du rapport gyromagnétique γ . Le détail de l'expression pour les éléments b_{xx} , b_{yy} , b_{zz} , b_{xy} , b_{yz} , b_{xz} est donné dans la littérature (Mattiello et al., 1994, 1997).

Les paramètres de diffusion sont estimés en supposant b_{eff} (pour les milieux isotropes) ou la matrice \widehat{b} (pour les milieux anisotropes) connue. Par conséquent la différence entre les valeurs d'entrées et les valeurs réelles peut mener à des erreurs d'estimation pour ces paramètres. Afin de limiter les biais, nous avons optimisé les gradients de façon à limiter

cette différence. Pour la matrice \hat{b} , cela revient à minimiser la somme des termes croisés $b_{xy} + b_{xz} + b_{yz}$ et l'écart entre la trace de \hat{b} et la valeur b d'entrée.

4.3 Optimisation des paramètres d'acquisition pour la séquence de diffusion

4.3.1 Objet-test utilisé et méthode mise en œuvre

Les gradients de diffusion, de refocalisation et de "spoiling" peuvent être optimisés indépendamment de façon à corriger les déviations observées. Pour ce faire, nous avons utilisé un objet-test soit une seringue de 10 mL remplie de dodécane (Figure 4.7). Le dodécane est une huile utilisée dans des études précédentes pour la calibration des mesures du coefficient de diffusion libre (D) (Holz et al., 2000; Tofts et al., 2000). Il s'agit donc d'un objet-test dont la diffusion est libre (gaussienne) et isotrope.

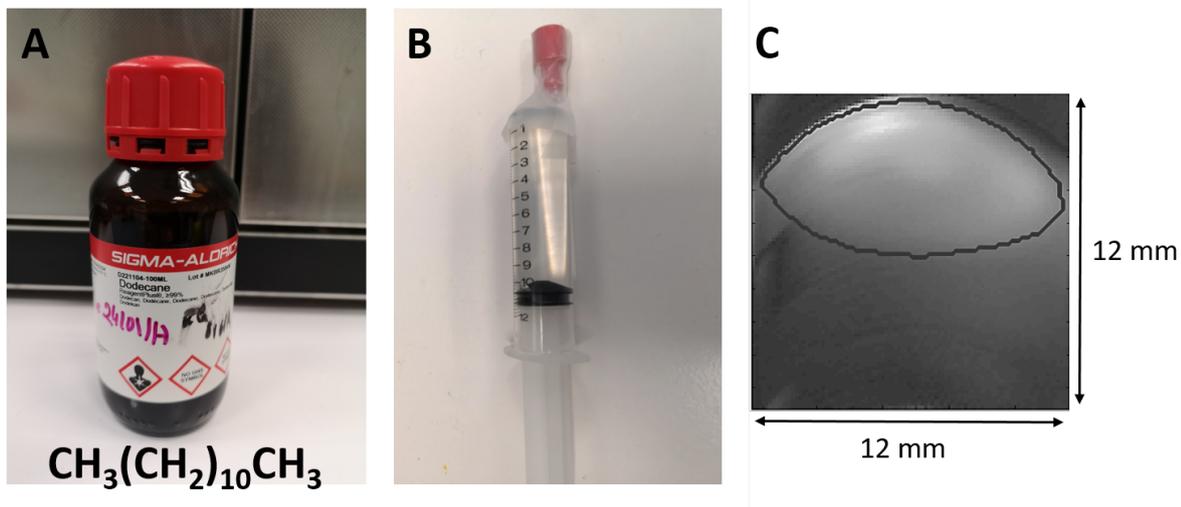


FIGURE 4.7 – (A) Solution de dodécane, Sigma-Aldrich, (B) objet-test de dodécane utilisé pour la validation du protocole d'IRM de diffusion et (C) coupe axiale d'une image A_0 obtenue à l'aide du protocole IRM de diffusion final. Sur l'image (C) le champ de vue de 12×12 mm a par la suite été ajusté à 14×12 mm² pour les acquisitions *in vivo*.

L'étape d'optimisation consista à acquérir plusieurs ensembles d'images pondérées en diffusion, avec les paramètres généraux de la sous-section 4.2.5 fixés et les paramètres à optimiser avec des valeurs variables. Le but est alors de comparer les valeurs d'entrées b avec les valeurs effectives calculées par Paravision 6.0.1, mais également avec les valeurs de b expérimentales. Ces valeurs de b expérimentales sont définies comme les valeurs de b estimées à partir de l'ajustement de l'atténuation du signal avec le modèle gaussien :

$$b = -\frac{\ln \frac{S(b)}{S(b=0)}}{D},$$

la valeur de D étant connue et répertoriée dans la littérature ($D = 1,3$ mm²/s à 37°C)

(Holz et al., 2000; Tofts et al., 2000). Le set de paramètres présentant les trois conditions suivantes :

1. le minimum de variation entre les valeurs de b expérimentales et effectives
2. le minimum de variation entre les valeurs de b effectives et d'entrée
3. une somme des termes croisés de la matrice s'approchant de zéro

sera sélectionné.

Choix du temps de diffusion

Comme nous voulions conserver les valeurs de pondération de diffusion, nous avons choisi de regarder l'influence du temps de diffusion sur la déviation que nous avons observée. Nous avons considéré 3 temps de diffusion différents avec $\Delta = 12, 25, 36$ ms, le délai temporel entre le début (ou la fin) des deux gradients de diffusion.

La Figure 4.8 nous permet de choisir la valeur de Δ et donc le temps de diffusion qui minimise l'écart entre les valeurs de b théoriques (effectives) et expérimentales, c'est à dire $\Delta = 12$ ms pour un temps de diffusion de 11 ms (courbe , Figure 4.8). De plus, le maximum de variation entre les valeurs effectives (courbes bleues) et les valeurs d'entrées est plus faible pour $\Delta = 12$ ms (33 s/mm^2) que pour $\Delta = 25$ ms (40 s/mm^2) et $\Delta = 36$ ms (50 s/mm^2). D'après la Figure 4.8, le choix de $\Delta = 12$ ms vérifie alors les deux premières conditions. La dernière condition sera vérifiée dans la prochaine section, une fois tous les paramètres de gradient correctement optimisés. Il faut noter que le choix du temps de diffusion n'est pas anodin. En présence de diffusion non gaussienne (entravée) les paramètres de diffusion (ADC_0 , K , mais aussi S -Index) dépendent du temps de diffusion de manière importante (les temps longs apportant une meilleure différenciation tissulaire). Ici le choix du temps de diffusion a été d'abord motivé pour des raisons techniques (contrôle des valeurs de b).

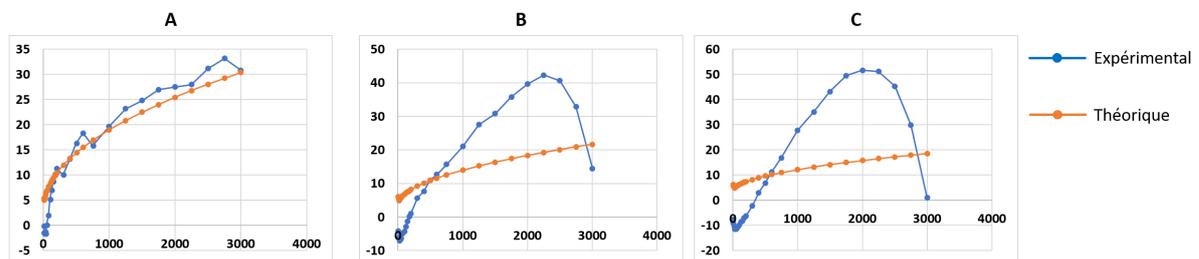


FIGURE 4.8 – Déviation des valeurs de b effectives (courbes oranges) et expérimentales (courbes bleues) en s/mm^2 par rapport aux valeurs de b d'entrée (en s/mm^2) pour $\Delta = 12$ (A), 25 (B) et 36 (C) ms.

Optimisation des gradients de refocalisation et de "spoiling"

Après avoir fixé le temps de diffusion, nous nous sommes intéressés à l'influence du gradient de refocalisation (G_{180°) et de "spoiling" (G_{spoil}). Pour cela nous avons considéré

3 durées (1 ; 1,3 et 1,5 ms) et 2 intensités de gradients (10 et 12%) de "spoiling" choisis de façon à conserver le même temps d'écho (TE) et un "duty cycle" inférieur à 80 %. De même, nous avons fait varier la forme du gradient de refocalisation (formes 1 et 2) ainsi que sa durée (1,7 ; 1,9 et 2,1 ms). La forme n°1 correspond à un profil d'impulsion moins carré que la forme n°2. Le choix de ces paramètres a été déterminé à l'aide des déterminants D_{beff} et aNSBC (somme normalisée des termes croisés de la matrice de \hat{b} , introduit dans Fournet et al. (2019)) définis par les équations suivantes :

$$D_{beff} = \frac{1}{n_b \times n_d} \sum_{i=1}^{i=n_b} \sum_{j=1}^{j=n_d} \frac{beff_{ij}}{b_{ij}} \quad (4.2)$$

$$aNSBC = \frac{1}{n_b \times n_d} \sum_{i=1}^{i=n_b} \sum_{j=1}^{j=n_d} \frac{2b_{ij}xy + 2b_{ij}xz + 2b_{ij}yz}{beff_{ij}} \quad (4.3)$$

$$(4.4)$$

avec n_d le nombre total de directions et n_b le nombre total de valeurs de b. En effet la minimisation de ces deux coefficients détermine l'ensemble des paramètres favorables à la diminution de la déviation entre la valeur de b d'entrée et de b effective (via D_{beff}) ainsi que la minimisation des termes croisés de la matrice (via aNSBC). La Table 4.3 résume la valeur de ces déterminants pour les différentes configurations de gradients de "spoiling" et de refocalisation.

G_{180°		G_{spoil}		Déterminants	
Forme	Durée (ms)	Intensité (%)	Durée (ms)	D_{beff}	aNSBC
1	1,7	10	1,0	0,34	0,16
1	1,9	10	1,0	0,07	0,16
1	2,1	10	1,0	0,09	0,16
2	2	10	1,0	0,24	0,2
2	2,5	10	1,0	0,27	0,21
2	3,15	10	1,0	0,21	0,2
1	1,9	10	1,0	0,07	0,16
1	1,9	10	1,3	0,14	0,21
1	1,9	10	1,5	0,18	0,23
1	1,9	15	1,0	0,16	0,21

TABLE 4.3 – Valeurs des déterminants, D_{beff} et aNSBC, dans les différentes configurations de gradients testés. Les valeurs en gras correspondent aux valeurs des paramètres retenus.

La Table 4.3 et la Figure 4.8 permettent alors de conclure que la plus petite valeur des déterminants D_{beff} et aNSBC est obtenue pour la configuration suivante :

- un gradient de refocalisation de forme n°1 et de durée 1,9 ms ;
- un gradient de "spoiling" de 15 % et de durée 1 ms ;
- un temps de diffusion de 11 ms avec $\delta = 3$ ms et $\Delta = 12$ ms.

À partir de cette configuration, la contribution des termes croisés dans la valeur de b effective est réduite à moins de 1 % pour les valeurs de b supérieures ou égales à 50

s/mm^2 (Figure 4.9). Ce qui est acceptable puisque seules 3 valeurs de b , $b = 0$ compris, (sur 20 au total) sont inférieures à cette valeur.

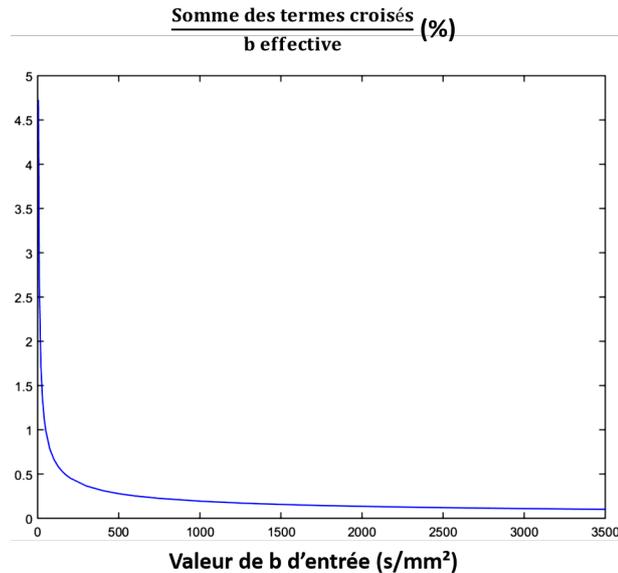


FIGURE 4.9 – Contribution de la somme des termes croisés ($2 \times (b_{xy} + b_{xz} + b_{yz})$) sur la valeur de b effective (en %) en fonction des valeurs de b effectives allant de 0 à 3500 s/mm^2 .

4.3.2 Validation du protocole

In vitro

Une fois tous les paramètres de séquence PGSE fixés, nous avons acquis l'ensemble des images pondérées en diffusion à l'aide du protocole sur le même objet-test que précédemment (Figure 4.7, B). À partir de ces images, nous avons pu déterminer ses paramètres de diffusion avec le modèle IVIM-Kurtosis. Puisqu'il s'agit d'un objet-test isotrope, l'estimation des valeurs du kurtosis et de la fraction d'anisotropie (FA) doivent être quasiment nulles. De plus, la littérature estime la valeur du coefficient de diffusion D à température ambiante (20°C) à $0,7 \text{ mm}^2/\text{s}$.

Nous avons moyenné le signal sur les six premières coupes (sur les 42 acquises) dans la région tracée en noir sur la Figure 4.7 (C), qui correspond au maximum de signal. Nous avons trouvé les valeurs suivantes :

- $\text{sADC} = \text{sMD} = 0,9 \text{ mm}^2/\text{s}$;
- $K = 5 \times 10^{-11}$;
- $\text{sFA} = 0,1$.

Bien que la valeur de sADC soit plus élevée que la valeur de D décrite dans la littérature, l'objet-test valide l'utilisation de ce protocole pour les études *in vivo*. En effet, l'élévation du coefficient de diffusion apparent (ADC) peut s'expliquer par la température à laquelle nous avons effectué l'expérience. Nous nous sommes placés dans des conditions identiques aux conditions *in vivo*. C'est-à-dire que nous avons utilisé l'antenne cryogénique qui est

thermostatée à 38°C, de façon à respecter la température physiologique des animaux. Or une élévation de la température du milieu mène à une augmentation de son ADC (Holz et al., 2000). De plus, nous avons effectué cette même expérience à température ambiante (20°C) pour laquelle nous avons calculé la valeur de sADC pour chaque direction du gradient de diffusion et nous avons bien trouvé :

X	Y	Z	sADC (mm ² /s)
1	0	1	0,71
-1	0	1	0,71
0	1	1	0,72
0	1	-1	0,72
1	1	0	0,73
-1	1	0	0,73

TABLE 4.4 – Valeurs de sADC en fonction de la direction du gradient de diffusion.

Nous avons montré les différents choix et ajustements des paramètres de séquences qui ont été réalisés jusqu'à obtenir le protocole IRM final. Nous allons maintenant voir plus en détail le traitement des données anatomiques et pondérées en diffusion acquises à l'aide de ce protocole.

In vivo

Une première étude pilote chez des souris sauvages non irradiées ($N = 2$), nous a tout d'abord permis de vérifier que les optimisations réalisées sur le dodécane restent valables pour les acquisitions *in vivo*. De plus la qualité des données acquises a été investiguée avec des calculs de SNR. Dans la région globale du cerveau le SNR a été évalué à 103 ± 10 pour les images A0 et 17 ± 3 pour les images $b = 3000 \text{ s/mm}^2$, ce qui est très satisfaisant pour poursuivre notre étude et développer le pipeline de traitement de données.

4.4 Définition automatique des régions d'intérêt

4.4.1 Atlas et références anatomiques

Description et construction du Turone Mouse Brain Template and Atlas

Nous avons opté pour un traitement d'analyse de données par régions d'intérêt (ROI) de façon à investiguer la globalité du cerveau, sans a priori sur les aires cérébrales sensibles à l'irradiation. D'autre part, la segmentation semi-automatique nous permet de définir les ROI de façon plus robuste et de nous affranchir des possibles variations liées à une segmentation manuelle. Cette approche nécessite, en particulier pour les analyses de groupe, l'emploi d'un atlas à partir duquel nous définissons les ROI. Pour ce faire nous avons utilisé l'atlas souris TMBTA ("Turone Mouse Brain Template and Atlas", https://www.nitrc.org/projects/tmbta_2019/) développé à NeuroSpin (Barrière et al., 2020).

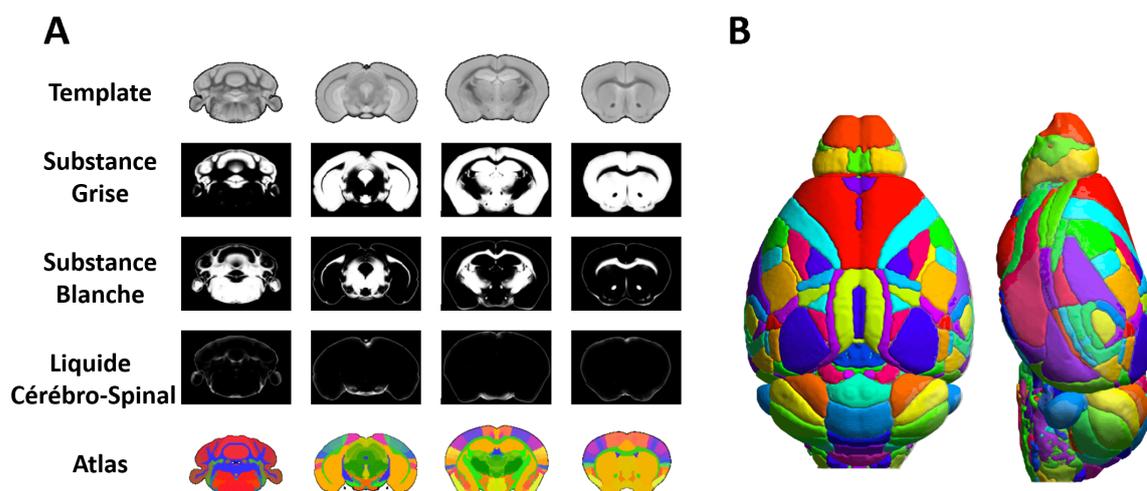


FIGURE 4.10 – (A) Coupes axiales du template, cartes de probabilité de la substance grise, de la substance blanche et du liquide cérébro-spinal. Les régions de l’atlas sont labéllisées par une couleur. (B) Visualisation de l’atlas souris en 3D : https://www.nitrc.org/projects/tmbta_2019/.

Sa construction est basée sur l’acquisition haute-résolution *ex vivo* de 138 souris femelles de souche RjOrl :SWISS âgées de 8 semaines et de 20-25g environ avec le même scanner IRM préclinique 11,7 T présenté dans la section 4.1.2. Cet atlas est également fourni avec un cerveau modèle (ou template) et les cartes de probabilités des divers tissus cérébraux : substance grise (SG), substance blanche (SB) et liquide cébrospinal (LCS) (Figure 4.10).

La méthode utilisée pour obtenir le template et les cartes de probabilités de SG, SB et LCS à partir des images IRM pondérées T_2^* , à l’aide d’une séquence MGE, est similaire à celle publiée chez le rat (Barrière et al., 2019). La Figure 4.11 schématise les différentes étapes nécessaires à leurs constructions. Brièvement, les cartes de probabilité d’appartenance à la SB, à la SG et au LCS, sont générées sur SPM (<https://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>) (Ashburner et Friston, 2005) à partir des images anatomiques T_2^* reconstruites en magnitude. La somme des échos est segmentée à deux reprises, tout d’abord après le recalage non rigide avec le template du Brain Allen (étape 3, <http://mouse.brain-map.org/static/atlas>), puis après la normalisation des paramètres (étape 5). L’utilisation d’un DARTEL ("Diffeomorphic Anatomical Registration Through Exponentiated Lie Algebra") (Ashburner, 2007) finalise le pipeline en générant le template et les cartes probabilistiques finales alignées sur le template du Brain Allen.

Une fois le template généré, l’atlas peut être défini à l’aide des a priori de l’atlas du Brain Allen. Brièvement, la méthode consiste à recalcr le template du Brain Allen sur le template souris TMBTA. Cette transformation est ensuite appliquée sur l’atlas du Brain Allen dans le but d’obtenir les labels du Brain Allen dans notre espace de template. Au final, l’atlas TMBTA couvre l’ensemble du cerveau de souris avec une résolution de 60 μm isotrope et pose un label sur 1318 régions distinctes (Figure 4.10).

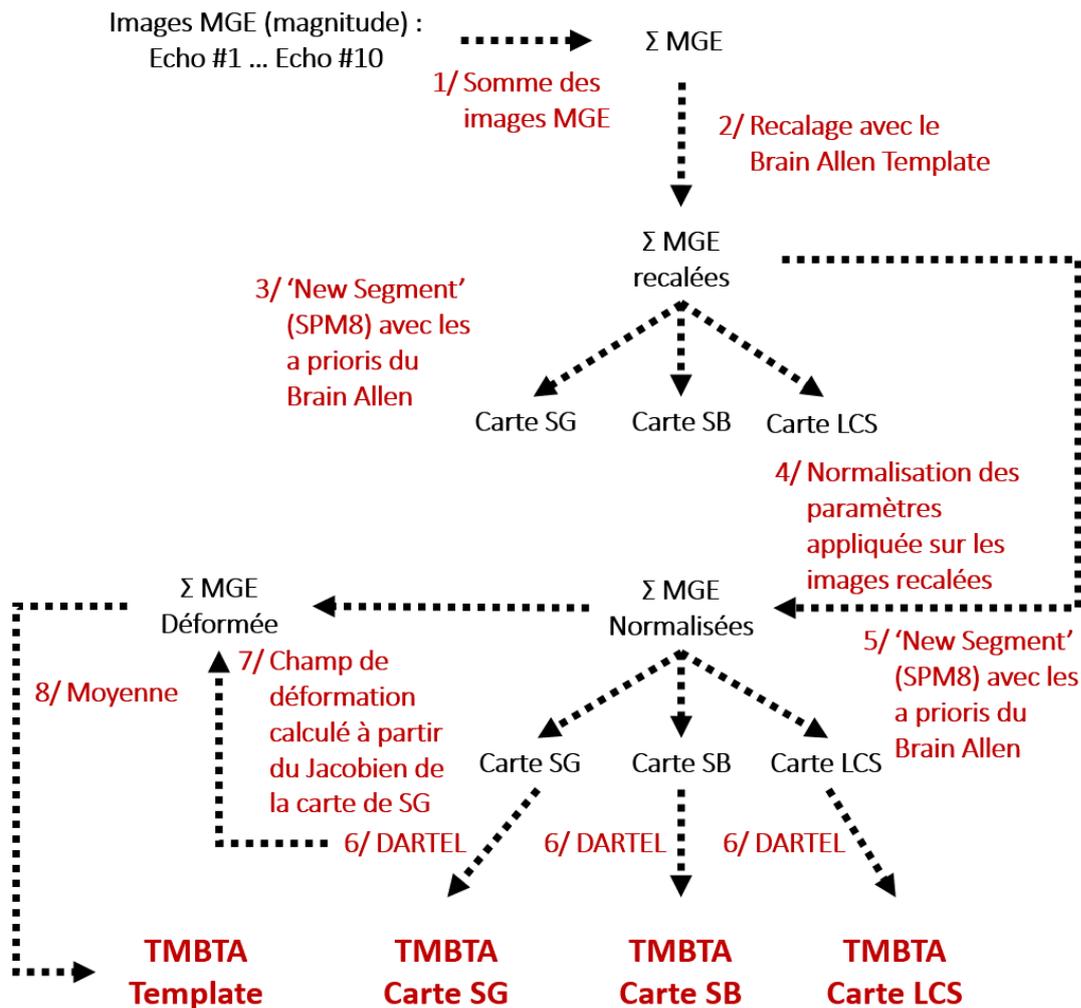


FIGURE 4.11 – Description des étapes nécessaires à la construction du template (1 à 8) et des cartes de probabilité TMBTA (1 à 9). Les étapes sont numérotées de 1 à 8 en rouge et les résultats de ces étapes apparaissent en noir.

Adaptation de l'atlas à nos études

Comme nous l'avons vu dans la section 4.2, les images anatomiques et pondérées en diffusion sont acquises avec des résolutions spatiales inférieures à celle de l'atlas. De plus comme les effectifs sont moindres que ceux employés dans le but de réaliser cet atlas, nous ne sommes pas en mesure de délimiter des ROI aussi petites que celles labellisées dans l'atlas.

Nous avons décidé de regrouper les régions de l'atlas en régions plus grandes en fonction de leur proximité (Figure 4.12). Au total nous avons défini 10 régions :

- Ctx (rouge) : le cortex (cingulaire, insulaire, auditif, ectorhinal, gustatif, limbique, moteur, perirhinal, pariétal, rétrosplénial, sensori-moteur, visuel, olfactif, amygda-

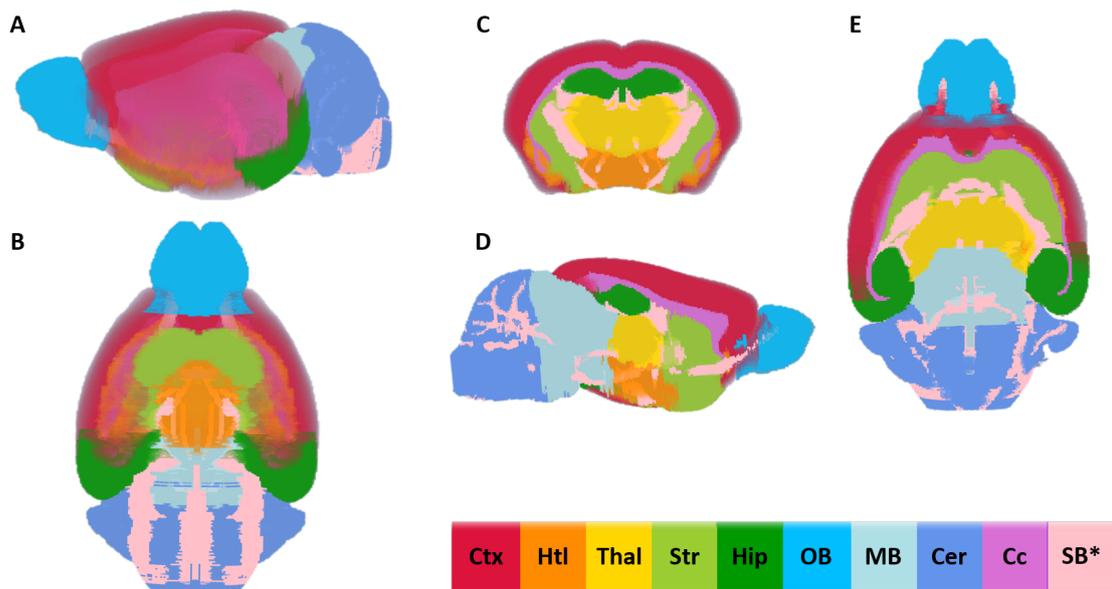


FIGURE 4.12 – (A) et (B) visualisations 3D de l'atlas redéfini. Coupe axiale (C), sagittale (D) et coronale (E) de l'atlas redéfini avec un code couleur pour chacune des régions.

lien et viscéral)

- Htl (orange) : l'hypothalamus (partie périventriculaire, latérale, médiane) et les noyaux amygdaliens
- Thal (jaune) : le thalamus
- Str (vert clair) : le striatum (dont le caudoputamen)
- Hip (vert foncé) : l'hippocampe (CA1, CA2, CA3, gyrus denté et aire entorhinale)
- BO (bleu) : le bulbe olfactif (couche glomérulaire, plexiforme et des cellules granulaires)
- MB (bleu ciel) : le mésencéphale (ou cerveau moyen, "mid brain") et le pons, la medulla
- Cer (bleu violet) : le cervelet
- Cc (magenta) : le corps calleux
- SB* (rose pâle) : la substance blanche (hors corps calleux), c'est-à-dire la capsule interne, la commissure antérieure/postérieure, le tractus optique, les pédoncules cérébelleux, etc.

Seule la région du corps calleux (Cc) a été redéfinie, et segmentée manuellement, à partir la région du Cc initialement définie dans l'atlas TMBTA. Cette démarche a pour but de limiter les erreurs liées au volume partiel avec les régions avoisinantes du fait de sa forme (Figure 4.13).

Une fois définies sur l'atlas, les ROI sont reportées dans l'espace des images anatomiques et pondérées en diffusion de façon automatique via un pipeline que nous avons développé pour ce travail. Avant de commencer les étapes de recalage, des étapes de prétraitement sont nécessaires sur les images IRM servant au recalage.

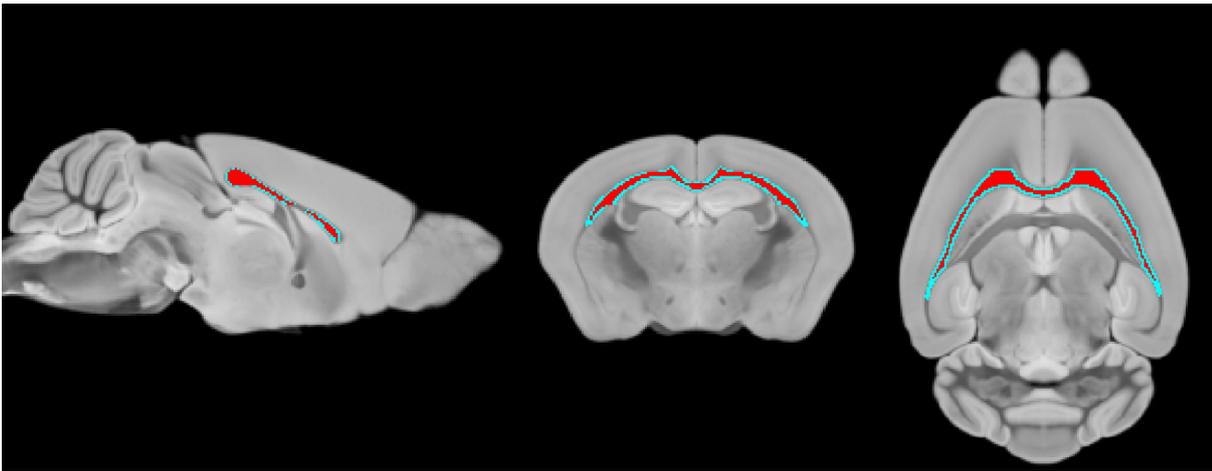


FIGURE 4.13 – Région du corps calleux redéfinie à partir de l’atlas TMBTA, superposée sur le template anatomique TMBTA. La nouvelle région apparaît en rouge tandis que les contours de la région initiale apparaissent en cyan.

4.4.2 Prétraitement des données IRM avant le recalage

Formatage et orientation des images IRM anatomiques

Les images IRM anatomiques sont acquises à partir d’une séquence MGE. De ce fait 14 images en magnitude sont reconstruites, correspondant au signal recueilli à chaque écho acquis (Figure 4.14).

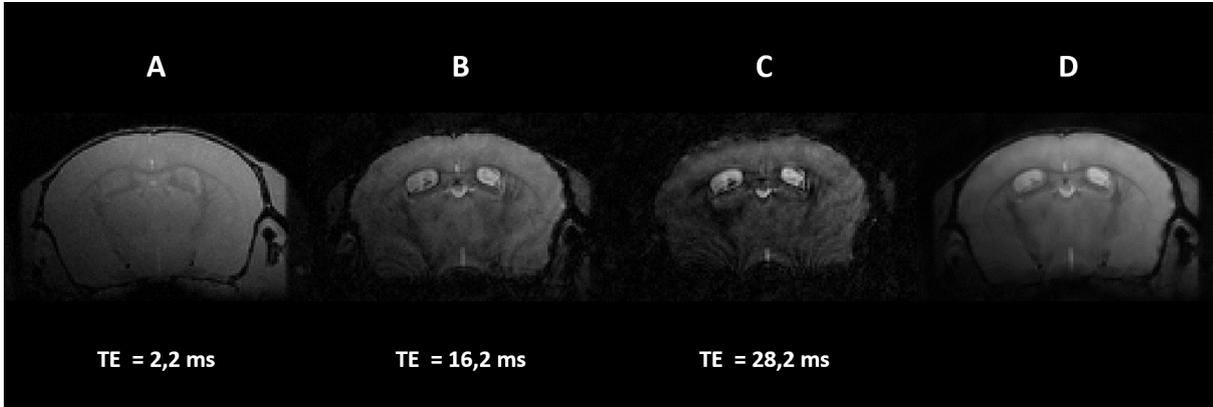


FIGURE 4.14 – Exemples des différents échos acquis à l’aide de la séquence MGE et reconstruits en magnitude pour TE = 2,2 ms (A), 16,2 ms (B) et 28,2 ms (C). Somme de tous les échos reconstruits en magnitude (D).

Ces images sont formatées en DICOM (.dcm) à la console IRM par le système PARAVISION 6.0.1. Il s’agit d’un format d’image standardisé pour l’imagerie médicale qui regroupe les différentes informations liées à l’acquisition et à l’objet imagé dans un "header" et le signal IRM dans une matrice. Si ce format est celui utilisé par notre logiciel d’analyse des images de diffusion, ce n’est pas le cas des logiciels utilisés pour le recalage (FSL). Une deuxième conversion du format DICOM au NIFTI (.nii) a donc été nécessaire pour manipuler ces images "anatomiques".

Une première opération consiste à sommer les 14 images de magnitude, on notera

T_2^* l'image résultante. Nous n'utiliserons pas les images de phase. Par convention, nous orientons les T_2^* de sorte que les axes rostro codal, antérieur postérieur et droite gauche coïncident avec ceux de l'atlas. Cela consiste à appliquer une rotation de -180° et -90° autour des axes Y et Z. De même, nous définissons le centre des images sur la commissure antérieure, puisque c'est ainsi qu'est défini le centre de l'atlas.

Formatage et orientation des images IRM de diffusion

Tout comme les images anatomiques, les images pondérées en diffusion sont converties au format DICOM et NIfTI. Parmi les images pondérées en diffusion, nous choisissons de travailler avec les images A0 pour le recalage puisque ces images possèdent le meilleur SNR, le moins d'artefacts et de distorsions (puisque'ils s'accroissent avec l'augmentation de la pondération de diffusion, voir section 3.2.2 chapitre 3) et un contraste qui se rapproche le plus du template. Bien que les courants de Foucault augmentent avec la pondération de diffusion appliquée et par conséquent génèrent des artefacts plus importants dans les images à forte pondération de diffusion, nous faisons l'hypothèse que les images pondérées en diffusion (hautes valeurs de b comprises) ne présentent pas de distorsions supplémentaires majeures. Le recalage déterminé à partir des images A0 sera donc par la suite appliqué sur toutes les images IRM pondérées en diffusion. Nous appelons A0, les 3 images A0 qui ont été moyennées sur les 3 répétitions. L'orientation et la définition de l'origine sont également modifiées de sorte que les images A0 coïncident le plus possible avec le template. Dans ce cas nous appliquons une simple rotation de -90° .

Segmentation et extraction du signal cérébral total

Pour une meilleure robustesse du recalage, que ce soit pour les images anatomiques ou de diffusion, il est préférable de masquer les zones non cérébrales (peau, muscle, os). Une première étape de segmentation est réalisée sur SPM (<https://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>). Afin de faciliter la convergence de l'algorithme de segmentation, la résolution des différentes images est multipliée par 10. Cet artifice permet de conserver la majorité des paramètres inscrits par défaut et optimisés dans SPM pour le cerveau humain. Le principe est présenté sur la Figure 4.15 en prenant comme exemple une image T_2^* sur laquelle le gradient de signal dans la direction haut bas est corrigé. En effet l'antenne étant surfacique, nous observons une chute du signal au fur et à mesure que l'on s'éloigne de l'antenne, c'est-à-dire le haut du cerveau. La correction est effectuée avec le module N4ITK (Tustison et al., 2010) du logiciel 3D Slicer (<https://www.slicer.org/>) pour les images A0 et T_2^* . Elle consiste à normaliser l'intensité avec une fonction B-Spline sur une grille de résolution $1 \times 1 \times 1$ afin de compenser la perte de signal en bas du cerveau. En plus du masque cérébral total, nous calculons les masques des différents tissus cérébraux (SG, SB, LCS).

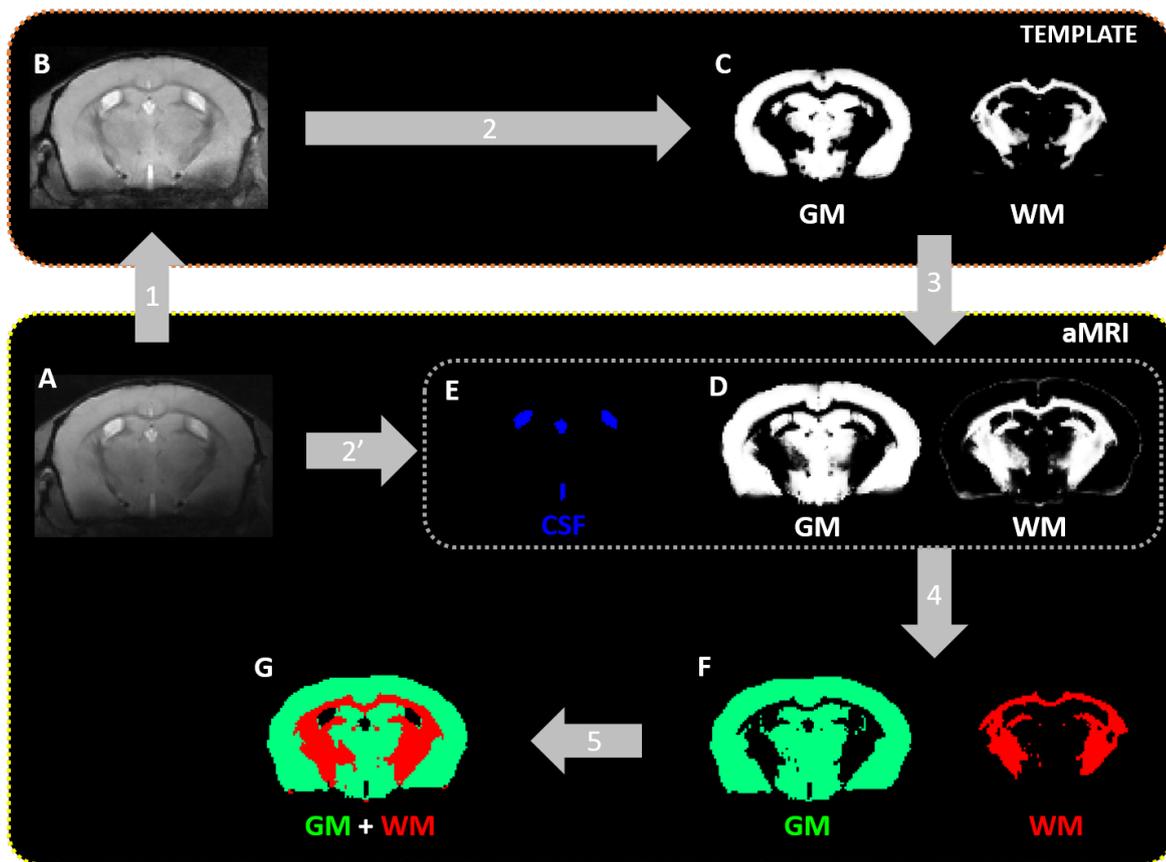


FIGURE 4.15 – Pipeline de segmentation des différents masques de SB, SG, LCS et cerveau total. Une correction du biais de l’antenne de surface est tout d’abord appliquée pour homogénéiser l’intensité du signal de la somme des images MGE (A). L’image est ensuite recalée sur le template TMBTA (B) et segmentée de façon à obtenir les cartes de probabilité de la SB et SG (C) à partir des priors du template TMBTA (flèche 2). Ces cartes de probabilité sont ensuite recalées dans l’espace natif anatomique (D, flèche 3). Un seuil de 0,5 est appliqué dans le but d’obtenir les masques de SB et SG (F, flèche 4). Ces masques sont ensuite sommés pour obtenir le masque SB + SG (G, flèche 5). Pour le masque de LCS nous avons opté pour une approche de segmentation 3D de contours active les images MGE à l’aide du logiciel ITKSnap (E, flèche 2’) (Yushkevich et al., 2006). Les étapes 1, 2, 3 et 4 sont quant à elles réalisées avec SPM, en particulier avec la fonction "Segment" (Ashburner et Friston, 2005). Le masque cérébral total utilisé par la suite pour extraire le signal provenant du cerveau est obtenu en sommant les masques SB, SG et LCS.

En particulier le masque du LCS n’est pas obtenu par la même méthode de segmentation que les autres (Figure 4.15, flèche 2’). En effet, le template TMBTA est construit à partir d’images *ex vivo* pour lesquelles le contraste des ventricules est faible. La carte de probabilité du LCS du template TMBTA ne reflète donc pas tout à fait la probabilité d’appartenance d’un voxel au LCS chez des souris *in vivo* (Figure 4.11).

Cas particulier des masques de LCS et de la ZSV

Cependant d’autres approches qui ne sont pas basées sur des a priori peuvent être envisagées, car les ventricules apparaissent en hypersignal sur les images T_2^* . La différence

de contraste entre les voxels du LCS et les voxels des tissus environnants permet d'utiliser la segmentation semi-automatique 3D par détection de contours avec le logiciel ITKSnap (Yushkevich et al., 2006) (Figure 4.16).

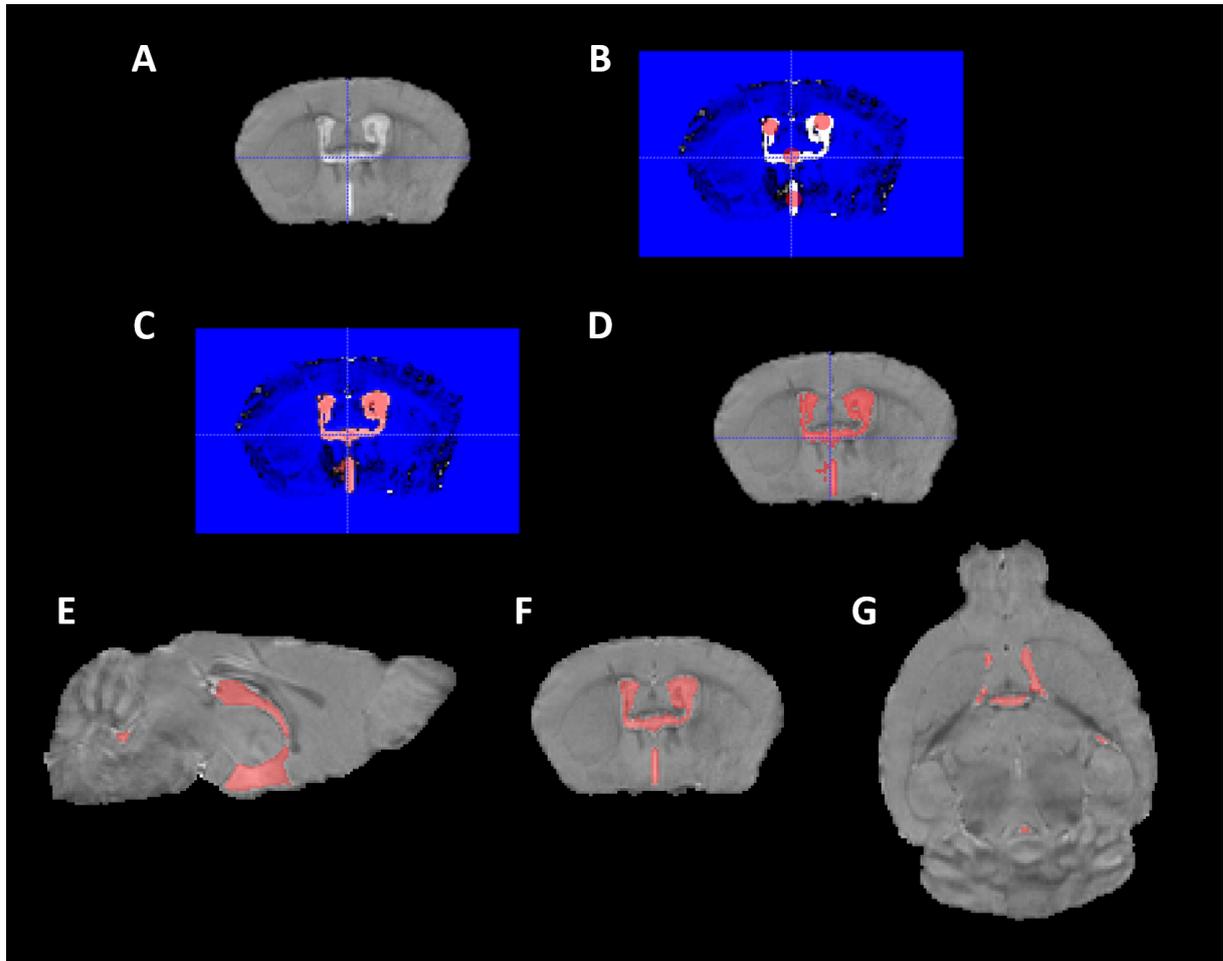


FIGURE 4.16 – (A) Coupe axiale de cerveau masqué. (B) Positionnement manuel des graines ("seeds") sphériques dans les 4 ventricules sur l'image préalablement seuillée en intensité. Les voxels blancs sont ceux qui présentent une intensité supérieure à ce seuil défini visuellement. (C) L'évolution des graines est arrêtée lorsqu'elles rencontrent la limite des ventricules. (D) Masque de LCS résultant de la segmentation par contours actifs sur ITKSnap. (E, F, G) Masque de LCS final obtenu après lissage représenté dans les orientations sagittales, axiales et coronales respectivement.

Ce masque est calculé dans l'espace anatomique et ne peut donc pas être utilisé tel quel dans l'espace de diffusion. Un recalage entre les deux modalités ou une méthode de segmentation par détection automatique des contours sur l'image A0 (hypersignal des ventricules également) pourrait s'appliquer, mais nous avons choisi une méthode plus automatique et plus robuste à partir de la carte paramétrique de la MD, calculée avec les images pondérées en diffusion selon le modèle mathématique d'imagerie du tenseur de diffusion (DTI) (Figure 4.17, A). Sur les cartes de la MD, un hypersignal est observé dans les ventricules (Figure 4.17, B), tout comme pour les images T_2^* , mais plus élevé que pour les images A0. L'application d'un seuil permet alors d'obtenir un masque du LCS contenu dans les ventricules (Figure 4.17, C). Le seuil théorique de l'ordre de $10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$,

correspond à la valeur de MD dans le LCS et aurait pu être appliqué. Mais la petite taille des ventricules et des espaces contenant du LCS par rapport aux structures adjacentes contribue au volume partiel et diminue la valeur de la MD dans le LCS. En pratique, nous avons donc fixé la valeur du seuil à partir de l'ajustement par une gaussienne de l'histogramme moyen de l'intensité des cartes de la MD chez les souris sauvages non irradiées ($N = 21$). Nous avons défini la valeur du seuil par : $\mu \pm 4\sigma$, avec μ la moyenne et σ l'écart-type de la gaussienne. Le masque final de LCS est alors obtenu à partir de l'image seuillée à $7,0 \times 10^{-4} \text{ mm}^2/\text{s}$ puis lissée à l'aide d'une succession de dilatations et d'érosions. L'application d'un seuil un plutôt bas risque alors d'intégrer des voxels du tissu cérébral adjacent dans le masque du LCS, notamment pour la région du striatum (Str) et Cc mais rappelons que le masque de LCS n'est pas utilisé pour remonter à des informations volumétriques (pour lesquels chaque voxels contribue aux résultats), mais plutôt pour éliminer le volume partiel du LCS dans les différentes ROI cérébrales adjacentes.

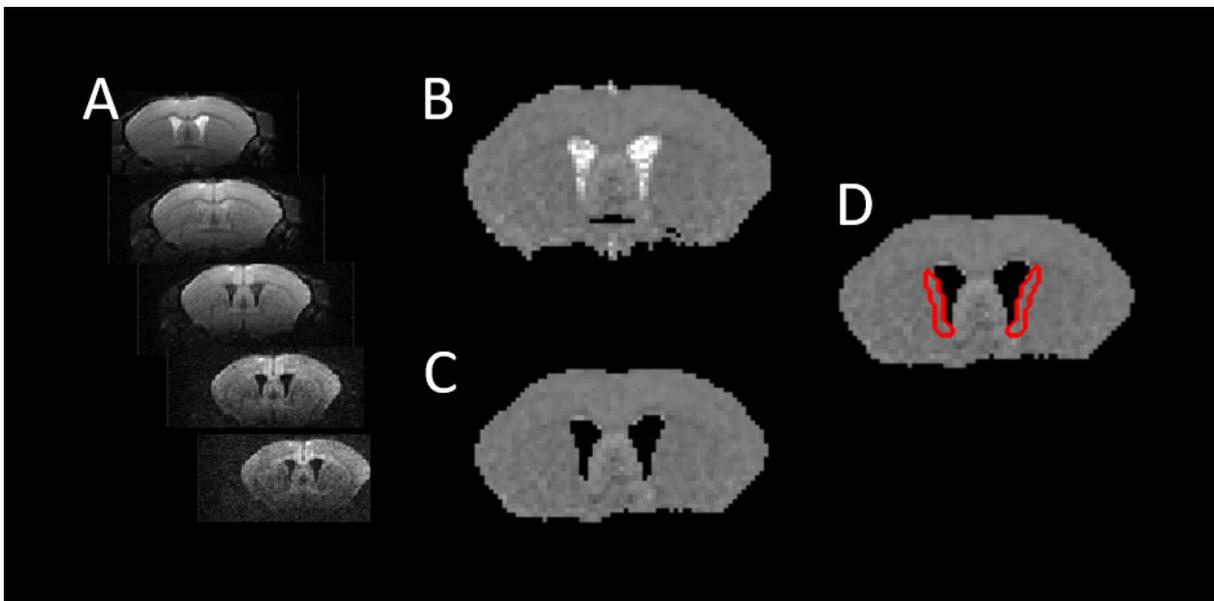


FIGURE 4.17 – (A) Exemples de coupes axiales pondérées en diffusion. (B) Carte paramétrique de MD obtenue à partir des images (A) avec le modèle DTI. (C) Carte paramétrique MD pour laquelle nous avons appliqué un seuil minimum. Les voxels apparaissant en noir correspondent aux voxels appartenant au LCS. (D) Masque de ZSV, dont les contours sont délimités en rouge, obtenu à partir de la dilatation et de l'érosion du masque de LCS (C).

Initialement la ZSV n'est pas définie dans l'atlas TMBTA et est globalement incluse dans la région du striatum en raison de sa proximité avec les ventricules latéraux. En plus des 10 régions précédemment définies (Figures 4.12), nous souhaitons donc définir cette région ZSV dans l'espace de diffusion afin d'investiguer les altérations microstructurelles dans cette région particulièrement impliquée dans la neurogenèse (voir chapitre 2, section 2.3.5). En revanche, l'accès aux variations du volume de cette région ne sera pas développé, puisque cette région étant petite (quelques voxels par coupe IRM), sa variation est difficile à détecter de façon robuste. Le masque de ZSV est donc estimé dans l'espace natif de

diffusion à partir du masque du LCS précédemment défini (Figure 4.17, C). Sur une coupe axiale, cette région s'étend sur quelques pixels de l'extérieur des ventricules latéraux vers le striatum. Nous procédons alors à une dilatation puis une érosion du masque de LCS, que nous soustrayons ensuite afin d'obtenir cette région de deux voxels de largeur autour des ventricules (Figure 4.17, D). Mise à part pour la ZSV que nous avons défini dans l'espace natif des images de diffusion, les 10 autres ROI sont définies dans l'espace du template TMBTA. Des étapes de recalage sont alors nécessaires pour les définir dans l'espace natif des images anatomiques et pondérées en diffusion.

4.4.3 Recalage

Principe

Les étapes de recalage sont des opérations mathématiques qui calculent les transformations géométriques T (rigides ou non rigide) pour faire correspondre une image source à une image de référence en fonction de leurs intensités. Les recalages sont réalisés avec FSL (Jenkinson et al., 2012) à l'aide des fonctions FLIRT pour les recalages de type linéaire et FNIRT pour les non linéaires (Jenkinson et Smith, 2001; Jenkinson et al., 2002; Greve et Fischl, 2009).

Pour l'IRM anatomique, nous utilisons les images T_2^* sur lesquelles nous avons appliqué le masque cérébral total précédemment calculé (section 4.4.2). De façon similaire, le masque cérébral total est calculé et appliqué sur les images A0 (moyennées) avant de procéder au recalage.

Quelle que soit la modalité d'IRM (anatomie ou diffusion), les transformations T calculées sont celles nécessaires pour recalibrer les images IRM (T_2^* ou A0) sur le template anatomique TMBTA. Néanmoins, une fois calculées, ces transformations géométriques T sont inversées dans le but de les appliquer sur le template (et l'atlas) TMBTA. Au final ce sont donc l'atlas TMBTA et ses ROI qui sont recalés sur les images natives (T_2^* ou A0). Il est important d'appliquer le recalage dans ce sens puisque les rotations ne peuvent s'appliquer sur les images IRM pondérées en diffusion au risque d'induire des biais par la suite dans l'estimation des paramètres de diffusion.

Le principe du recalage consiste à :

- recalibrer linéairement (FLIRT) puis non linéairement (FNIRT) les images sources (A0 et T_2^*) sur le template anatomique TMBTA afin de calculer la transformation T :
- le recalage linéaire, avec 7 degrés de liberté et une fonction coût basée sur les informations mutuelles, permet d'obtenir une transformation T1 ;
- le recalage non linéaire calcule la matrice de transformation T à partir de la minimisation de la somme des carrés de la différence entre le template anatomique TMBTA et l'image IRM, en intégrant la transformation T1 calculée précédemment.

- calculer T^{-1} , l'inverse la transformation T ;
- appliquer T^{-1} sur les 10 ROI de l'atlas.

Régions d'intérêt définitives

Afin d'éviter toute contamination du LCS dans les 10 régions définies dans les espaces anatomiques et de diffusion, à l'aide du pipeline de recalage précédent, nous décidons de soustraire le masque de LCS calculées dans la section 4.4.2 aux régions obtenues.

En plus de l'élimination de la contribution du LCS, les ROI dans l'espace de diffusion, des raffinements supplémentaires sont nécessaires pour qu'elles soient robustes vis-à-vis des distorsions des images IRM pondérées en diffusion. Rappelons que pour obtenir les ROI dans l'espace natif des images pondérées en diffusion, nous avons calculé la transformation à partir des images A0. Par conséquent en appliquant la transformation T^{-1} telle quelle sur les images pondérées en diffusion, le recalage est imparfait au vu des distorsions (induites par les courants de Foucault) qui modifient la morphologie de certaines structures cérébrales. Nous avons donc choisi de réaliser une érosion sur les différentes ROI afin de les parfaire en éliminant la probabilité de mauvaise parcellisation du cerveau notamment pour les voxels les plus extérieurs à ces ROI. Les régions bilatérales comme l'hippocampe (Hip), thalamus (Thal), Str sont latéralisées puis érodées en 3D d'un voxel avant d'être recombinaées. Les autres sont quant à elles simplement érodées d'un voxel dans les 3 dimensions de l'espace.

Comme ces régions finales sont obtenues à partir de l'atlas TMBTA, elles sont ré-orientées pour pouvoir être dans le même espace que celui des images anatomiques et de diffusion. De plus, la taille des pixels est divisée par 10 pour correspondre à la résolution des images IRM natives.

4.5 Analyse par régions d'intérêt

4.5.1 Paramètres volumétriques

Après inspection visuelle des images T_2^* , l'analyse par ROI consiste à estimer leurs volumes, c'est-à-dire déterminer le nombre de voxels du masque de chaque ROI et le multiplier par la résolution spatiale ($0,1 \times 0,1 \times 0,1 \text{ mm}^3$). Ainsi les volumes du Ctx, de l'Htl, du Thal, du Str, de l'Hip, du BO, du MB, du Cer, du Cc, du SB*, mais également de la SG, SB et du LCS sont déterminés.

4.5.2 Paramètres de diffusion

Fichiers SmapRaw et bmat : préparation des données

Les images pondérées en diffusion sont analysées à l'aide d'un logiciel développé en MATLAB par Denis Le Bihan, dont l'organigramme est présenté sur la Figure 4.18. Les

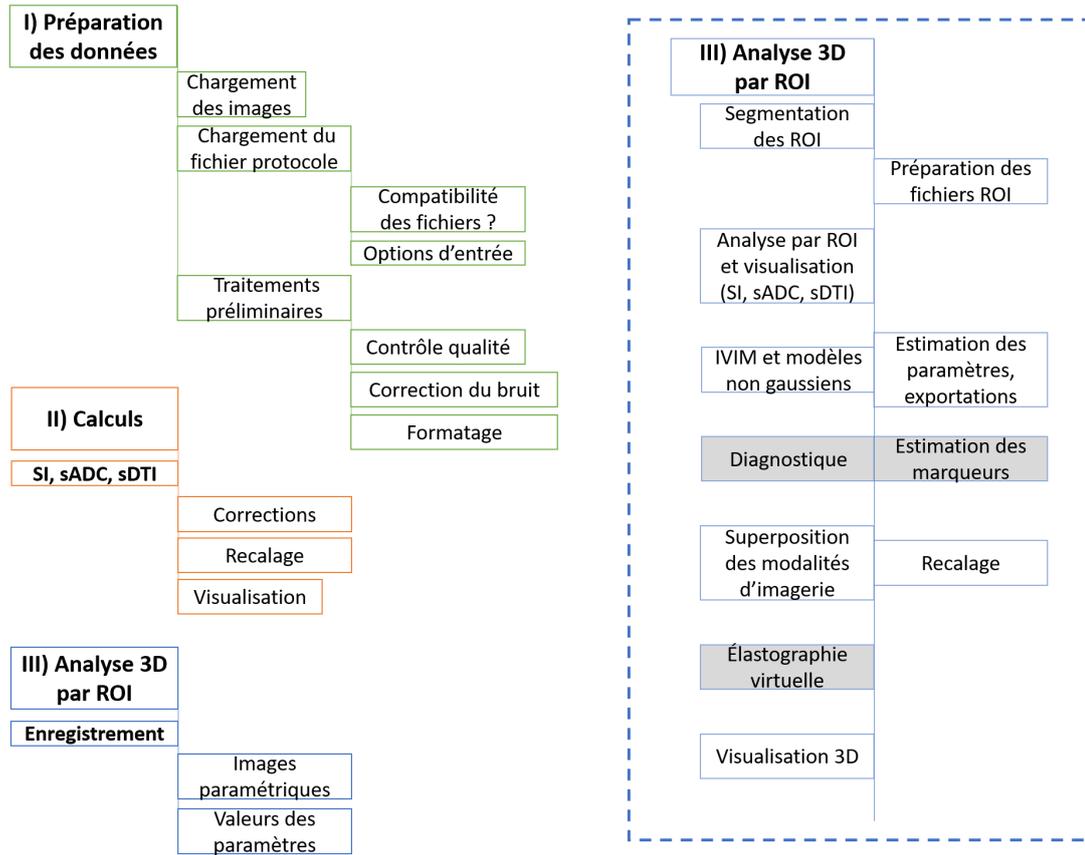


FIGURE 4.18 – Structure du logiciel de traitement de données de diffusion. Les cases grisées correspondent à des options non utilisées dans le cadre de la thèse. L'algorithme du logiciel est divisé en trois blocs : I) la préparation des données (en vert), II) Les calculs (en orange) et III) l'analyse 3D par ROI (en bleu). Le troisième bloc est repris plus en détail dans l'encadrement bleu en pointillés.

étapes de recalage décrites plus haut sont appliquées uniquement sur A0 pour définir les ROI dans l'espace des images de diffusion. Pour l'analyse par ROI, on utilise les données brutes reconstruites au format DICOM. Pour lire et analyser ces images, ces images DICOM doivent être converties dans un format compatible avec le logiciel. Les images pondérées en diffusion de chaque répétition pour chaque coupe, chaque valeur de b et chaque direction (avec la matrice de b correspondante pour chaque acquisition) sont d'abord regroupées sous la forme d'une structure (.mat) appelée SmapRaw à l'aide d'un code rédigé en MATLAB. SmapRawR1, SmapRawR2 et SmapRawR3 (correspondant aux fichiers SmapRaw des répétitions 1, 2 et 3) sont alors des structures de dimensions $N_s \times N_b \times N_{dir}$, avec N_s le nombre de coupes, N_b le nombre de valeurs de b ($b = 0$ s/mm² inclus) et N_{dir} le nombre de directions de diffusion (étape chargement des images, Figure 4.18). Pour exemple, SmapRawR1(S,B,D) contient les champs d'informations suivants :

- Version : la version du code ;
- PatientID : l'identité de l'animal ;
- I : matrice 2D correspondant à l'image IRM de la coupe S, la pondération de diffusion B dans la direction D ;

- `bvalues` : le nombre de valeurs de b ($= 20$);
- `bmat` : la matrice de b de dimension $(1 \times 1 \times 6)$;
- `slices` : le nombre de coupes ($= 42$);
- `Ndir` : le nombre de directions de diffusion;
- `Height` : la dimension 1 de la matrice I ($= 96$);
- `Width` : la dimension 2 de la matrice I ($= 112$);
- `SliceThickness` : ($= 0,225$ mm);
- `SpacingBetweenSlices` : ($= 0,250$ mm);
- `PixelSpacing` : la résolution dans le plan ($= 0,125 \times 0,125$ mm²);
- `ProtocolName` : le nom du fichier protocole.

Un autre code développé en MATLAB permet de retrouver les valeurs de la matrice de b enregistrées dans le fichier "method" généré par PARAVISION 6.0.1 et qui contient toutes les informations relatives à l'acquisition. Comme la matrice de b est symétrique, seuls 6 éléments de sa matrice sont conservés : `bxx`, `bxy`, `bxz`, `byy`, `byz` et `bzy`.

Le fichier protocole est une structure MATLAB qui contient les informations propres au protocole d'acquisition utilisé et nécessaires pour estimer les paramètres de diffusion :

- `bval` : vecteur de dimension (1×20) contenant les valeurs effectives de b ;
- `LKeyb` : rang dans la liste des valeurs de b correspondant à la valeur de b_{low} (400 s/mm² $\rightarrow 9$);
- `HKeyb` : rang dans la liste des valeurs de b correspondant à la valeur de b_{high} (2500 s/mm² $\rightarrow 17$);
- `KeybIVIM` : rang dans la liste des valeurs de b correspondant à la valeur seuil pour les effets IVIM (200 s/mm² $\rightarrow 8$).

Une fois le fichier protocole chargé dans le logiciel (étape chargement des fichiers protocole, Figure 4.18), un test vérifie que les conditions sur les valeurs de b sont respectées de façon à rendre la moyenne géométrique des signaux invariante par rotation. Si ce n'est pas le cas, l'analyse peut tout de même être poursuivie, mais un message avertit l'utilisateur du non-respect de ces conditions, c'est-à-dire que les directions de diffusion ne sont pas réparties de façon homogène sur l'angle solide de 4π ou que la somme des termes croisés pour les valeurs de b sur l'ensemble des directions n'est pas négligeable. La compatibilité entre les informations contenues dans les fichiers `SmappRaw` et protocole est vérifiée avant le début des calculs, notamment sur le nombre de valeurs de b , de directions, de coupes (étape compatibilité des fichiers, Figure 4.18).

Fichiers `SmappRawAvg`

La structure `SmappRawAvg` est générée à partir d'un exécutable codé en MATLAB qui :

- calcule la moyenne des images enregistrées dans les fichiers `SmappRawR1`, `SmappRawR2` et `SmappRawR3`;
- estime le facteur de qualité (Q) à partir de la variation lissée du signal voxel à

voxel entre les 3 répétitions. Trois seuils sont proposés (4, 8 et 12 % de stabilité) ou un ajustement manuel (étape contrôle qualité, Figure 4.18) ;

- la détermination du plancher du bruit ricien. Il est déterminé automatiquement (et ajustable manuellement) à partir du profil du signal de la coupe centrale, pour les valeurs minimale et maximale de b (étape correction du bruit, Figure 4.18).

Les fichiers images au sein de la structure `SmapRawAvg` contiennent donc les valeurs corrigées pour chaque voxel, avec fléchage (NaN) pour la suite des calculs des voxels rejetés (bruit, instabilité) en fonction des critères retenus (étape formatage, Figure 4.18). Ces voxels sont bien souvent localisés dans des régions artefactées. La Figure 4.19 donne un exemple en termes de variation d'intensité inter répétitions acceptable 4.19 (A), et non acceptable 4.19 (B).

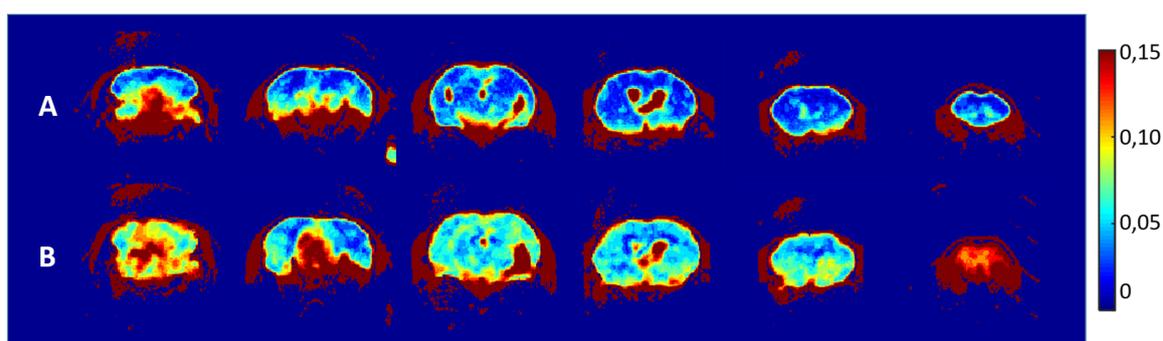


FIGURE 4.19 – Valeurs du facteur de qualité Q quantifiant la variation de signal entre les 3 répétitions pour un sujet dont la qualité des images est suffisante (A) ou insuffisante (B). Les pixels apparaissant en orange-rouge seront exclus de l'analyse.

Fichiers `Cmap`, `RoiRec`

Pour permettre une analyse automatique à partir des ROI déterminées sur les images anatomiques via l'atlas et les coordonnées des ROI sont recalées à partir de la transformation T^{-1} et intégrées dans un fichier `RoiRec.mat` (1 par ROI), structure MATLAB renfermant les paramètres :

- `mask` : le masque binaire de la ROI sous la forme d'une matrice de dimensions $96 \times 112 \times 42$;
- `xmin`, `ymin`, `smin` et `xmax`, `ymax`, `smax` : les valeurs minimales et maximales de x , y , z pour lesquelles l'élément de la matrice est égal à 1.

Dans le logiciel, il est également possible d'utiliser l'atlas avec l'ensemble des ROI en concaténant les images recalées (T^{-1}) de l'atlas dans un fichier `Cmap.mat` qui contient une structure MATLAB similaire à celle de `SmapRaw` (étape recalage, Figure 4.18).

Fichiers `SmapProcess` : calculs et analyse 3D par ROI

Une fois les différents fichiers téléchargés dans le logiciel (`SmapRawAvg`, `protocol`) et vérifiés en termes de compatibilité, l'analyse globale (étapes calculs, Figure 4.18) puis par

ROI (étapes analyse 3D par ROI, Figure 4.18) peut débiter. Trois types d'analyse ont été menés avec ce logiciel : une analyse à partir du modèle du S-Index (et sADC), à partir du modèle IVIM-Kurtosis et du modèle sDTI (étape options d'entrée, Figure 4.18).

Elles commencent par la correction de l'amplitude du signal (étape corrections, Figure 4.18), à partir de l'estimation du facteur de correction de bruit (NCF) (Iima et al., 2015). Le paramètre NCF caractérise la contribution intrinsèque du bruit dans les images, dépendant principalement de l'antenne et des paramètres de séquence. L'apparition de ce bruit (non gaussien) s'exprime par une atténuation du signal non nulle, même pour de très fortes pondérations de diffusion, ce qui peut être à l'origine d'une sous-estimation de l'ADC et/ou une surestimation du kurtosis. Si l'on considère ce bruit, on peut modéliser le signal mesuré ($M(b)$) à l'aide de l'équation suivante (Iima et al., 2015) :

$$M(b) = [S(b)^2 + NCF]^{1/2} \quad (4.5)$$

avec $S(b) = S(b=0) \{ f_{IVIM} \times \exp(-bD^*) + (1 - f_{IVIM}) \times \exp(-bADC_0 + (bADC_0)^2 \frac{K}{6}) \}$. L'ajustement du signal mesuré par ce modèle nous permet alors d'une part d'estimer les paramètres f_{IVIM} , D^* , ADC_0 , K et NCF , et d'autre part de corriger l'amplitude du signal avec le paramètre NCF pour l'estimation des autres paramètres (SI, sADC, sFA, sMD, etc.).

Les valeurs des paramètres estimées à l'aide du modèle sélectionné (non gaussien ou DTI) sont ensuite visualisées sur les différentes coupes du cerveau (étape visualisation, Figure 4.18) et enregistrées sous la forme d'un fichier MATLAB nommé `Smap_processedImages` contenant une matrice de structure de dimensions (N_s , N_b). Chaque structure renferme :

- les paramètres du `Smap_raw` correspondant ;
- Q : la matrice du facteur de qualité ;
- S : la matrice du paramètre SI ;
- sADC : la matrice du paramètre sADC ;
- MD, FA, V_x , V_y , V_z , L1, L2, L3, S1, S2, S3 : les matrices des paramètres sMD, sFA, des vecteurs ($\vec{e}_1, \vec{e}_2, \vec{3}$) et valeurs propres ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$) du tenseur de diffusion et des valeurs propres (S1, S2, S3) du tenseur de SI (si le mode choisi par l'utilisateur est le mode DTI).

Il est également possible de poursuivre par une analyse par ROI. Les ROI peuvent être tracées manuellement (étape segmentation des ROI, Figure 4.18) ou un fichier `RoiRec` généré précédemment peut être sélectionné. Les paramètres de diffusion sont estimés et ensuite visualisés coupe par coupe (pour certains paramètres et en 3D si nécessaire), mais tous sont exportés dans un fichier Excel (étape estimation des paramètres et exportations, Figure 4.18). D'autres options permettent de visualiser les histogrammes ou d'exporter l'ajustement du signal.

4.5.3 Tests statistiques

Les paramètres estimés (volume et paramètres de diffusion) dans les différentes ROI sont moyennés pour chaque groupe d'animaux. Les valeurs moyennes de ces groupes sont comparées deux à deux à l'aide d'un test de Student bilatéral. Le seuil statistique est fixé à $p < 0,05$.

4.6 Bilan

Un travail de méthodologie, aussi bien pour le protocole d'acquisition que pour le traitement des données IRM, a été mis en place au cours de cette thèse. Le but étant d'appliquer cette méthodologie dans un contexte de radiobiologie afin de détecter et de caractériser par IRM les altérations cérébrales à long terme chez un modèle souris.

Bibliographie

- John Ashburner. A fast diffeomorphic image registration algorithm. *Neuroimage*, 38(1) : 95–113, October 2007. ISSN 1053-8119. doi : 10.1016/j.neuroimage.2007.07.007.
- John Ashburner and Karl J. Friston. Unified segmentation. *NeuroImage*, 26(3) :839–851, July 2005. ISSN 10538119. doi : 10.1016/j.neuroimage.2005.02.018. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1053811905001102>.
- D. A. Barrière, R. Magalhães, A. Novais, P. Marques, E. Selingue, F. Geffroy, F. Marques, J. Cerqueira, J. C. Sousa, F. Boumezbeur, M. Bottlaender, T. M. Jay, A. Cachia, N. Sousa, and S. Mériaux. The SIGMA rat brain templates and atlases for multimodal MRI data analysis and visualization. *Nat Commun*, 10(1) :1–13, December 2019. ISSN 2041-1723. doi : 10.1038/s41467-019-13575-7. URL <https://www.nature.com/articles/s41467-019-13575-7>.
- David André Barrière, Ella Arsène, Frédéric Szeremeta, Hans Adriaensen, William Mème, Elodie Chaillou, Martine Migaud, Sandra Mème, Frédéric Lévy, and Matthieu Keller. Brain orchestration of pregnancy and maternal behavior in mice. *BioRxiv*, 2020. doi : 10.1101/2020.05.23.112045.
- Gabrielle Fournet, Luisa Ciobanu, and Denis Le Bihan. *IVIM Models : Advantages, Disadvantages, and Analysis Pitfalls*. Singapour, panstafor edition, 2019. URL <https://www.nlb.gov.sg/biblio/203992999>.
- Douglas N. Greve and Bruce Fischl. Accurate and robust brain image alignment using boundary-based registration. *NeuroImage*, 48(1) :63–72, October 2009. ISSN 10538119. doi : 10.1016/j.neuroimage.2009.06.060. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1053811909006752>.
- Bernhard Gruber, Martijn Froeling, Tim Leiner, and Dennis W.J. Klomp. RF coils : A practical guide for nonphysicists. *J Magn Reson Imaging*, 48(3) :590–604, September 2018. ISSN 1053-1807. doi : 10.1002/jmri.26187. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6175221/>.
- Manfred Holz, Stefan R. Heil, and Antonio Sacco. Temperature-dependent self-diffusion coefficients of water and six selected molecular liquids for calibration in accurate 1h NMR PFG measurements. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2(20) :4740–4742, January 2000.

ISSN 1463-9084. doi : 10.1039/B005319H. URL <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2000/cp/b005319h>.

Mami Iima, Kojiro Yano, Masako Kataoka, Masaki Umehana, K. Murata, Shotaro Kanao, Kaori Togashi, and Denis Le Bihan. Quantitative non-Gaussian diffusion and intravoxel incoherent motion magnetic resonance imaging : differentiation of malignant and benign breast lesions. *Investigative radiology*, 50(4) :205–211, 2015. doi : 10.1097/RLI.0000000000000094.

Mark Jenkinson and Stephen Smith. A global optimisation method for robust affine registration of brain images. *Medical image analysis*, 5(2) :143–156, 2001.

Mark Jenkinson, Peter Bannister, Michael Brady, and Stephen Smith. Improved Optimization for the Robust and Accurate Linear Registration and Motion Correction of Brain Images. *NeuroImage*, 17(2) :825–841, October 2002. ISSN 10538119. doi : 10.1006/nimg.2002.1132. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1053811902911328>.

Mark Jenkinson, Christian F. Beckmann, Timothy E. J. Behrens, Mark W. Woolrich, and Stephen M. Smith. FSL. *NeuroImage*, 62(2) :782–790, August 2012. ISSN 1053-8119. doi : 10.1016/j.neuroimage.2011.09.015. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811911010603>.

J. Mattiello, P. J. Basser, and D. LeBihan. Analytical Expressions for the b Matrix in NMR Diffusion Imaging and Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, 108(2) :131–141, June 1994. ISSN 1064-1858. doi : 10.1006/jmra.1994.1103. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S106418588471103X>.

James Mattiello, Peter J. Basser, and Denis Le Bihan. The b matrix in diffusion tensor echo-planar imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, 37(2) :292–300, 1997. ISSN 1522-2594. doi : 10.1002/mrm.1910370226. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mrm.1910370226>.

P. S. Tofts, D. Lloyd, C. A. Clark, G. J. Barker, G. J. M. Parker, P. McConville, C. Baldock, and J. M. Pope. Test liquids for quantitative MRI measurements of self-diffusion coefficient in vivo. *Magnetic Resonance in Medicine*, 43(3) :368–374, 2000. ISSN 1522-2594. doi : 10.1002/(SICI)1522-2594(200003)43:3<368::AID-MRM8>3.0.CO;2-B. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291522-2594%28200003%2943%3A3%3C368%3A%3AAID-MRM8%3E3.0.CO%3B2-B>.

Nicholas J. Tustison, Brian B. Avants, Philip A. Cook, Yuanjie Zheng, Alexander Egan, Paul A. Yushkevich, and James C. Gee. N4itk : Improved N3 Bias Correction. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 29(6) :1310–1320, June 2010. ISSN 1558-254X. doi : 10.1109/TMI.2010.2046908.

Paul A. Yushkevich, Joseph Piven, Heather Cody Hazlett, Rachel Gimpel Smith, Sean Ho, James C. Gee, and Guido Gerig. User-guided 3d active contour segmentation of anatomical structures : Significantly improved efficiency and reliability. *NeuroImage*, 31(3) :1116–1128, July 2006. ISSN 10538119. doi : 10.1016/j.neuroimage.2006.01.015. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1053811906000632>.

Chapitre 5

Effets des radiations ionisantes à forte dose sur le cerveau en développement : validation des apports méthodologiques

Cette première étude a pour objectif de caractériser *in vivo* par IRM les effets cérébraux radio-induits chez un modèle de souris exposé *in utero* à des rayons γ à une dose entraînant des dommages importants des tissus cérébraux des embryons. Par la même occasion, ce chapitre vise à valider la sensibilité de notre approche d'exploration des atteintes anatomiques et microstructurelles. Cette méthodologie est développée en vue d'une caractérisation des atteintes neurologiques induites par une irradiation à faible dose sur le cerveau en développement, lesquelles sont plus subtiles à mettre en évidence, ce qui sera abordé dans le chapitre 7. Cette étude a fait l'objet de présentations orales dans les congrès de l'ERR (European Radiation Research Society) en 2018, de l'ICRR (International Congress of Radiation Research) et l'ESMRMB (European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology) en 2019 et un article est en préparation (annexe E).

5.1 Matériels et méthodes

5.1.1 Protocole d'irradiation et effectifs de l'étude

Comme présenté sur la Figure 5.1, des embryons de souris de 14,5 jours (E14,5) ont été irradiés par une exposition corps entier des souris gestantes à de fortes doses d'irradiation pour les embryons (1 Gy). Le protocole d'irradiation utilisé est détaillé dans la section 4.1.1 du chapitre 4. Les conséquences de l'irradiation embryonnaire ont été évaluées par IRM chez des animaux adultes, âgés d'environ 3 mois. Seuls les mâles qui ont été exposés *in utero* (groupe IRR) ou non exposés (groupe Sham) ont été inclus dans l'étude d'imagerie. Aucune manipulation n'est réalisée sur ces souris jusqu'aux acquisitions IRM. Les effectifs de chaque groupe de souris (IRR ou Sham) sont indiqués dans la Figure 5.1 précisant ainsi le nombre de souris gestantes irradiées ou non ainsi que le nombre de souriceaux

conservés à la naissance pour les études d'imagerie à l'âge adulte.

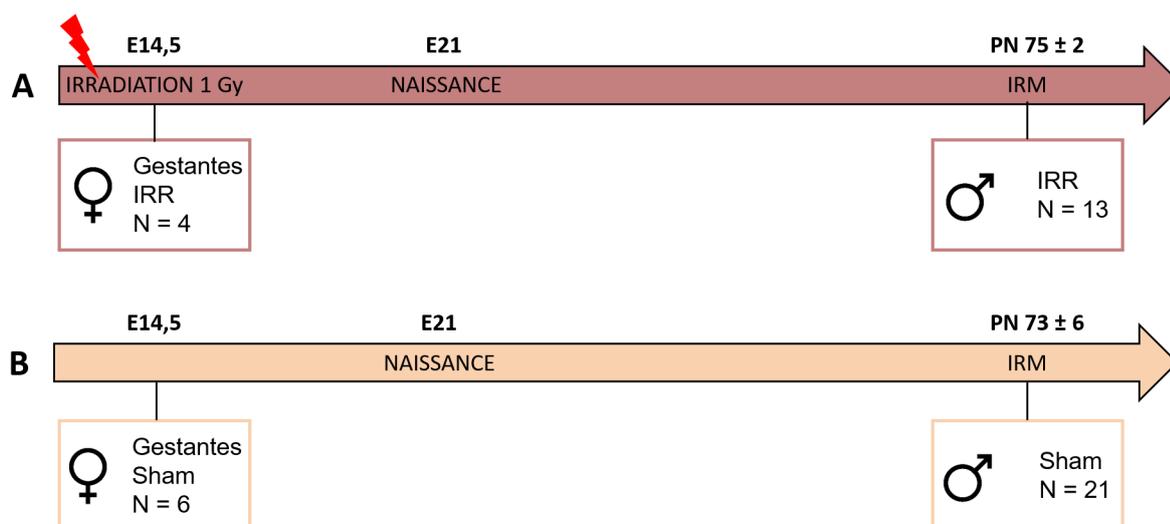


FIGURE 5.1 – Représentation schématique du protocole expérimental : de l'irradiation *in utero* aux acquisitions IRM chez les souris irradiées lors de l'embryogenèse (groupe IRR) (A) et non irradiées (groupe Sham) (B). L'expérimentation animale s'est déroulée sur des souris de souche C57BL6/N. Au 14^{ème} jour de gestation (E14,5), 4 souris gestantes furent exposées aux RI selon un protocole d'irradiation corps entier. Les 6 autres souris gestantes non exposées ne sont pas soumises à d'autres manipulations. Environ 3 mois après la naissance des souris irradiées *in utero*, des études IRM ont été réalisées sur des animaux uniquement mâles, issus de portées différentes.

Les souris étaient hébergées sans restriction ni alimentaire ni hydrique. La température était maintenue constante (19-22°C) avec un taux d'humidité entre 40 et 50 %. La luminosité dans la pièce d'hébergement était également fixée avec un cycle jour/nuit de 12h chacun. Les expérimentations animales ont été menées en accord avec la Directive européenne de 2010 et le comité d'éthique (APAFIS #20441-2019042915561380).

Protocole d'acquisition IRM

Le protocole d'acquisition mené sur les équipements présentés dans la section 4.1.2 du chapitre 4 est décrit dans la section 4.2 du chapitre 4.

5.1.2 Analyses

Critères d'inclusion

Sur l'ensemble des sets de données anatomiques acquis, nous n'avons détecté aucune lésion visible (œdème, nécrose, hémorragie) dans les groupes Sham et IRR. Seule une souris Sham présentait une hydrocéphalie manifeste (Figure 5.2) justifiant son exclusion de l'étude. Finalement, l'analyse volumétrique a été conduite sur $N_{Sham} = 20$ et $N_{IRR} = 13$ souris.

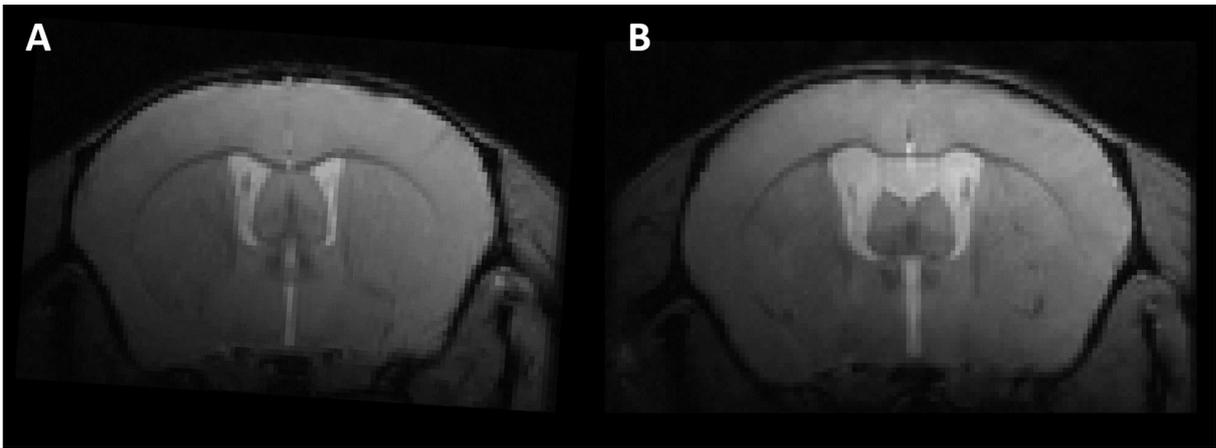


FIGURE 5.2 – Exclusion d’une souris non irradiée pour l’analyse des données IRM anatomiques. (A) Coupe axiale de cerveau de souris pour un animal inclus dans l’étude. (B) Coupe axiale de cerveau de souris présentant une hydrocéphalie manifeste justifiant son exclusion de l’étude.

Parmi les 33 des sets de données retenus en IRM de diffusion (dont 20 Sham et 13 IRR), 6 animaux IRR et 6 animaux Sham ont été exclus de l’analyse, au vu de la variation du signal trop importante ($> 12\%$) entre chaque répétition. Au final, l’analyse des images pondérées en diffusion a été conduite sur $N_{Sham} = 14$ et $N_{IRR} = 7$ souris.

Comparaisons inter-groupes et analyses statistiques

Pour chacun des groupes de souris (Sham et IRR), la moyenne et l’écart type (SD) des valeurs des paramètres sont calculés dans les différentes ROI : 10 pour l’analyse volumétrique et 11 pour l’analyse en diffusion (voir la section 4.4 du chapitre 4 pour le détail des ROI étudiées). La variation normalisée entre les groupes Sham et IRR pour un paramètre P donné est calculée à partir de la formule suivante :

$$\Delta P = \frac{P_{IRR} - P_{Sham}}{P_{Sham}} \quad (5.1)$$

La variation de certains paramètres est projetée sur le template souris TMBTA présenté dans la section 4.4.1 du chapitre 4 pour permettre une meilleure visualisation des effets de l’irradiation. La significativité des comparaisons inter-groupes est calculée à l’aide d’un test de Student bilatéral avec un seuil de significativité fixé à $p < 0,05$.

En ce qui concerne les données comportementales et histologiques, les résultats sont présentés, pour les deux groupes, comme la moyenne \pm l’erreur standard de la moyenne (SEM). La significativité statistique entre les deux groupes est déterminée à partir d’un test de Mann-Whitney réalisé avec le logiciel Prism. Le seuil de significativité est fixé à $p < 0,05$.

5.2 Résultats

5.2.1 L'irradiation *in utero* à forte dose (1 Gy) provoque une apoptose élevée des cellules cérébrales chez l'embryon

Quatre heures après l'exposition *in utero* aux rayonnements ionisants (RI) (pour le groupe IRR) ou la non-exposition (pour le groupe Sham) aux RI, l'apoptose a été évaluée au Laboratoire de RadioPathologie (LRP, CEA, Fontenay-aux-Roses) dans le cerveau des embryons irradiés (groupe IRR) ou non irradiés (groupe Sham). Le taux d'apoptose a été quantifié dans le télencéphale dorsal des embryons (E14,5) par un double marquage au 4',6 diamidino-2-phénylindole (DAPI) et à la caspase 3 clivée ou "cleaved caspase 3" (CC3). Les détails du protocole d'immunomarquage sont indiqués dans l'annexe D. D'après la Figure 5.3, une augmentation significative du pourcentage de cellules positives à la CC3 est observée (environ 15 fois plus élevé) chez les embryons IRR par rapport aux embryons Sham (N = 4 pour chaque groupe).

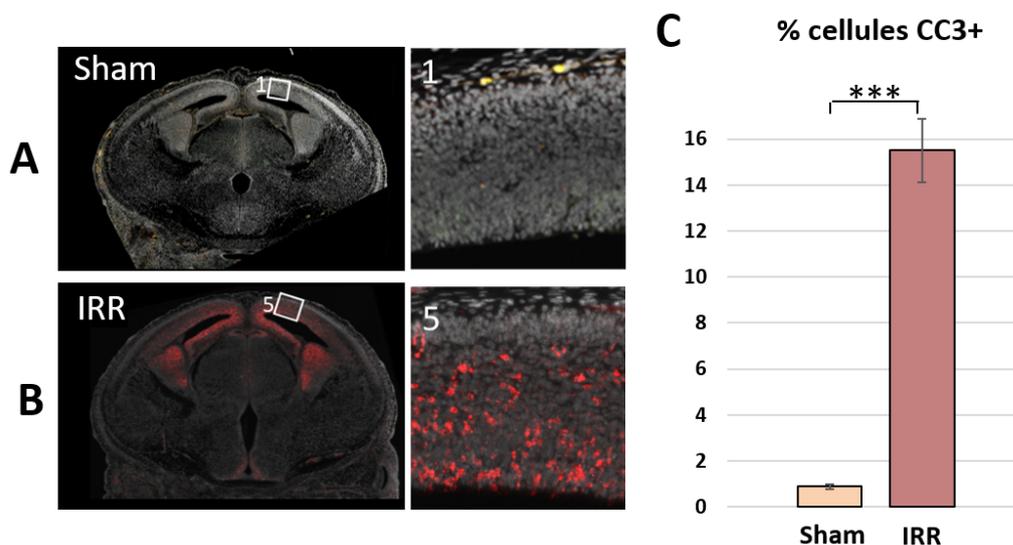


FIGURE 5.3 – L'irradiation *in utero* à forte dose induit une apoptose des cellules cérébrales de l'embryon en phase aiguë (4h post-irradiation). Coupes axiales doublement marquées au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole, marqueur des noyaux cellulaires, gris) et CC3 ("cleaved caspase-3", marqueur de l'apoptose, rouge) chez un embryon non irradié (Sham, A) et irradié à 1 Gy à E14,5 (IRR, B). Les encarts numérotés 1 et 5 correspondent au zoom ($\times 10$) dans des régions du télencéphale dorsal. (C) Moyenne \pm SEM du pourcentage de cellules positives à la CC3 chez le groupe IRR (marron) et Sham (beige) avec N = 4 embryons dans chaque groupe. La significativité des résultats a été calculée avec un test de Mann-Whitney : *** p < 0,001.

5.2.2 L'irradiation *in utero* à forte dose (1 Gy) n'impacte pas à long terme le comportement des souris adultes

Au terme de leur gestation (E21), aucune anomalie, malformation ou mort-né n'a été observé chez les souriceaux, que ce soit dans le groupe IRR ou Sham. De même, à l'âge adulte les souris ne présentent pas de problème de prise alimentaire ou hydrique. Le poids moyen des souris IRR était de $22,4 \pm 1,6$ g alors que celui des souris Sham était de $24,7 \pm 2,9$ g, soit une diminution significative d'environ 9% ($p = 0,016$).

D'autre part, des tests comportementaux sur des souris IRR et Sham, animaux différents de ceux qui ont servi à l'imagerie, ont été menés au Laboratoire de RadioPathologie (LRP, CEA, Fontenay-aux-Roses). La description détaillée des tests utilisés est insérée en annexe C.

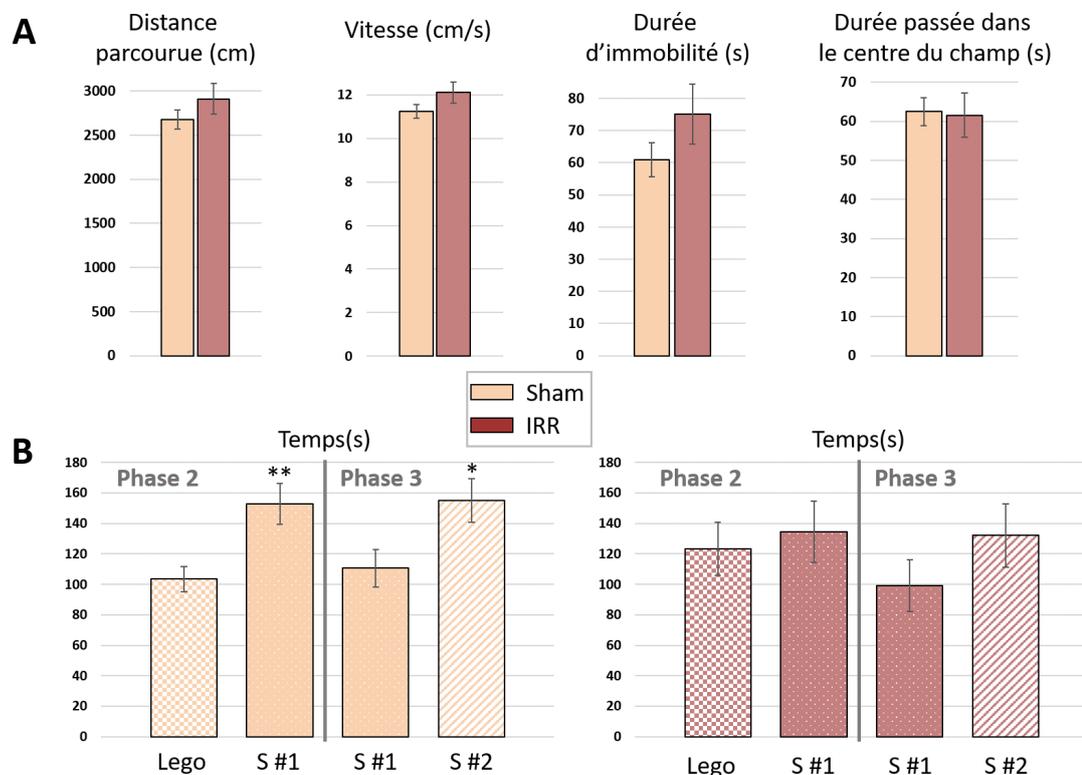


FIGURE 5.4 – L'irradiation *in utero* à forte dose modifie le comportement social des souris adultes, mais n'affecte pas la locomotion et l'anxiété des animaux. (A) Moyenne \pm SEM de la distance parcourue (cm), vitesse de déplacement (cm/s) et la durée d'immobilité ainsi que le temps passé dans le centre du champ (s) mesurés chez les souris IRR ($N_{IRR} = 11$) et Sham ($N_{Sham} = 14$) avec le test de l'open field. (B) Moyenne \pm SEM du temps chez les souris IRR ($N_{IRR} = 11$) et Sham ($N_{Sham} = 14$) à explorer le lego, la souris 1 (S #1) et la souris 2 (S #2) durant les phases 2 et 3 du "3 chamber test for sociability and recognition". La significativité des résultats a été calculée avec un test de Mann-Whitney : ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Avec le test de l'"open field" (OF) (Holmes et al., 2002), nous avons étudié les effets à

long terme de l'irradiation *in utero* sur les souris adultes en évaluant leurs capacités motrices déterminées par différents paramètres quantitatifs : la distance parcourue, la vitesse et le temps d'immobilité. De plus, le test de l'OF est également couramment utilisé pour estimer l'anxiété des animaux puisque le centre du dispositif est naturellement anxiogène pour eux. Les rongeurs préfèrent spontanément, en effet, se déplacer en périphérie de l'OF (comportement appelé thigmotaxie). Ainsi, un animal stressé aura donc tendance à passer plus de temps en périphérie du dispositif expérimental que de temps passé au centre. Les résultats présentés sur la Figure 5.4 montrent aucune variation significative entre les groupes IRR et Sham.

D'après le "Three-chamber test for sociability and recognition" (Silverman et al., 2010), les souris Sham passent plus de temps avec la souris 1 (S #1) qu'avec le légo dans la phase 2, et plus de temps avec la souris 2 (S #2) qu'avec la souris S #1 dans la phase 3 (Figure 5.4, B, partie gauche). Ce comportement correspond à un comportement normal, traduisant leur sociabilité et leur préférence pour les interactions avec de nouveaux congénères. Pour le groupe IRR, le temps passé avec le légo et la souris S #1 ne varie pas pendant la phase 2. De même durant la phase 3, les souris IRR passent autant de temps avec la S #1 qu'avec la S #2 (Figure 5.4, B, partie droite).

5.2.3 Atrophies cérébrales radio-induites à long terme chez la souris lors d'une irradiation *in utero*

À partir des images obtenues en IRM anatomique, nous avons réalisé des études volumétriques des principaux compartiments cérébraux, à savoir la substance grise (SG), la substance blanche (SB) et le liquide cébrospinal (LCS). L'analyse statistique révèle une atrophie significative de 14 % du volume cérébral total (SG+SB, $p = 1,9 \times 10^{-8}$) chez les souris IRR par rapport aux souris Sham (Figure 5.5). Elle se décompose en une diminution du volume de 16% pour la SG ($p = 4,0 \times 10^{-9}$) et de 8% pour la SB ($p = 1,6 \times 10^{-2}$). L'augmentation de LCS de 2% dans le groupe IRR n'est pas significative ($p = 0,11$). Néanmoins, le ratio SG, SB, LCS sur le volume cérébral total reste constant pour les deux groupes. Il vaut environ 67%, 30% et 3% respectivement.

Pour aller plus loin dans l'étude de volumétrie, nous avons ensuite étudié l'impact de l'irradiation *in utero* à plus petite échelle, en quantifiant le volume moyen et l'écart-type (SD) dans les différentes ROI étudiées pour les deux groupes (Figure 5.6). À l'exception du cervelet (cervelet (Cer)), toutes les ROI présentent un volume significativement réduit chez le groupe IRR par rapport au groupe Sham. Pour la ROI mésencéphale (mésencéphale (MB)), la variation est moindre ($< 4\%$), mais reste tout de même significative ($p = 9,2 \times 10^{-3}$). La diminution de volume des 8 autres régions investiguées est très significative ($p < 0,005$) et s'élève de -8% dans l'hypothalamus (hypothalamus (Htl)) à -27 % dans le corps calleux (Cc).

Sur la Figure 5.7, nous observons une diminution de volume plus importante dans le Cc que dans la SG. Il peut être également noté une variation volumétrique plus importante

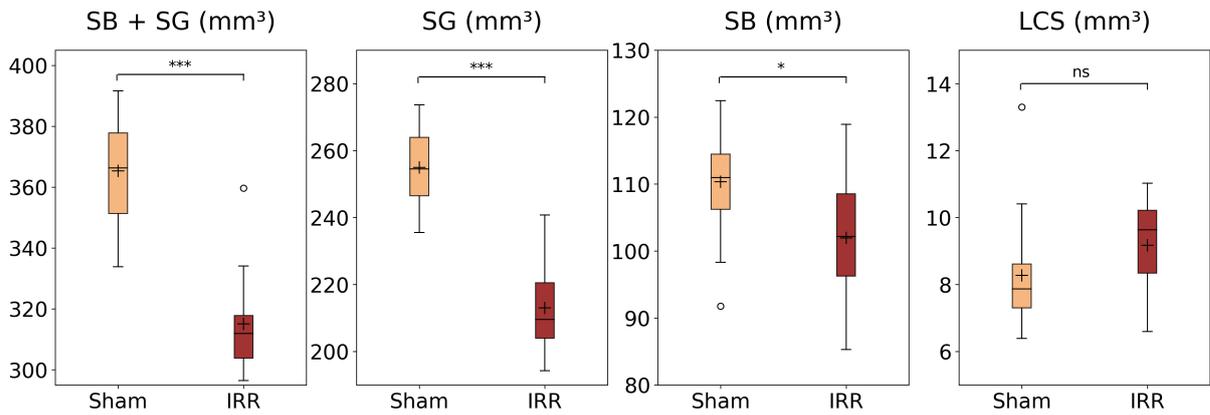


FIGURE 5.5 – L’irradiation *in utero* à forte dose provoque une atrophie cérébrale chez les animaux adultes. Volumes des différents compartiments cérébraux issus de la segmentation effectuée sur les images IRM anatomiques pour les groupes de souris irradiées (IRR) et non irradiées (Sham). La croix et la ligne symbolisent respectivement la moyenne et la médiane. La boîte s’étend du premier (Q1) au troisième (Q3) quartile et les extrémités des moustaches délimitent l’intervalle de confiance : $[Q1 - 1,5 \times IQR; Q3 + 1,5 \times IQR]$, avec IQR correspondant à l’intervalle interquartile. La significativité des résultats a été calculée avec un test de Student *** $p < 0,005$; * $p < 0,05$ et ns : non significatif.

dans la partie corticale (-21%, $p = 2,2 \times 10^{-10}$) que dans la partie sous-corticale (Hip : -18%, $p = 2,0 \times 10^{-9}$, Thal : -16 %, $p = 8,4 \times 10^{-8}$, Htl : -8%, $p = 9,4 \times 10^{-6}$) du cerveau.

5.2.4 Les atteintes microstructurelles radio-induites à l’âge adulte dans le modèle souris irradié au stade embryonnaire

5.2.5 Substance grise

La Figure 5.8 reporte les valeurs moyennes \pm écart-types (SD) des paramètres de diffusion tels que le coefficient de diffusion apparent (ADC_0), le coefficient de diffusion apparent calculé à partir de $b = 400$ et 2250 s/mm² (sADC) et le S-Index (SI) pour les groupes Sham et IRR dans les ROI qui appartiennent à la SG. Dans ces régions, nous avons tout d’abord mis en évidence que les paramètres ADC_0 et sADC ont tendance à augmenter chez les souris IRR par rapport aux souris Sham, alors que le paramètre SI a tendance à diminuer. Pour l’ ADC_0 , cette tendance est significative dans l’Hip (+1,7 %, $p = 3,0 \times 10^{-2}$), le Thal (+2,5 %, $p = 5,2 \times 10^{-3}$) et l’Htl (+3,5%, $p = 2,9 \times 10^{-3}$). De même l’augmentation de sADC chez les souris IRR est statistiquement significative dans le Thal (+2,1 %, $p = 6,3 \times 10^{-3}$) et l’Htl (+2,9%, $p = 7,0 \times 10^{-4}$). Cette augmentation s’accompagne d’une diminution de la valeur de SI significative dans le Thal (-13,3%, $p = 5,4 \times 10^{-3}$) et l’Htl (-16,1%, $p = 5,7 \times 10^{-4}$).

Le kurtosis (K) et les paramètres IVIM (f_{IVIM} et D^*) ne présentent pas de variations significatives entre les deux groupes (Table 5.1).

Parmi les trois paramètres de diffusion présentant des variations significatives, celles

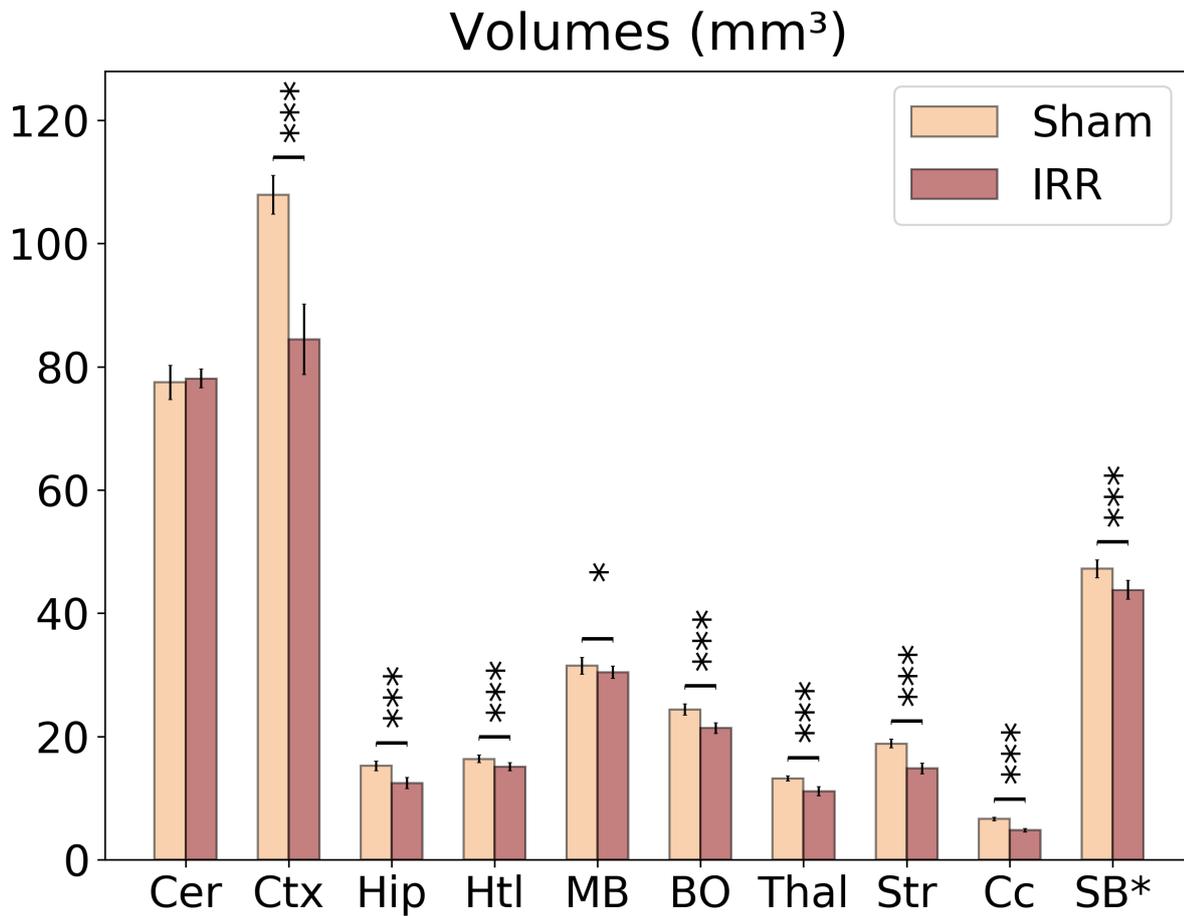


FIGURE 5.6 – L’irradiation *in utero* a pour conséquence une atrophie des différentes structures cérébrales chez la souris adulte. Moyenne \pm SD des volumes des différentes ROI pour les groupes de souris irradiées (IRR, marron) et non irradiées (Sham, beige). Différentes structures cérébrales ont été étudiées : cervelet (Cer), cortex (Ctx), hippocampe (Hip), hypothalamus (Htl), mésencéphale (MB), bulbe olfactif (BO), thalamus (Thal), striatum (Str), corps calleux (Cc) et zones de substance blanche (Cc exclu, SB*). La significativité des résultats a été calculée avec un test de Student *** $p < 0,005$; * $p < 0,05$.

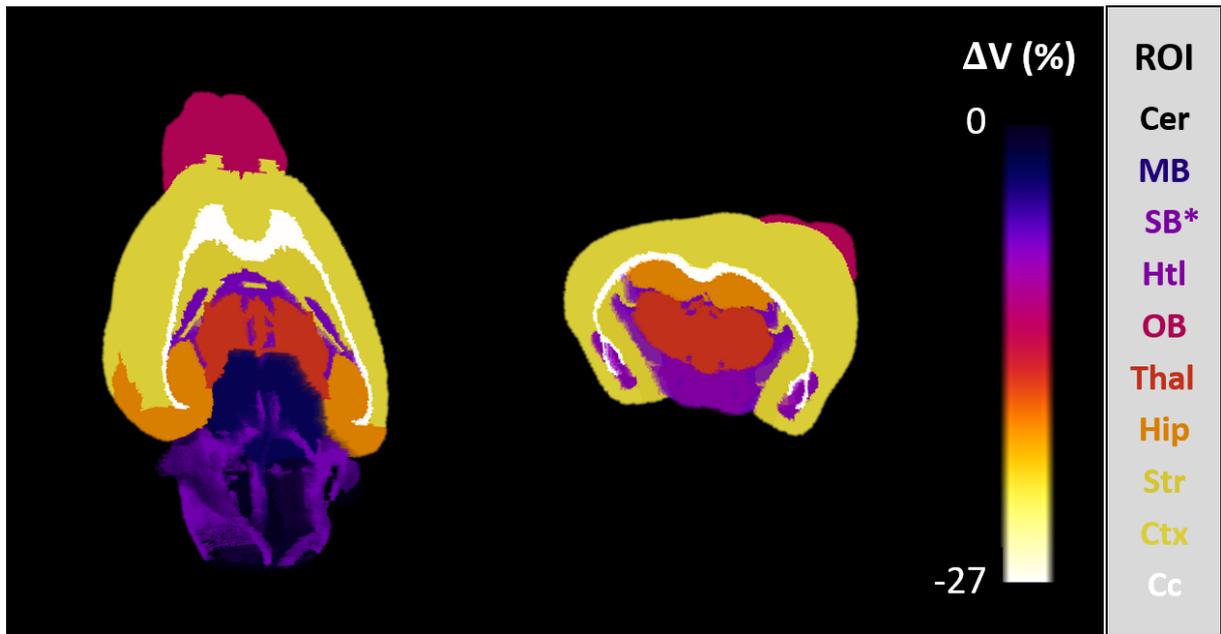


FIGURE 5.7 – Représentations 3D des variations volumétriques des différentes structures cérébrales étudiées. Variations relatives du volume ΔV projetées sur une coupe coronale et axiale du template souris TMBTA. Cette représentation prend en compte toutes les variations, même celles qui ne sont pas significatives. Dans l'encadré grisé, les ROI sont classées de la plus radiosensible à la moins radiosensible (de bas en haut).

ROI	K			f_{IVIM} (%)			D^* ($10^{-3}\text{mm}^2/\text{s}$)		
	Sham	IRR	p	Sham	IRR	p	Sham	IRR	p
Cer	0,77±0,03	0,74±0,07	0,30	3,0±0,6	3,3±0,2	0,70	7,7±2,6	11,0±13,2	0,54
Ctx	0,53±0,01	0,53±0,01	0,32	2,0±0,2	1,8±0,2	0,09	16,1±3,1	18,6±14,1	0,67
Hip	0,58±0,03	0,59±0,03	0,33	1,7±0,4	1,7±0,4	0,92	7,7±0,7	8,1±1,4	0,52
Htl	0,68±0,03	0,68±0,04	0,96	3,4±0,6	2,8±0,3	0,32	7,0±1,1	13,7±16,2	0,31
MB	0,71±0,02	0,72±0,03	0,55	3,6±0,4	3,5±0,8	0,96	9,0±1,0	8,7±2,3	0,75
BO	0,70±0,01	0,70±0,01	0,66	2,7±0,3	2,8±0,5	0,86	8,8±1,0	8,5±1,8	0,71
Thal	0,66±0,03	0,66±0,03	0,93	2,5±0,3	2,3±0,5	0,41	10,7±2,4	19,7±16,8	0,21
Str	0,61±0,02	0,59±0,02	0,12	2,6±0,3	2,0±0,6	0,37	15,1±7,6	20,0 ± 14,4	0,42
ZSV	0,62±0,03	0,60±0,06	0,40	3,7±0,9	3,1±1,1	0,27	9,1±2,6	12,2±4,7	0,14

TABLE 5.1 – L'irradiation *in utero* à forte dose ne modifie pas le kurtosis et les paramètres IVIM dans les structures cérébrales composées de substance grise chez la souris adulte. Moyenne \pm SD et valeur de significativité statistique (p) pour les paramètres de diffusion (K, f_{IVIM} et D^*) calculés dans les ROI de la SG pour les groupes Sham et IRR.

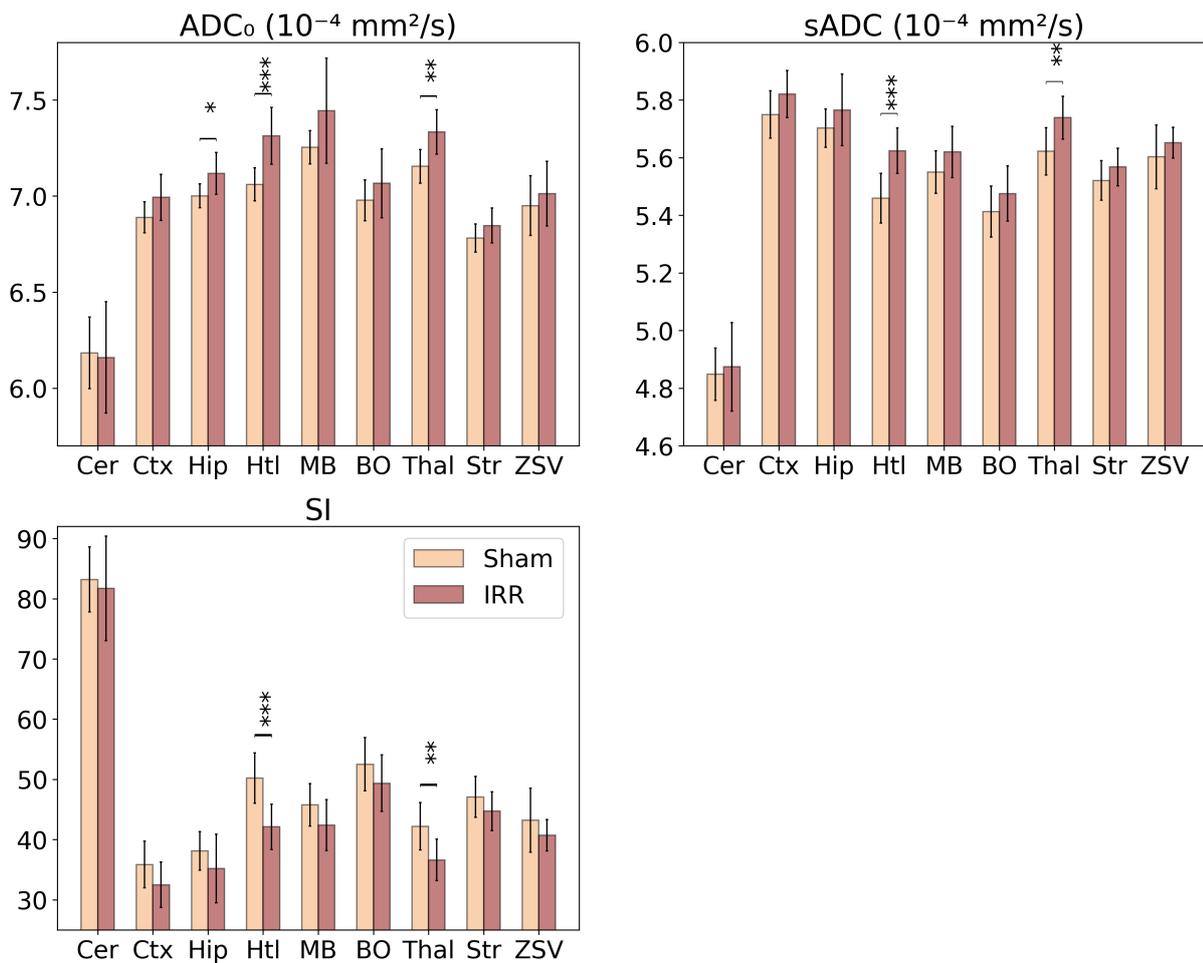


FIGURE 5.8 – Les conséquences à long terme de l’irradiation *in utero* à forte dose tendent à des modifications microstructurelles, détectables par IRM de diffusion. Moyenne \pm SD des paramètres de diffusion (ADC₀, sADC et SI) pour le groupe Sham (beige) et IRR (marron) dans les ROI de la SG. La significativité des résultats a été calculée avec un test de Student *** $p < 0,005$; ** $p < 0,01$; $p < 0,05$.

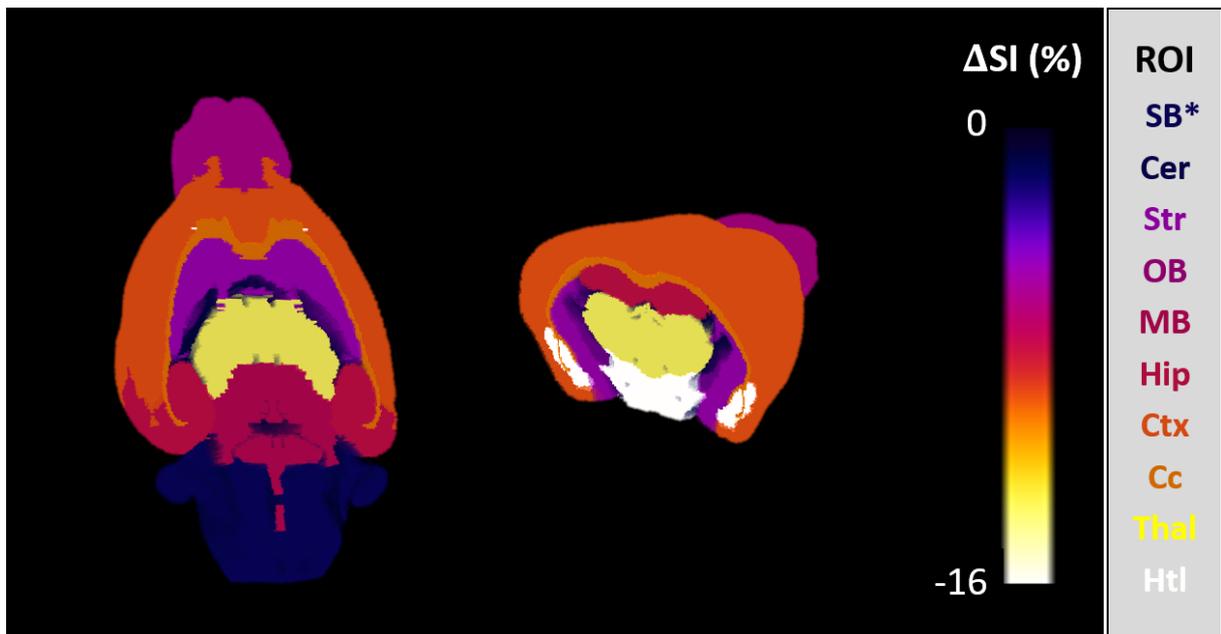


FIGURE 5.9 – Variations relatives du S-Index (ΔSI) projetées sur une coupe coronale et axiale du template souris TMBTA. Cette représentation prend en compte toutes les variations, même celles qui ne sont pas significatives. Pour les ROI de la SB, la valeur de SI correspond en réalité à la valeur de S3 calculée dans la section suivante. Dans l'encadré grisé, les ROI sont classées de la plus radiosensible à la moins radiosensible (de bas en haut).

du S-Index (notées ΔSI) sont les plus importantes. Ces résultats sont présentés dans la Figure 5.9 correspondant à la projection des valeurs de ΔSI sur le template souris TMBTA.

5.2.6 Substance blanche

Parmi les 11 ROI qui ont été définies, deux appartiennent à la SB (Cc et SB*). Pour ces deux régions, la Figure 5.10 illustre les valeurs moyennes et les écart-types des paramètres de diffusion estimés à partir des modèles anisotropes (tenseur de diffusion et SI anisotrope) pour les groupes Sham et IRR : S3 le S-Index anisotrope de la SB, sFA la fraction d'anisotropie, sMD la diffusivité moyenne, sRD la diffusivité radiale et sAD la diffusivité axiale.

Dans le Cc, les souris IRR présentent une valeur de sMD et de sRD plus élevée que les souris Sham. Seule la variation de sRD est significative (+8%, $p = 3,9 \times 10^{-5}$). Cette augmentation s'accompagne d'une diminution significative des valeurs moyennes de sFA et de sAD : -5% ($p = 2,3 \times 10^{-4}$) et -11% ($p = 8,7 \times 10^{-3}$) respectivement. À partir du modèle SI anisotrope, une diminution largement significative de SI est observée dans le Cc (-10%, $p = 2,3 \times 10^{-4}$).

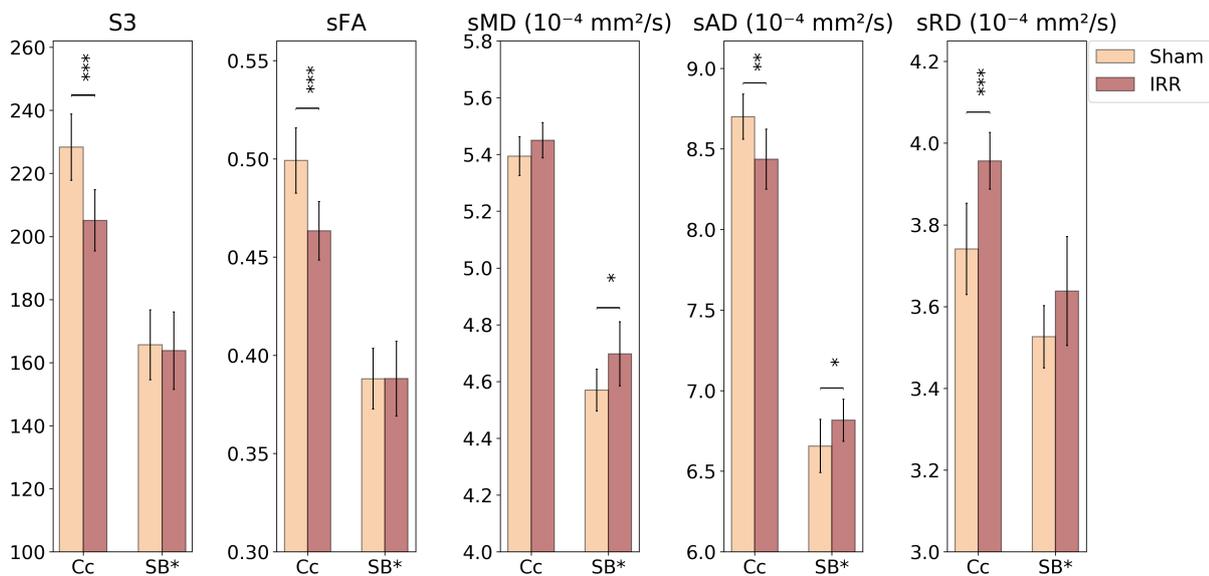


FIGURE 5.10 – Les conséquences à long terme de l’irradiation *in utero* à forte dose affecte la substance blanche des souris adultes, identifiables par IRM de diffusion (modèles DTI et SI anisotrope). Moyenne \pm SD des paramètres de diffusion (S3, sFA, sAD, sRD et sMD) pour les groupes Sham (beige) et IRR (marron) dans le corps calleux (Cc) et l’ensemble des autres zones de SB, Cc exclu (SB*). La significativité des résultats a été calculée avec un test de Student *** $p < 0,005$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Pour la deuxième région SB*, seuls les paramètres sMD et sAD présentent des variations positives et significatives, mais d’amplitude plus faible : +3% ($p = 2,4 \times 10^{-2}$) pour sMD et +2% ($p = 2,8 \times 10^{-2}$) pour sAD.

5.2.7 Atteintes structurelles radio-induites observées *ex vivo* par histologie

Des analyses histologiques sur des souris IRR ($N_{IRR} = 4$) et Sham ($N_{Sham} = 6$), autres que celles qui ont servi aux études IRM et aux tests comportementaux, ont été menées au Laboratoire de RadioPathologie (LRP, CEA, Fontenay-aux-Roses). Les protocoles de fixation, de marquage histologique des noyaux cellulaires, d’imagerie par microscopie et d’analyses statistiques sont présentés en annexe D.

Les aires des différentes structures cérébrales mesurées sur les coupes sagittales des cerveaux (Figure 5.11) ont tendance à diminuer chez le groupe IRR par rapport au groupe Sham dans le BO, le cortex (Ctx), l’Hip et le Cc. Au contraire, l’aire des régions du Thal, MB, et Cer ont tendance à augmenter alors que celle de l’Htl ne semble pas varier entre les deux groupes (Figure 5.11, A).

D’autre part, les densités cellulaires ont été estimées par le dénombrement du nombre de noyaux marqués au DAPI dans des zones représentatives du Ctx, de l’Hip, du Cc et du Thal (voir annexe D). La Figure 5.11 (B) indique une tendance à la baisse non significative dans le Cc et le Ctx alors que l’Hip et le Thal présentent une tendance à l’augmentation de la densité cellulaire pour les souris IRR par rapport aux souris Sham.

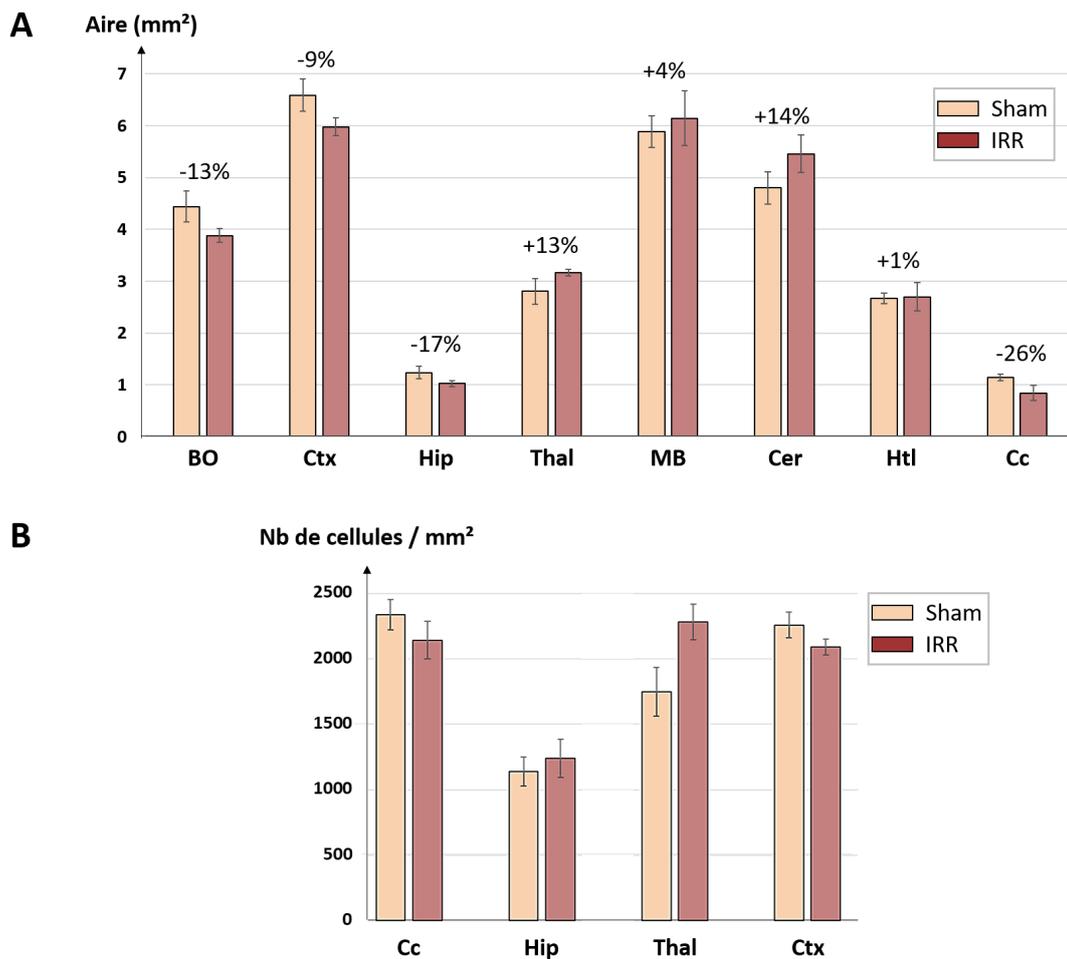


FIGURE 5.11 – Les analyses de densité cellulaire montrent que l'irradiation *in utero* a tendance à réduire le volume de différentes structures cérébrales chez la souris adulte. (A) Moyenne \pm SEM de l'aire (mm²) des ROI chez les souris IRR (marron) et Sham (beige). (B) Moyenne \pm SEM de la densité cellulaire (cellules marquées au DAPI / mm²) chez les souris IRR (marron) et Sham (beige).

5.3 Discussion

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence les effets à long terme de l'irradiation *in utero* sur plusieurs structures cérébrales dans un modèle de souris. Les cartes 3D de radiosensibilité ont été calculées (Figures 5.7 et 5.9), laissant suggérer le S-Index comme un potentiel biomarqueur non invasif de dommages cérébraux radio-induits par rapport aux paramètres IRM classiques dérivés de l'imagerie anatomique ou pondérée en diffusion.

L'apoptose radio-induite à court terme

La caspase 3 est une protéase, qui lorsqu'elle est clivée/activée initie l'apoptose. L'augmentation du nombre de cellules marquées à la caspase 3 clivée (CC3) justifie alors une augmentation de l'apoptose chez les embryons (E14,5), et ce dès 4h après irradiation avec une dose de 1 Gy. Une étude de Verreet et al. (2016b) a sondé l'apoptose chez les embryons par des études menées jusqu'à 24h après irradiation, majoritairement dans les zones ventriculaire, sous-ventriculaire, intermédiaire et dans la plaque corticale. Une étude dynamique a notamment montré que le pic d'apoptose se produisait 4h post-irradiation avec un taux d'apoptose plus conséquent dans les zones ventriculaires que dans la zone intermédiaire et la plaque corticale (Roque et al., 2012). Néanmoins, 24h post-irradiation le pic d'apoptose est atteint dans le télencéphale (Etienne et al., 2012; Roque et al., 2012) tandis qu'il est toujours possible de détecter un taux d'apoptose dans la région entourant les ventricules chez les embryons irradiés par rapport aux embryons non irradiés (Verreet et al., 2015).

L'absence d'altérations comportementales observée 3 mois post-irradiation

Comme dans notre modèle, d'autres études ont également quantifié la baisse de poids entre les souris IRR et Sham. Pour des souris irradiées *in utero* à 1 Gy, une diminution de 10 % du poids total des souris âgées de 50 jours a été mesurée (Verreet et al., 2016a). Ce résultat est en accord avec la perte de poids de 9% que nous avons identifié entre les groupes IRR et Sham chez des souris âgées d'environ 70 jours.

D'autre part, l'activité locomotrice ainsi que l'exploration d'un nouvel environnement ont été investiguées chez des souris Sham et IRR âgées de 3 mois, autres que celles utilisées pour les acquisitions IRM. Le test de l'OF a mis en évidence l'absence de troubles moteurs chez les souris adultes ayant subi une irradiation au stade embryonnaire. Le temps passé au centre de l'OF ne semble pas indiquer de comportement plus anxieux pour les souris IRR par rapport aux Sham. D'autres études ont également observé l'absence de troubles de la locomotion chez des souris âgées d'environ 2 mois et irradiées *in utero* (E11) (Verreet et al., 2016a). Les interactions sociales furent explorées à l'aide du "Three-chamber test for sociability and recognition". Il s'avère que les souris Sham présentent une préférence

vis-à-vis de leurs congénères (souris 1 par rapport au légo) ainsi qu'une préférence pour les nouvelles interactions sociales (souris 2 par rapport à la souris 1). Ce comportement ne se retrouve pas chez les souris IRR, lesquelles semblent présenter des déficits de socialisation. L'absence de préférence entre les souris 1 et 2 a également été retrouvée dans l'étude de Verreet et al. (2016a) qui décrit un profond trouble de la mémoire sociale et de la socialisation chez des souris irradiées à 1 Gy *in utero*.

Les altérations anatomiques détectées *in vivo* en 3D par IRM et par histologie en 2D.

Le modèle d'irradiation souris utilisé dans cette étude présente des altérations cérébrales visibles à la fois en IRM anatomique et en IRM de diffusion. La combinaison de ces deux approches a permis d'établir des cartes de radiosensibilité au niveau structurel (volumétrie) et également microstructurel (SI).

Des études précédentes ont également observé une microcéphalie chez leurs modèles animaux après une irradiation chez la souris adulte (Gupta et al., 2017; Trivedi et al., 2012; Pérès et al., 2018). De plus, nos résultats sont en accord avec plusieurs études ayant mis en évidence une diminution du volume cérébral global à la suite d'une exposition aux RI *in utero* (Verreet et al., 2016a; Saito et al., 2015) ou postnatale (Pérès et al., 2018; Gazdzinski et al., 2012; Panagiotakos et al., 2007).

De même, certaines études ont opté pour une analyse par ROI (Nieman et al., 2015; Gazdzinski et al., 2012; Panagiotakos et al., 2007) et ont observé une tendance décroissante pour les volumes des régions comme la SB, l'Hip ou le BO après irradiation. En particulier, Verreet et al. (2016a) ont mis en évidence une diminution de volume variant de 15 à 30 % dans 19 régions du cerveau segmentées de façon semi-automatique par un recalage sur le template NUS du cerveau de souris et son atlas (Bai et al., 2012). Les 10 régions de notre étude, également segmentées de façon semi-automatique, sont incluses dans ces 19 régions. Les résultats de l'étude de (Verreet et al., 2016a) renforcent donc les résultats volumétriques à l'échelle des ROI que nous avons observés dans notre modèle souris d'irradiation. De plus, l'irradiation n'étant pas focalisée, nous considérons que l'effet de l'irradiation est homogène suivant l'axe de la coupe histologique, suivant l'axe gauche-droite. Nous faisons alors l'hypothèse que la variation de surface reflète la diminution de volume. L'analyse histologique confirme donc de façon qualitative cette diminution de volume pour le BO, le Ctx, l'Hip et le Cc dans lesquelles nous avons observé une diminution de surface. Le nombre de cerveaux analysés ne permet pas de confirmer significativement cette tendance. Cependant, les régions du Thal, MB, Cer et Htl présentent une aire plus importante chez les IRR que chez les Sham, ce qui contredit nos observations IRM. Les différences observées entre les résultats histologiques et IRM peuvent être le fruit d'un biais méthodologique puisque les régions ne sont pas définies de la même façon pour les deux modalités (Figure 5.12). Par exemple pour le calcul de volume en IRM, le MB ne comprend pas le Pons (numéro 1), le Ctx comprend le noyau olfactif antérieur (numéro

4) et l'Htl comprend le cerveau antérieur basal (numéro 2) alors que pour le calcul d'aire les régions 1 à 5 n'ont pas été incluses dans l'analyse histologique. D'autre part, les tissus peuvent être déformés lors de la préparation des coupes et le volume des ventricules n'est pas similaire *in vivo* et *ex vivo*.

Les variations de volume observées à l'échelle du cerveau entier, de la SG, de la SB ou des ROI ne peuvent s'expliquer uniquement par le poids plus faible des souris IRR. Une variation de poids corporel de 9 % ne peut, en effet, expliquer à elle-seule la diminution de volume cérébral total de 14% ou des ROI. À l'exception du Cer, du MB, de la SB* et de l'Htl, toutes les ROI présentent une variation de volume supérieure à 10 % chez les souris IRR.

Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de diminution significative pour le volume du LCS entre les deux groupes d'animaux. Toutefois, d'autres études avaient montré une dilatation ventriculaire après irradiation cérébrale. Cette contradiction peut s'expliquer par des expositions aux RI différents en termes de source (Saito et al., 2015), d'âge d'exposition ou d'âge d'observation des conséquences de l'irradiation. L'exclusion d'une souris Sham présentant une hydrocéphalie est justifiée sur la base du volume de LCS puisque nous avons déterminé que le volume de LCS de cette souris ($14,2 \text{ mm}^3$) se situait à plus de 3 fois la valeur de l'écart-type du volume moyen de LCS de ce groupe ($8,3 \pm 1,6 \text{ mm}^3$).

Les altérations microstructurelles détectées *in vivo* par IRM de diffusion et relations avec la densité cellulaire estimée en histologie

L'IRM de diffusion est une technique d'imagerie très sensible aux modifications microstructurelles d'un tissu. Ainsi, dans notre étude, cette approche d'imagerie nous a permis d'évaluer à partir de paramètres de diffusion quantitatifs des variations de comportement tissulaire entre les souris irradiées et non irradiées. À long terme, plusieurs études ont démontré que les paramètres comme la FA, MD ou RD sont sensibles dans différentes conditions d'irradiation. De façon générale, la FA a tendance à diminuer (Verreet et al., 2015; Constanzo et al., 2018; Chan et al., 2009; Peißner et al., 1999; Watve et al., 2018; Kumar et al., 2013; Gupta et al., 2013) tandis que la MD et la RD ont tendance à augmenter chez les souris irradiées par rapport aux animaux non irradiés (Constanzo et al., 2018; Watve et al., 2018; Kumar et al., 2013). Les mêmes variations ont été observées dans notre modèle animal avec les paramètres sFA, sMD et sRD dans la SB. En revanche, l'estimation de sFA, sAD et sRD, tout comme FA, AD et RD, peut être controversée puisque le bruit peut contribuer à la variation artificielle de ces paramètres. Alors que les valeurs de sFA, sAD et sRD sont robustes dans le Cc, le niveau de bruit dans la région de la SB* ne permet pas de conclure même si les variations sont significatives. Nous préférons alors retenir que les résultats obtenus dans le Cc. Ces tendances sont néanmoins inversées lorsque les effets sont observés dans les phases précoces de l'irradiation (effets à court terme) (Trivedi et al., 2012; Gupta et al., 2017; Kumar et al., 2013; Gupta et al., 2013).

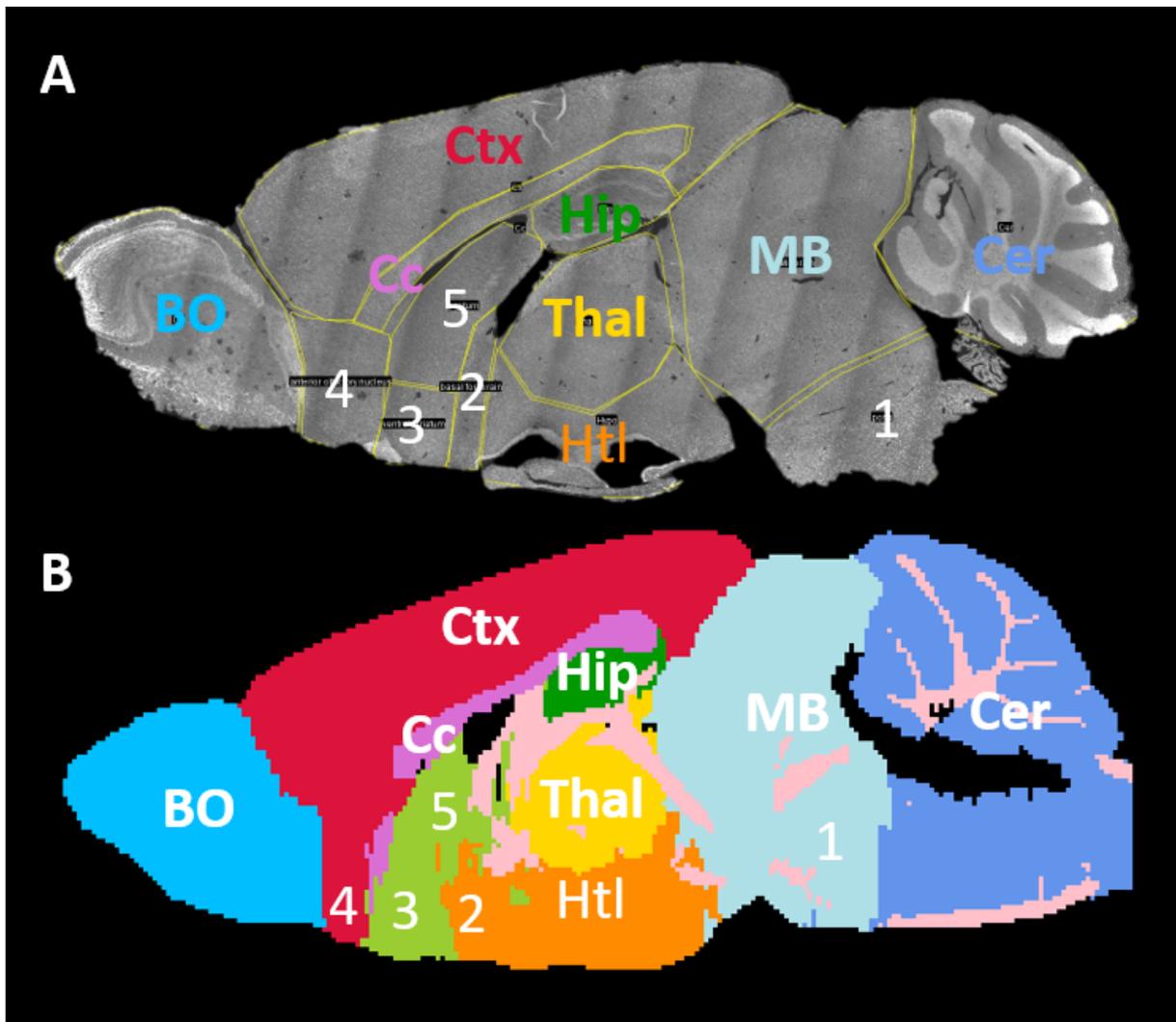


FIGURE 5.12 – Comparaison des parcellisations cérébrales utilisées pour le calcul d’aire ou de volumes des différentes structures cérébrales. (A) Coupe sagittale chez une souris Sham dont les noyaux des cellules sont marqués au DAPI (gris). Le nom des ROI considérées pour le calcul d’aire est indiqué en couleur. Les nombres blancs (1 à 5) correspondent aux régions cérébrales pour lesquelles le calcul d’aire n’a pas été effectué. (B) Parcellisation d’une coupe sagittale chez une souris Sham. Le nom des ROI est indiqué en blanc. Les numéros correspondent aux régions qui ne sont pas prises en compte pour le calcul d’aire.

Certaines études ont établi une corrélation entre les variations des paramètres estimés avec le modèle d'imagerie du tenseur de diffusion (DTI) et les informations microstructurales observées par immuno histologie. Par exemple, l'augmentation des valeurs de MD, AD ou RD peut s'expliquer par l'activation astrocytaire après irradiation (Constanzo et al., 2018; Xie et al., 2010). La variation du paramètre MD entre les souris irradiées et non irradiées peut quant à elle renseigner sur la nature d'un œdème : vasogénique (augmentation) ou cytotoxique (diminution) (Soni et al., 2019). La diminution de la FA à court terme après l'irradiation a précédemment été corrélée avec la prolifération des macrophages et de la microglie (Trivedi et al., 2012) alors qu'à long terme, la réduction de FA traduit plutôt la démyélinisation de la SB (Gazdzinski et al., 2012). Les paramètres AD et RD sont quant à eux sensibles aux dommages axonaux et de la myéline respectivement (Gupta et al., 2013).

Le SI est également un paramètre qui a déjà été utilisé pour caractériser à long terme les effets radio-induits sur le cerveau à long terme après une irradiation globale du cerveau, à forte dose (15 Gy) chez des souris adultes. Dans ce modèle animal d'irradiation, la diminution du SI dans le BO a été corrélée à une diminution de la neurogenèse et de la densité cellulaire, et ce dès trois mois jusqu'à 8 mois après irradiation (Pères et al., 2018). De la même façon, notre étude présente une diminution de ce paramètre dans différentes régions de la SG et SB.

La densité cellulaire a été estimée par histologie à l'aide d'un marquage au DAPI dans le Ctx, Cc, Hip et Thal. Comme pour l'estimation des surfaces des régions cérébrales, la densité cellulaire apparaît diminuer dans le Cc et le Ctx alors qu'elle semble être augmentée dans l'Hip et le Thal. La diminution de surface dans le Cc et Ctx serait, par conséquent, due à une diminution de densité cellulaire. Nous pouvons supposer une démyélinisation du Cc avec une diminution de la densité axonale. En revanche, une augmentation de la densité cellulaire peut s'expliquer par le protocole de fixation qui par l'élimination du milieu interstitiel augmente "artificiellement" le nombre de cellules par unité de surface. Cette augmentation serait notamment visible lorsque le volume de milieu interstitiel est augmenté ou en présence d'un œdème. Parallèlement, le paramètre SI est diminué dans toutes les ROI étudiées (et de façon significative pour le Thal, l'Htl et le Cc) chez les souris IRR par comparaison aux souris Sham. Le SI serait un marqueur de raréfaction cellulaire (comme dans le cas du Ctx et du Cc) ou alors d'augmentation du milieu interstitiel, voire d'œdème (comme pour le Thal et l'Htl).

Nous pouvons également mettre en relation les résultats de volumétrie obtenus à l'âge adulte avec les résultats d'apoptose obtenus 4h post-irradiation. En effet, une apoptose massive à E14,5 pourrait être à l'origine d'une diminution de densité cellulaire, entraînant alors une diminution du volume cérébral global.

Limites de l'étude

Des améliorations méthodologiques peuvent être apportées à notre étude de façon à augmenter la sensibilité de notre approche d'imagerie aux différentes conditions d'irradiation. En ce qui concerne la volumétrie, l'augmentation de la résolution spatiale permettrait d'obtenir des ROI plus petites et plus robustes, cela permettrait de mieux localiser les effets de l'irradiation cérébrale. Par ailleurs, l'acquisition *ex vivo* haute résolution de souris Sham et IRR pourrait notamment améliorer le masque de SB et de SB*. En effet, jusqu'ici la somme des masques Cc et SB* n'est pas égale au masque de la SB du fait du masque de SB trop étendu et à l'inverse du masque SB* trop restreint. Avec cette nouvelle alternative, les masques des autres ROI seraient encore mieux définis, en éliminant plus efficacement la composante de la SB dans les masques des ROI appartenant à la SG.

L'estimation des paramètres de diffusion, peut-elle aussi, être améliorée en corrigeant notamment les distorsions présentes sur les images IRM pondérées en diffusion. Une méthode appelée "top-up" et implémentée sur FSL permet de réduire ces distorsions (Andersson et al., 2003). À l'aide d'une acquisition supplémentaire avec un encodage de phase inverse, les distorsions s'inversent et il est possible de calculer une matrice de correction qui peut être ensuite appliquée à toutes les images IRM pondérées en diffusion.

La corrélation entre les études comportementales, histologiques et IRM ne peut être établie que de façon qualitative puisque nous avons utilisé des souris différentes pour chaque approche méthodologique. Il serait également pertinent d'employer d'autres tests comportementaux (par exemple, "Morris Water Maze"), notamment pour évaluer la présence ou non d'atteintes mnésiques (mémoire et apprentissage) à long terme après une irradiation *in utero*, comme c'est le cas chez les patients irradiés (Soussain et al., 2009; Durand et al., 2015). Il serait également pertinent de réaliser d'autres études immuno-histologiques pour apporter des informations complémentaires, par exemple les effets de l'irradiation embryonnaire sur la neurogenèse, l'inflammation, la vascularisation et la substance blanche.

5.4 Conclusion

En conclusion, cette étude préclinique caractérise les effets à long terme de l'irradiation *in utero* chez la souris. L'atrophie cérébrale chez les souris irradiées est associée à des variations significatives des paramètres de diffusion. Une diminution de la densité cellulaire dans la SG est suggérée par l'augmentation de la valeur du paramètre ADC_0 . Quant à la diminution du SI, elle laisse supposer soit une raréfaction cellulaire comme dans le Ctx, soit une augmentation du milieu interstitiel comme dans le Thal ou l'Htl. La variation des paramètres de diffusion estimés avec le modèle DTI (augmentation de sMD, sRD et diminution de sFA et sAD), tout comme le S3, laisse supposer des altérations des fibres de la SB, notamment dans le Cc.

Cette étude permet donc d'une part de valider ce modèle souris comme un modèle

d'irradiation forte dose sur le plan structurel et microstructurel du cerveau, mais pas sur le plan cognitif. D'autre part, cette étude valide notre approche non invasive par IRM (anatomique et de diffusion) et nos outils d'analyse semi-automatique pour la détection et la caractérisation des effets radio-induits. D'autres modèles souris seront donc investigués dans les chapitres suivants.

Bibliographie

Jesper L. R. Andersson, Stefan Skare, and John Ashburner. How to correct susceptibility distortions in spin-echo echo-planar images : application to diffusion tensor imaging. *Neuroimage*, 20(2) :870–888, October 2003. ISSN 1053-8119. doi : 10.1016/S1053-8119(03)00336-7.

Jordan Bai, Thi Lan Huong Trinh, Kai-Hsiang Chuang, and Anqi Qiu. Atlas-based automatic mouse brain image segmentation revisited : model complexity vs. image registration. *Magnetic Resonance Imaging*, 30(6) :789–798, July 2012. ISSN 0730-725X. doi : 10.1016/j.mri.2012.02.010. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0730725X12000513>.

Kevin C. Chan, Pek-Lan Khong, Matthew M. Cheung, Silun Wang, Ke-Xia Cai, and Ed X. Wu. MRI of late microstructural and metabolic alterations in radiation-induced brain injuries. *J Magn Reson Imaging*, 29(5) :1013–1020, May 2009. ISSN 1053-1807. doi : 10.1002/jmri.21736.

Julie Constanzo, Matthieu Dumont, Réjean Lebel, Luc Tremblay, Kevin Whittingstall, Laurence Masson-Côté, Sameh Geha, Philippe Sarret, Martin Lepage, Benoit Paquette, and Maxime Descoteaux. Diffusion MRI monitoring of specific structures in the irradiated rat brain. *Magnetic Resonance in Medicine*, 80(4) :1614–1625, October 2018. ISSN 0740-3194. doi : 10.1002/mrm.27112. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mrm.27112>.

Thomas Durand, Marie-Odile Bernier, Isabelle Léger, Hervé Taillia, Georges Noël, Dimitri Psimaras, and Damien Ricard. Cognitive outcome after radiotherapy in brain tumor. *Current Opinion in Oncology*, 27(6) :510, November 2015. ISSN 1040-8746. doi : 10.1097/CCO.0000000000000227. URL https://journals.lww.com/co-oncology/Abstract/2015/11000/Cognitive_outcome_after_radiotherapy_in_brain.13.aspx.

Olivier Etienne, Telma Roque, Celine Haton, and François D. Boussin. Variation of radiation-sensitivity of neural stem and progenitor cell populations within the developing mouse brain. *International Journal of Radiation Biology*, 88(10) :694–702, October 2012. ISSN 0955-3002, 1362-3095. doi : 10.3109/09553002.2012.710927. URL <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/09553002.2012.710927>.

- Lisa M. Gazdzinski, Kyle Cormier, Fred G. Lu, Jason P. Lerch, C. Shun Wong, and Brian J. Nieman. Radiation-induced alterations in mouse brain development characterized by magnetic resonance imaging. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 84(5) : e631–638, December 2012. ISSN 1879-355X. doi : 10.1016/j.ijrobp.2012.06.053.
- Mamta Gupta, Poonam Rana, Richa Trivedi, B. S. Hemanth Kumar, Ahmad Raza Khan, Ravi Soni, R. K. S. Rathore, and Subash Khushu. Comparative evaluation of brain neurometabolites and DTI indices following whole body and cranial irradiation : a magnetic resonance imaging and spectroscopy study. *NMR Biomed*, 26(12) :1733–1741, December 2013. ISSN 1099-1492. doi : 10.1002/nbm.3010.
- Mamta Gupta, Sushanta Kumar Mishra, B. S. Hemanth Kumar, Subash Khushu, and Poonam Rana. Early detection of whole body radiation induced microstructural and neuroinflammatory changes in hippocampus : A diffusion tensor imaging and gene expression study. *Journal of Neuroscience Research*, 95(4) :1067–1078, 2017. ISSN 1097-4547. doi : 10.1002/jnr.23833. URL <https://wol-prod-cdn.literatumonline.com/doi/abs/10.1002/jnr.23833>.
- A. Holmes, C. C. Wrenn, A. P. Harris, K. E. Thayer, and J. N. Crawley. Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes, Brain and Behavior*, 1(1) :55–69, 2002. ISSN 1601-183X. doi : 10.1046/j.1601-1848.2001.00005.x. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1601-1848.2001.00005.x>.
- Mayank Kumar, Seenu Haridas, Richa Trivedi, Subhash Khushu, and Kailash Manda. Early cognitive changes due to whole body γ -irradiation : a behavioral and diffusion tensor imaging study in mice. *Exp. Neurol.*, 248 :360–368, October 2013. ISSN 1090-2430. doi : 10.1016/j.expneurol.2013.06.005.
- Brian J. Nieman, A. Elizabeth de Guzman, Lisa M. Gazdzinski, Jason P. Lerch, M. Mallar Chakravarty, Jon Pipitone, Douglas Strother, Chris Fryer, Eric Bouffet, Suzanne Laughlin, Normand Laperriere, Lily Riggs, Jovanka Skocic, and Donald J. Mabbott. White and Gray Matter Abnormalities After Cranial Radiation in Children and Mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 93(4) :882–891, November 2015. ISSN 1879-355X. doi : 10.1016/j.ijrobp.2015.07.2293.
- Georgia Panagiotakos, George Alshamy, Bill Chan, Rory Abrams, Edward Greenberg, Amit Saxena, Michelle Bradbury, Mark Edgar, Philip Gutin, and Viviane Tabar. Long-Term Impact of Radiation on the Stem Cell and Oligodendrocyte Precursors in the Brain. *PLoS One*, 2(7), July 2007. ISSN 1932-6203. doi : 10.1371/journal.pone.0000588. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1913551/>.
- Wolfgang Peißner, Martin Kocher, Harald Treuer, and Frank Gillardon. Ionizing radiation-induced apoptosis of proliferating stem cells in the dentate gyrus of the adult rat hip-

- pocampus. *Molecular Brain Research*, 71(1) :61–68, July 1999. ISSN 0169-328X. doi : 10.1016/S0169-328X(99)00170-9. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169328X99001709>.
- Elodie Anne Pérès, Olivier Etienne, Antoine Grigis, Fawzi Boumezbeur, François Dominique Boussin, and Denis Le Bihan. Longitudinal Study of Irradiation-Induced Brain Microstructural Alterations With S-Index, a Diffusion MRI Biomarker, and MR Spectroscopy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 102(4) :1244–1254, 2018. ISSN 1879-355X. doi : 10.1016/j.ijrobp.2018.01.070.
- Telma Roque, Céline Haton, Olivier Etienne, Alexandra Chicheportiche, Laure Rousseau, Ludovic Martin, Marc-André Mouthon, and François D. Boussin. Lack of a p21waf1/cip-Dependent G1/S Checkpoint in Neural Stem and Progenitor Cells After DNA Damage In Vivo. *STEM CELLS*, 30(3) :537–547, March 2012. ISSN 1066-5099. doi : 10.1002/stem.1010. URL <https://stemcellsjournalsonline.wiley.com/doi/10.1002/stem.1010>.
- Shigeyoshi Saito, Kazuhiko Sawada, Yuki Mori, Yoshichika Yoshioka, and Kenya Murase. Brain and arterial abnormalities following prenatal X-ray irradiation in mice assessed by magnetic resonance imaging and angiography. *Congenit Anom (Kyoto)*, 55(2) : 103–106, May 2015. ISSN 1741-4520. doi : 10.1111/cga.12101.
- Jill L. Silverman, Mu Yang, Catherine Lord, and Jacqueline N. Crawley. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat Rev Neurosci*, 11(7) :490–502, July 2010. ISSN 1471-0048. doi : 10.1038/nrn2851. URL <https://www.nature.com/articles/nrn2851>.
- Neha Soni, Abdalla Z. Mohamed, Nyoman D. Kurniawan, Karin Borges, and Fatima Nasrallah. Diffusion Magnetic Resonance Imaging Unveils the Spatiotemporal Microstructural Gray Matter Changes following Injury in the Rodent Brain. *Journal of Neurotrauma*, 36(8) :1306–1317, April 2019. ISSN 0897-7151, 1557-9042. doi : 10.1089/neu.2018.5972. URL <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/neu.2018.5972>.
- Carole Soussain, Damien Ricard, John R. Fike, Jean-Jacques Mazon, Dimitri Psimaras, and Jean-Yves Delattre. CNS complications of radiotherapy and chemotherapy. *The lancet*, 374(9701) :1639–1651, 2009.
- Richa Trivedi, Ahmad Raza Khan, Poonam Rana, Seenu Haridas, B. S. Hemanth Kumar, Kailash Manda, Ram K. S. Rathore, Rajendra P. Tripathi, and Subash Khushu. Radiation-induced early changes in the brain and behavior : serial diffusion tensor imaging and behavioral evaluation after graded doses of radiation. *J. Neurosci. Res.*, 90(10) :2009–2019, October 2012. ISSN 1097-4547. doi : 10.1002/jnr.23073.
- Tine Verreet, Roel Quintens, Debby Van Dam, Mieke Verslegers, Mirella Tanori, Arianna Casciati, Mieke Neefs, Liselotte Leysen, Arlette Michaux, Ann Janssen, Emiliano

D'Agostino, Greetje Vande Velde, Sarah Baatout, Lieve Moons, Simonetta Pazzaglia, Anna Saran, Uwe Himmelreich, Peter Paul De Deyn, and Mohammed Abderrafi Benotmane. A multidisciplinary approach unravels early and persistent effects of X-ray exposure at the onset of prenatal neurogenesis. *J Neurodev Disord*, 7(1), 2015. ISSN 1866-1947. doi : 10.1186/1866-1955-7-3. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4448911/>.

Tine Verreet, Janaki Raman Rangarajan, Roel Quintens, Mieke Verslegers, Adrian C. Lo, Kristof Govaerts, Mieke Neefs, Liselotte Leysen, Sarah Baatout, Frederik Maes, Uwe Himmelreich, Rudi D'Hooge, Lieve Moons, and Mohammed A. Benotmane. Persistent Impact of In utero Irradiation on Mouse Brain Structure and Function Characterized by MR Imaging and Behavioral Analysis. *Front Behav Neurosci*, 10 :83, 2016a. ISSN 1662-5153. doi : 10.3389/fnbeh.2016.00083.

Tine Verreet, Mieke Verslegers, Roel Quintens, Sarah Baatout, and Mohammed A. Benotmane. Current Evidence for Developmental, Structural, and Functional Brain Defects following Prenatal Radiation Exposure. *Neural Plast*, 2016, 2016b. ISSN 2090-5904. doi : 10.1155/2016/1243527. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4921147/>.

Apurva Watve, Mamta Gupta, Subash Khushu, and Poonam Rana. Longitudinal changes in gray matter regions after cranial radiation and comparative analysis with whole body radiation : a DTI study. *Int. J. Radiat. Biol.*, 94(6) :532–541, 2018. ISSN 1362-3095. doi : 10.1080/09553002.2018.1466064.

Mingqiang Xie, Jennifer E. Tobin, Matthew D. Budde, Chin-I Chen, Kathryn Trinkaus, Anne H. Cross, Dennis P. McDaniel, Sheng-Kwei Song, and Regina C. Armstrong. Rostro-Caudal Analysis of Corpus Callosum Demyelination and Axon Damage Across Disease Stages Refines Diffusion Tensor Imaging Correlations with Pathological Features. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69(7) :704–716, July 2010. ISSN 0022-3069. doi : 10.1097/NEN.0b013e3181e3de90. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2901930/>.

Chapitre 6

Caractérisation par IRM des effets cérébraux induits par l'inhibition du gène Xlf dans un modèle de souris transgénique radiosensible

Les effets de l'irradiation décrits dans le chapitre 5 peuvent être modulés par divers facteurs notamment génétiques. Plusieurs modèles de souris génétiquement modifiés pour une protéine constitutive du système de réparation NHEJ ("non homologous end joining"), impliqué dans la réparation des cassures double-brin (CDB) de l'ADN ont été développés afin d'étudier la radiosensibilité génétique. Cette deuxième étude a alors pour objectif de caractériser, à partir de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) décrite dans le chapitre 4, l'un de ces modèles qui repose sur des souris "knock-out" (KO) pour le gène Xlf. Un article sur le développement cérébral embryonnaire et les effets comportementaux à l'âge adulte est en préparation (voir annexe F).

6.1 Matériels et méthodes

6.1.1 Description du modèle souris Xlf-/-

Système de réparation NHEJ et radiosensibilité individuelle

Comme précisé dans le chapitre 2, les dommages à l'ADN de type CDB bien que moins fréquents sont les plus délétères pour les cellules. Ils résultent soit de stress génotoxiques externes comme les rayonnements ionisants (RI), soit de processus physiologiques endogènes comme le métabolisme oxydatif (Sage et Shikazono, 2017). La réparation des CDB peut être prise en charge par le système de réparation NHEJ (suture non homologue des extrémités clivées, "non-homologous end joining"), présenté dans le chapitre 2, lequel fait intervenir sept facteurs fondamentaux : Ku70, Ku80, DNA-PKcs, Artémis, ligase IV, XRCC4 et Xlf (Abramowski et al., 2018). Une perte de fonctionnalité de l'un

ou de plusieurs de ces facteurs entraîne potentiellement une défaillance dans le système NHEJ et engendre une augmentation du nombre de lésions double-brin (CDB) non réparées fidèlement. Cette altération de NHEJ augmente l'instabilité génétique qui accentue le risque de développement de cancers ainsi que la sensibilité des individus face aux RI. Chez des patients présentant des mutations de gènes impliqués dans le système NHEJ, l'incidence de cancers leucémiques ou de lymphomes avait tendance à augmenter (Fischer, 2000; Woodbine et al., 2014)

La mutation de gènes impliqués dans NHEJ (Artémis, DNA-PKcs, la ligase IV ou Xlf) a été identifiée chez des patients atteints d'immunodéficience combinée sévère ("severe combined immunodeficiency", SCID) et confère un caractère radiosensible supplémentaire (Woodbine et al., 2014). Jusqu'à maintenant les mutations portant sur les facteurs XRCC4 ou Ku70,80 n'ont pas encore été identifiées. En général, ces patients ne présentent pas de problèmes neuro-développementaux. Toutefois, une microcéphalie peut être observée pour les patients présentant des facteurs ligase IV ou Xlf mutés. Divers modèles animaux Ku, XRCC4, Lig IV ou Xlf déficients ont donc fait l'objet d'études pour caractériser la radiosensibilité génétique manifeste chez ces patients et chez l'Homme en général.

Effets des mutations génétiques des facteurs impliqués dans NHEJ et modèles souris KO

L'impact de la manipulation génétique dans des modèles déficients dans l'expression de Ku, XRCC4, Lig IV ou Xlf a déjà été caractérisé *in vivo* en termes de croissance et de fertilité. Des études ont également été menées *in vitro* (Xing et al., 2017) et *ex vivo* (Frank et al., 1998). De plus, la réparation des CDB par la voie de réparation NHEJ est une condition préalable au bon développement du système immunitaire (Abramowski et al., 2018). C'est pourquoi le phénotype immunologique a également été exploré chez ces modèles transgéniques.

Alors que les modèles Ku déficient sont viables et fertiles, ils présentent de légères altérations avec une croissance anormale (Xing et al., 2017; Nussenzweig et al., 1996), une augmentation de la mort neuronale et une déficience immunitaire significative (Gu et al., 2000).

La mutation des complexes Artémis ou DNA-PKcs est à l'origine du déficit immunitaire combiné sévère (SCID) aussi bien chez la souris que chez l'Homme (Villartay et al., 2003; Woodbine et al., 2014). Ces souris KO ne présentent pas d'autres altérations phénotypiques majeures (Balmus et al., 2016).

Des effets plus sévères ont été observés chez les modèles souris XRCC4 ou Lig IV déficients comme une létalité embryonnaire liée à une mort massive des cellules neuronales nouvellement différenciées (Gao et al., 1998; Frank et al., 1998).

Les souris Xlf déficientes, contrairement aux souris XRCC4 ou Lig IV déficientes, sont viables avec un système immunitaire légèrement altéré et caractérisé par une diminution modérée des lymphocytes B et T (Villartay et al., 2003). D'autre part, ces souris ne

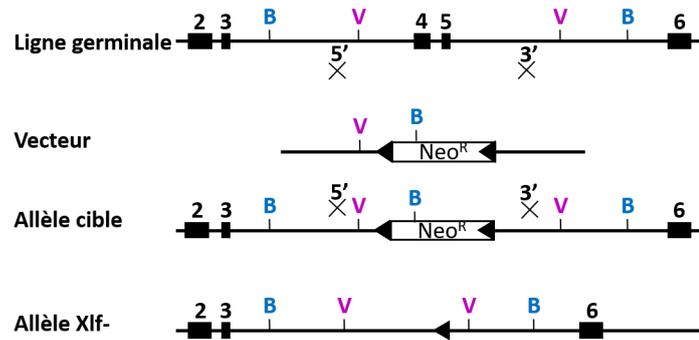


FIGURE 6.1 – Manipulations génétiques aboutissant à un gène muté $Xlf^{-/+}$. Le site du gène d'intérêt Xlf a été identifié par PCR sur l'ADN de cellules souches embryonnaires TC1 (Lignée germinale, 1^{ère} ligne). La mutation ciblée de ce gène consiste à remplacer les exons (rectangles noirs) numéro 4 et 5 par une cassette de gène Neo^R (vecteur résistant à la néomycine permettant la sélection positive des cellules ayant intégrées ce vecteur, 2^{ème} ligne), orientée dans la direction transcriptionnelle opposée à celle du promoteur endogène Xlf . La réussite du ciblage a été évaluée par des analyses de Southern blot, à l'aide de l'enzyme BamHI (B) et des sondes génomiques 3'/5' dont les extrémités sont marquées par une croix noire. Les triangles noirs représentent les sites loxP. V : endonucléase EcoRV utilisée pour le clonage moléculaire. L'échelle n'est pas respectée sur cette figure.

présentent ni de retard de croissance ni de mort neuronale importante (Liu et al., 2017; Abramowski et al., 2018).

Génération des souris transgéniques $Xlf^{-/-}$

À partir des résultats issus de ces études, nous avons choisi d'étudier des souris génétiquement modifiées sur les deux allèles du gène Xlf . Cette manipulation génétique provoque la délétion du gène Xlf chez les souris présentant cette double mutation (souris $Xlf^{-/-}$). Xlf est un facteur essentiel, mais non indispensable de la voie de réparation NHEJ pour la réparation des CDB génotoxiques, également connu sous le nom de Cernunnos ou NHEJ1 (Abramowski et al., 2018).

Les souris $Xlf^{-/-}$, sont des souris KO obtenues à partir de cellules souches embryonnaires (CSE) mutées sur un des deux allèles. La manipulation génétique ciblée du gène Xlf effectuée *in vitro* est présentée sur la Figure 6.1 (Zha et al., 2007). La perte du gène Xlf est vérifiée par une réaction de polymérisation en chaîne ou "polymerase chain reaction" (PCR) chez les souris KO.

Les Figures 6.2 et 6.3 décrivent le processus pour générer des souris transgéniques homozygotes $Xlf^{-/-}$ à partir de souris chimères présentant un génotype $Xlf^{-/+}$ (Li et al., 2008).

6.1.2 Effectifs de l'étude

Pour des soucis de réduction du nombre d'animaux régi par la règle des 3R en expérimentation animale, le groupe de souris sauvages non irradiées (Sham) présenté dans le

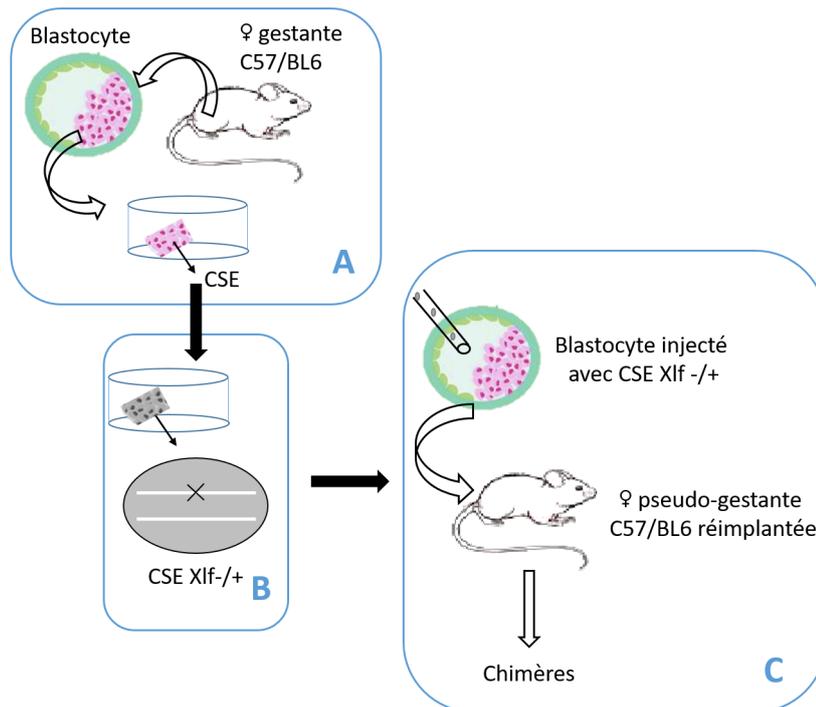


FIGURE 6.2 – Obtention de souris chimères à partir de cellules souches embryonnaires (CSE) mutées. Les CSE sont extraites d'un blastocyte provenant d'une souris gestante de souche C57BL6/N (A). Les manipulations génétiques de ces CSE se déroulent *in vitro* suivant le processus décrit dans la Figure 6.1 (B). Les CSE mutées sont ensuite injecté dans un blastocyte, lequel est réimplanté dans une souris pseudo-gestante. Les CSE colonisent les tissus de l'embryon de façon à ce que le génotype des spermatozoïdes soit le même que celui des CSE (Xlf-/+). Les souris chimères sont les souris issues de cette réimplantation et qui expriment le gène simplement muté (1 seul allèle muté) Xlf-/+ (C).

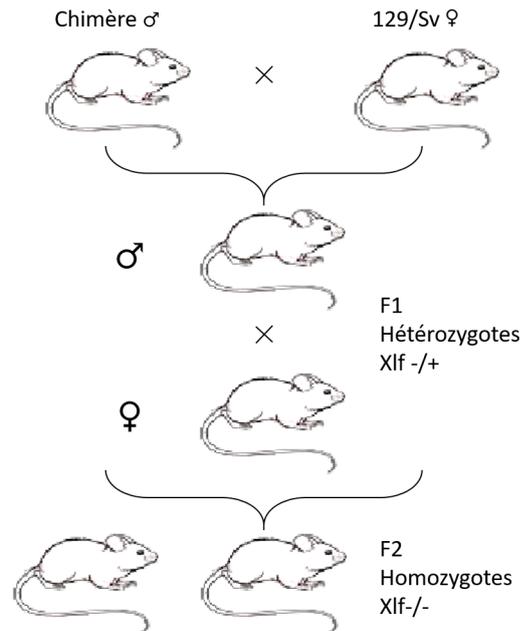


FIGURE 6.3 – Obtention des souris exprimant le gène doublement muté $Xlf^{-/-}$ à partir d’une souris chimère mâle $Xlf^{-/+}$ et d’une souris femelle $Xlf^{+/+}$. Deux générations de souris (F1 et F2) sont nécessaires pour que les souris expriment le gène doublement muté (2 allèles mutés) $Xlf^{-/-}$.

chapitre 5 a également servi pour cette étude. Le second groupe est composé de souris mâles C57BL6/N transgéniques, âgées d’environ 3 mois, n’exprimant pas la protéine Xlf. Dans la suite de ce chapitre, le groupe de souris WT fera référence aux souris sauvages tandis que le groupe $Xlf^{-/-}$ fera référence aux souris génétiquement modifiées. Au total, l’étude porte sur $N_{WT} = 21$ souris et $N_{Xlf^{-/-}} = 31$ souris.

Les souris étaient hébergées sans restriction ni alimentaire ni hydrique. La température était maintenue constante (19-22°C) avec un taux d’humidité entre 40 et 50 %. La luminosité dans la pièce d’hébergement était également fixée avec un cycle jour/nuit de 12h chacun. Les expérimentations animales ont été menées en accord avec la Directive européenne de 2010 et le comité d’éthique (APAFIS #20441-2019042915561380).

6.1.3 Protocole d’acquisition IRM

Le protocole d’acquisition mené sur les équipements détaillés dans la section 4.1.2 du chapitre 4 est décrit dans la section 4.2 du chapitre 4. Au moment des acquisitions les souris WT étaient âgées de 73 ± 6 jours alors que les souris $Xlf^{-/-}$ étaient âgées de 82 ± 7 jours.

6.1.4 Analyses

Critère d'inclusion

Pour les mêmes raisons qu'évoquées dans le chapitre 5, l'analyse volumétrique a été conduite sur $N_{WT} = 20$ souris et l'analyse portant sur les paramètres de diffusion sur $N_{WT} = 14$ souris.

Chez les souris Xlf-/-, aucune lésion, œdème ou microcéphalie n'a été détecté sur les images obtenues en IRM anatomiques. L'analyse volumétrique a donc été conduite sur $N_{Xlf-/-} = 31$ souris. Néanmoins, seuls 14 sets de données ont été conservés pour l'analyse des images pondérées en diffusion. Elles présentaient des artefacts de type "ghosting" trop importants et/ou une variation de signal trop importante ($> 12\%$) entre chaque répétition pour un grand nombre de pixels.

Comparaisons inter-groupes et analyses statistiques

Pour les souris WT, les moyennes et les écarts-types (SD) des volumes et des paramètres de diffusion ont déjà été calculés et présentés dans le chapitre 5.

De même, pour les souris Xlf-/-, les moyennes et SD des volumes ont été calculés à l'échelle totale du cerveau, de la substance grise (SG), de la substance blanche (SB), du liquide cébrospinal (LCS) et des 10 régions d'intérêt (ROI) définies. Les paramètres de diffusion (moyenne et SD) ont également été calculés dans les 11 ROI.

La variation normalisée entre les groupes WT et Xlf-/- pour un paramètre P donné est calculée à partir de la formule suivante :

$$\Delta P = \frac{P_{Xlf-/-} - P_{WT}}{P_{WT}} \quad (6.1)$$

La variation de certains paramètres est projetée sur le template souris TMBTA présenté dans la section 4.4.1 du chapitre 4 pour permettre une meilleure visualisation des effets de l'irradiation.

La significativité des comparaisons inter-groupes est calculée à l'aide d'un test de Student bilatéral. Le seuil de significativité est fixé à $p < 0,05$.

En ce qui concerne les données comportementales et histologiques, pour les deux groupes les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne (SEM). La significativité statistique entre les deux groupes est déterminée à partir d'un test de Mann-Whitney réalisé avec le logiciel Prism. Le seuil de significativité est fixé à $p < 0,05$.

6.2 Résultats

6.2.1 L'absence du gène *Xlf* provoque une faible apoptose chez l'embryon 4h

L'apoptose a été mesurée chez les embryons *Xlf*^{-/-} et WT (non irradiés) au stade E 14,5 au Laboratoire de RadioPathologie (LRP, CEA, Fontenay-aux-Roses). Le protocole du double marquage au DAPI (4',6 diamidino-2-phénylindole) et à la caspase 3 clivée (CC3) est identique à celui appliqué au chapitre 5 (voir annexe D) et les embryons WT sont les mêmes que ceux utilisés dans le chapitre 5. D'après la Figure 6.4, le nombre de cellules positives à la CC3 est augmenté significativement d'environ 6 fois chez les embryons *Xlf*^{-/-} par rapport aux embryons WT (N = 4 pour chaque groupe). Toutefois, le nombre de cellules marquées reste faible vis-à-vis du nombre total de cellules. La différenciation prématurée des progéniteurs serait à l'origine d'une diminution des neurones matures produits, laquelle serait beaucoup plus importante que l'apoptose (voir annexe F).

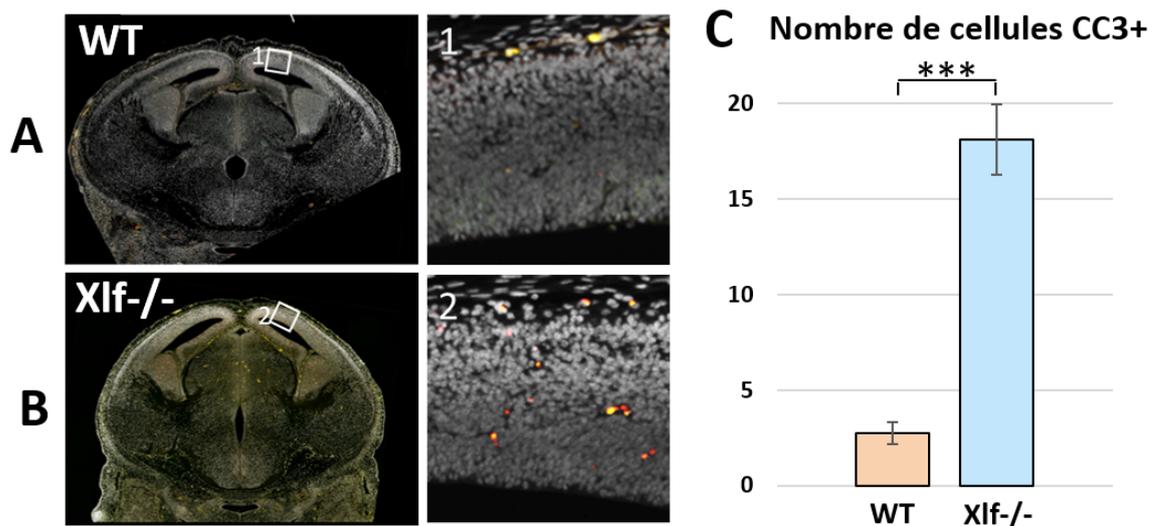


FIGURE 6.4 – Coupes axiales doublement marquées au DAPI (gris) et CC3 (rouge) chez un embryon WT (A) et *Xlf*^{-/-} (B). Les encarts numérotés 1 et 2 correspondent au zoom (x10) des régions correspondantes. (C) Moyenne \pm SEM du nombre de cellules marquées à la CC3 chez le groupe WT (beige) et *Xlf*^{-/-} (bleu clair) avec N = 4 pour chaque groupe de souris. La significativité des résultats a été calculée avec un test de Mann-Whitney : *** $p < 0,001$.

6.2.2 L'absence de gène *Xlf* provoque des altérations comportementales chez la souris adulte

À l'âge adulte, les souris *Xlf*^{-/-}, tout comme les souris WT, ne présentaient pas de problème en termes de prise alimentaire ou hydrique. Le poids moyen des souris *Xlf*^{-/-} ($25,3 \pm 1,5$ g) ne se différenciait pas significativement de celui des souris WT ($24,7 \pm 2,9$

g).

D'autre part, des tests comportementaux (détaillés en annexe C) sur des souris WT et Xlf^{-/-}, autres que celles qui ont servi à l'imagerie, ont été menés au Laboratoire de RadioPathologie (LRP, CEA, Fontenay-aux-Roses). Avec le test de l'"open-field" (OF), nous avons relevé de façon significative une diminution de la distance parcourue et une tendance à la diminution de la vitesse de déplacement chez le groupe Xlf^{-/-} par rapport au groupe WT, lesquelles sont associées à une augmentation de la durée d'immobilité. De plus, bien que ce ne soit pas significatif, les souris Xlf^{-/-} ont tendance à passer plus de temps au centre de l'OF par rapport aux souris WT (Figure 6.5 A).

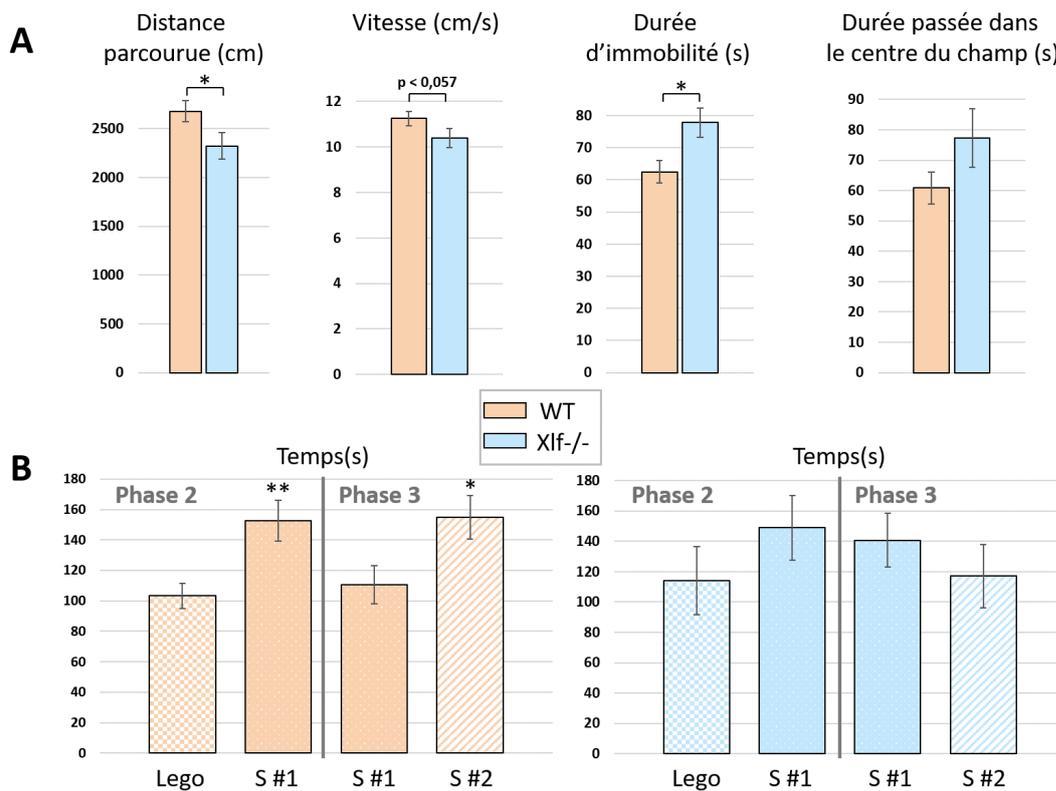


FIGURE 6.5 – La mutation Xlf^{-/-} est à l'origine des troubles comportementaux locomoteurs et sociaux présents chez la souris adulte. (A) Moyenne \pm SEM de la distance parcourue (cm), de la vitesse de déplacement (cm/s) et de la durée d'immobilisation (s) et la durée passée dans le centre du champ (s) mesurées chez les souris Xlf^{-/-} ($N_{Xlf^{-/-}} = 16$) et WT ($N_{WT} = 11$) avec le test de l'OF. (B) Moyenne \pm SEM du temps passé par les souris Xlf^{-/-} ($N_{Xlf^{-/-}} = 11$) et WT ($N_{WT} = 11$) à explorer le lego, la souris 1 (S #1) et la souris 2 (S #2) durant les phases 2 et 3 du "3 chamber test for sociability and recognition". La significativité des résultats a été calculée avec un test de Mann-Whitney : ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 5 avec le test "Three-chamber test for sociability and recognition", les souris WT ont un comportement que l'on peut qualifier de normal, à savoir que les animaux passent plus de temps à explorer la souris 1 (S #1) par rapport au lego dans la phase 2, ainsi que la souris 2 (S #2) par rapport à la S#1.

Pour le groupe $Xlf^{-/-}$, le temps passé avec le légo et la S #1 ne varie pas pendant la phase 2. De même, durant la phase 3, les souris $Xlf^{-/-}$ passent autant de temps avec la S #1 qu'avec la S #2 (Figure 6.5, B). Ces résultats témoignent donc de la présence de problèmes d'interactions sociales chez les souris Xlf déficientes.

Pour mieux comprendre les déficits comportementaux mis en évidence chez les souris $Xlf^{-/-}$, nous avons cherché à caractériser par IRM si l'inhibition du gène Xlf chez des souris génétiquement modifiées pouvait impacter la macrostructure ainsi que la microstructure du tissu cérébral.

6.2.3 L'absence du gène Xlf induit des atrophies chez les souris adultes

En utilisant la même méthodologie que celle décrite dans le chapitre 5, nous avons tout d'abord quantifié les volumes des différents compartiments du cerveau (SG, SB, LCS) chez la souris adulte. Comme le montre la Figure 6.6, l'analyse statistique des données, obtenues à partir des volumes évalués sur les images IRM anatomique, révèle une atrophie significative de -8% du volume cérébral total (SB+SG) chez les $Xlf^{-/-}$ par rapport aux souris WT ($p = 2,2 \times 10^{-8}$). Cet effet sur le volume global du cerveau se décompose en une diminution du volume de -9% pour la SG ($p = 2,2 \times 10^{-8}$) et de -5% pour la SB ($p = 2,4 \times 10^{-2}$) chez les souris $Xlf^{-/-}$ par rapport aux souris WT. L'augmentation de LCS de +10% dans le groupe $Xlf^{-/-}$ n'est pas significative par rapport au groupe WT ($p = 7,9 \times 10^{-2}$).

Néanmoins, le ratio SG, SB, LCS sur le volume cérébral total reste constant pour les deux groupes. Il vaut environ 67%, 30% et 3% respectivement.

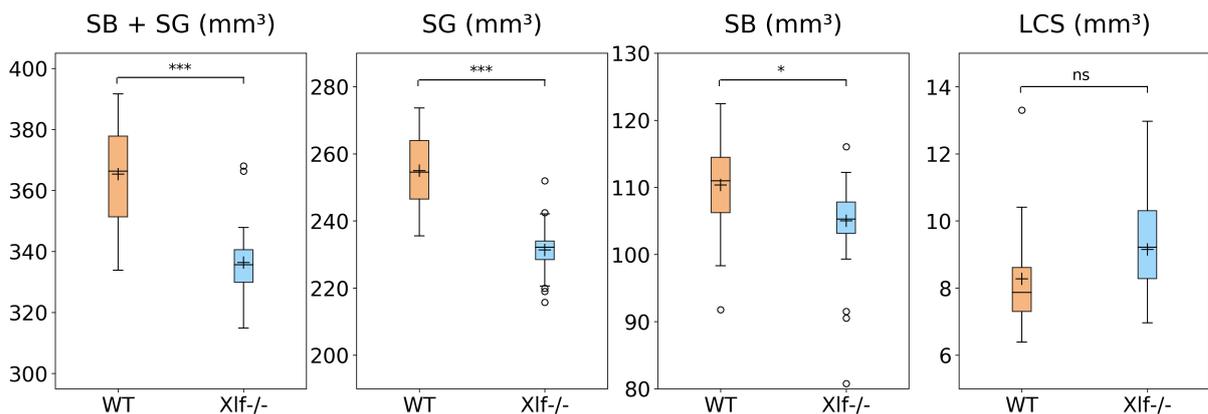


FIGURE 6.6 – La délétion du gène Xlf provoque une atrophie cérébrale chez les souris à l'âge adulte. Volumes des différents compartiments cérébraux issus de la segmentation pour le groupe des souris sauvages (WT) et génétiquement modifiées ($Xlf^{-/-}$). La croix et la ligne symbolisent respectivement la moyenne et la médiane. La boîte s'étend du premier (Q1) au troisième (Q3) quartile et les extrémités des moustaches délimitent l'intervalle de confiance : $[Q1 - 1,5 \times IQR; Q3 + 1,5 \times IQR]$, avec IQR l'intervalle interquartile. La significativité des résultats a été calculée avec un test de Student *** $p < 0,005$; * $p < 0,05$ et ns : non significatif.

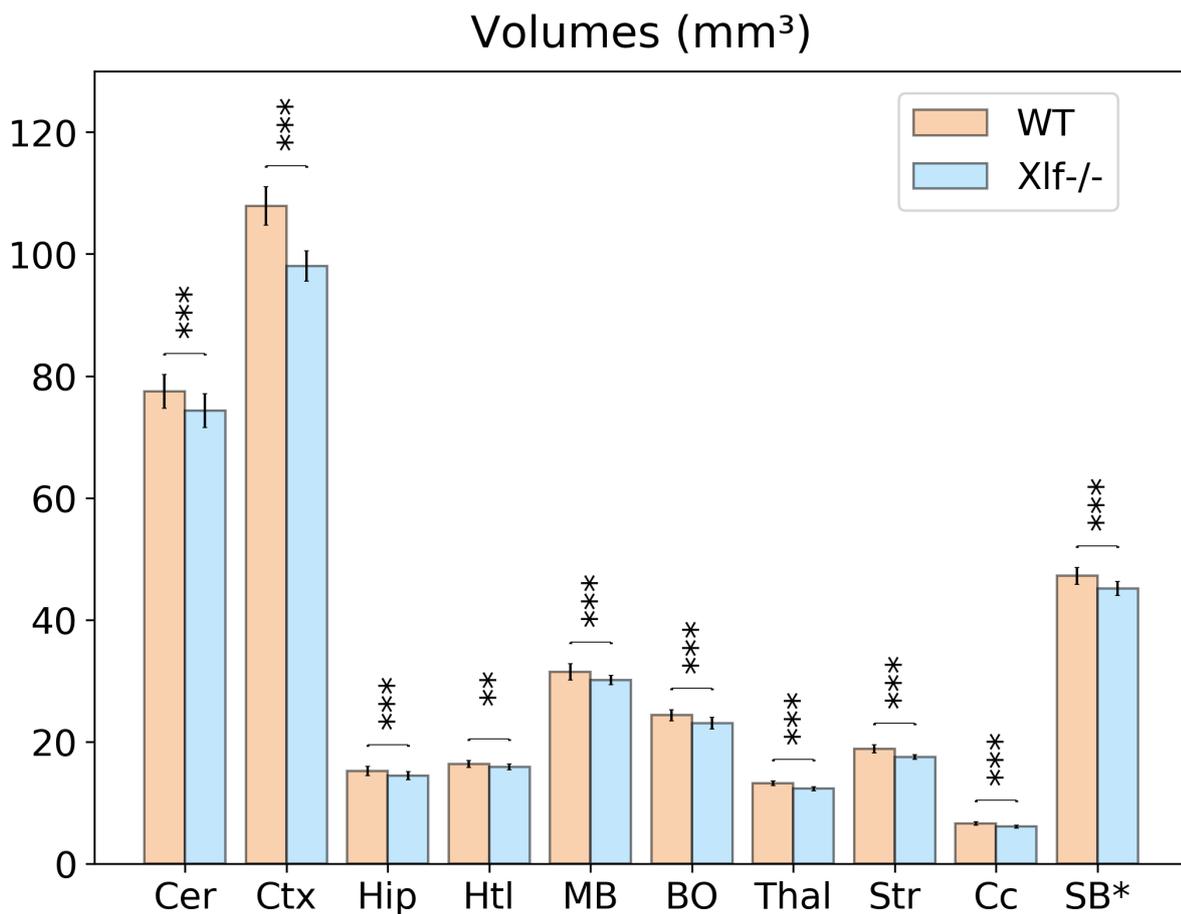


FIGURE 6.7 – L’inhibition du gène *Xlf* a pour conséquence une atrophie des différentes structures cérébrales chez la souris *Xlf*^{-/-} adulte. Moyenne \pm SD des volumes des différentes ROI pour le groupe de souris sauvages (WT, beige) et génétiquement modifiées (*Xlf*^{-/-}, bleu) : Cer = cervelet ; Ctx = cortex ; Hip = hippocampe ; Htl = hypothalamus ; MB = mésencéphale ; BO = bulbe olfactif ; Thal = thalamus ; Str = striatum ; Cc = corps calleux ; SB* = substance blanche à l’exception du corps calleux. La significativité des résultats a été calculée avec un test de Student *** $p < 0,005$.

À plus petite échelle, le volume moyen et écart-type calculé dans chaque ROI pour les deux groupes est présenté dans la Figure 6.7. Toutes les ROI présentent un volume significativement réduit ($p < 0,005$) chez le groupe *Xlf*^{-/-} par rapport au groupe WT. La diminution de volume de ces régions s’élève de -3% dans l’Htl à -10% dans le Ctx et le Cc.

Sur la Figure 6.8, le Ctx (-9%, $p = 7,2 \times 10^{-14}$) et le Cc (-8 %, $p = 5,6 \times 10^{-7}$) présentent une diminution de volume, entre les deux groupes d’animaux, plus importante que dans la partie sous-corticale du cerveau (Htl : -3% $p = 3,5 \times 10^{-3}$, Thal : -7 % $p = 4,4 \times 10^{-10}$, Hip : -6% $p = 5,9 \times 10^{-4}$ chez les souris *Xlf*^{-/-} versus les souris WT).

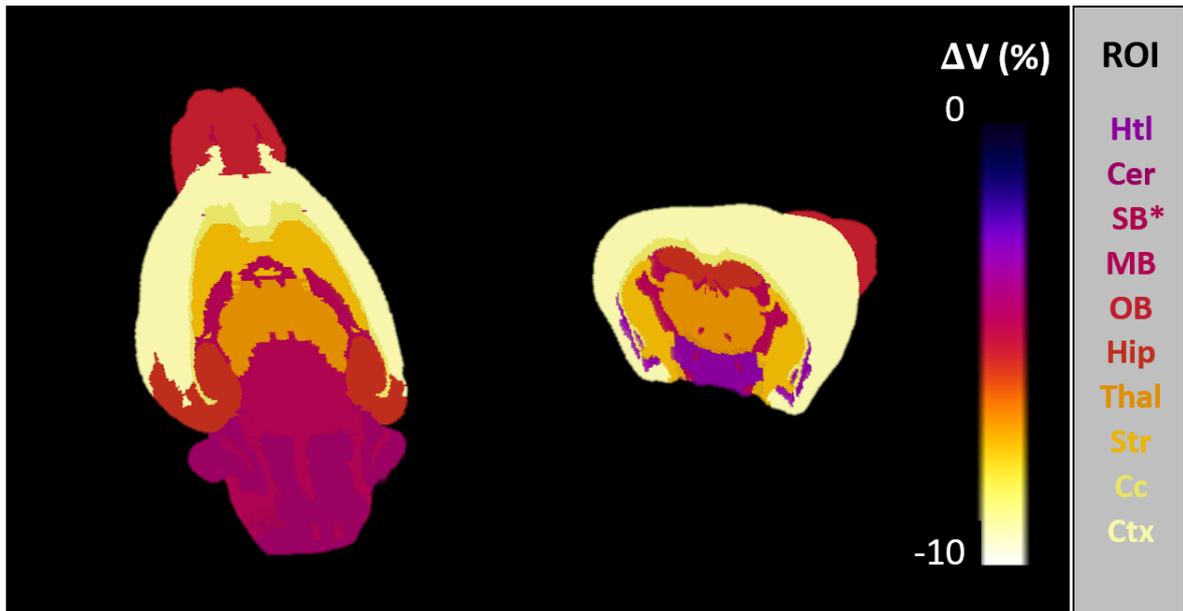


FIGURE 6.8 – Représentations 3D des variations volumétriques des différentes structures cérébrales étudiées chez la souris *Xlf*^{-/-} adulte en comparaison à la souris WT. Variations relatives du volume ΔV projetées sur une coupe coronale et axiale du template souris TMBTA. Cette représentation prend en compte toutes les variations, même celles qui ne sont pas significatives.

6.3 L'absence du gène *Xlf* ne modifie pas la microstructure cérébrale chez la souris

6.3.1 Substance grise

Les paramètres estimés dans la SG à partir du modèle IVIM-Kurtosis (ADC_0 , K , f_{IVIM} et D^*) et S-Index (sADC et SI) sont présentés dans les Tables 6.1, 6.2 et 6.3.

Dans le Cer, les valeurs de l' ADC_0 (+5,2%, $p = 1,8 \times 10^{-2}$), de sADC (+3,7%, $p = 2,8 \times 10^{-2}$) et de D^* (+112,1%, $p = 3,9 \times 10^{-2}$) sont augmentées chez les souris *Xlf*^{-/-} par rapport aux souris WT alors que celles du SI sont diminuées (-12%, $p = 2,1 \times 10^{-2}$). Dans le Ctx, seul f_{IVIM} est diminué de -10,2% ($p = 6,1 \times 10^{-3}$) dans le groupe *Xlf*^{-/-} par rapport au groupe WT.

ROI	ADC ₀ (10 ⁻⁴ mm ² /s)			K		
	WT	Xlf-/-	p	WT	Xlf-/-	p
Cer	6,18 ± 0,19	6,50 ± 0,41	0,02	0,77 ± 0,03	0,75 ± 0,06	0,30
Ctx	6,89 ± 0,08	6,89 ± 0,11	0,99	0,53 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,56
Hip	7,00 ± 0,06	7,00 ± 0,09	0,47	0,58 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,72
Htl	7,06 ± 0,09	7,11 ± 0,13	0,22	0,68 ± 0,03	0,70 ± 0,03	0,15
MB	7,25 ± 0,09	7,22 ± 0,08	0,32	0,71 ± 0,02	0,72 ± 0,02	0,48
BO	6,98 ± 0,11	7,05 ± 0,11	0,08	0,70 ± 0,01	0,66 ± 0,02	0,03
Thal	7,15 ± 0,09	7,21 ± 0,1	0,15	0,66 ± 0,03	0,61 ± 0,02	0,45
Str	6,78 ± 0,07	6,80 ± 0,10	0,60	0,61 ± 0,02	0,61 ± 0,02	0,52
ZSV	6,95 ± 0,16	7,0 ± 0,14	0,36	0,62 ± 0,03	0,63 ± 0,02	0,19

TABLE 6.1 – La délétion du gène Xlf ne modifie pas les valeurs du kurtosis et du coefficient de diffusion. Moyenne ± SD et valeur de significativité statistique (p) pour les paramètres de diffusion (ADC₀, K) calculés dans les ROI de la SG pour les groupes WT et Xlf-/-, avec N_{WT} = 7 souris et N_{Xlf-/-} = 14 souris. Les résultats significatifs apparaissent en caractères gras.

ROI	f _{IVIM} (%)			D* (10 ⁻³ mm ² /s)		
	WT	Xlf-/-	p	WT	Xlf-/-	p
Cer	3,0 ± 0,6	3,1 ± 0,6	0,84	7,7 ± 2,6	16,4 ± 14	0,04
Ctx	2,0 ± 0,2	1,8 ± 0,2	6,1 x 10⁻³	16,2 ± 3,1	14,4 ± 2,0	0,10
Hip	1,7 ± 0,4	1,7 ± 0,4	0,83	7,7 ± 0,7	7,3 ± 1,4	0,33
Htl	3,4 ± 0,6	3,3 ± 0,9	0,71	7,0 ± 1,1	7,5 ± 1,4	0,30
MB	3,6 ± 0,4	3,7 ± 0,5	0,35	9,0 ± 1,0	8,5 ± 1,2	0,26
BO	2,7 ± 0,3	2,7 ± 0,3	0,98	8,8 ± 1,0	9,6 ± 1,7	0,16
Thal	2,5 ± 0,3	2,6 ± 0,4	0,56	10,7 ± 2,4	11,7 ± 2,8	0,36
Str	2,2 ± 0,3	2,3 ± 0,3	0,93	15,1 ± 7,7	17,9 ± 9,9	0,41
ZSV	3,7 ± 0,9	3,8 ± 0,6	0,62	9,1 ± 2,6	11,4 ± 11,2	0,46

TABLE 6.2 – La délétion du gène Xlf ne modifie pas les valeurs des paramètres IVIM. Moyenne ± SD et valeur de significativité statistique (p) pour les paramètres de diffusion (f_{IVIM} et D*) calculés dans les ROI de la SG pour les groupes WT et Xlf-/-, avec N_{WT} = 7 souris et N_{Xlf-/-} = 14 souris. Les résultats significatifs apparaissent en caractères gras.

6.3.2 Substance blanche

Les paramètres estimés dans la SB à partir du modèle DTI (sFA, sMD, sAD, sRD) et S-Index anisotrope (S3) sont présentés dans la Table 6.4. Nous n'avons reporté aucune variation significative entre les groupes Xlf-/- et WT pour ces quatre paramètres.

ROI	sADC (10^{-4} mm ² /s)			SI		
	WT	Xlf ^{-/-}	p	WT	Xlf ^{-/-}	p
Cer	4,85 ± 0,09	5,03 ± 0,26	0,03	83 ± 5	73 ± 14	0,02
Ctx	5,75 ± 0,08	5,74 ± 0,09	0,71	36 ± 4	36 ± 4	0,71
Hip	5,70 ± 0,07	5,73 ± 0,10	0,42	38 ± 3	37 ± 5	0,42
Htl	5,46 ± 0,09	5,45 ± 0,10	0,88	50 ± 4	50 ± 5	0,88
MB	5,55 ± 0,07	5,53 ± 0,05	0,47	46 ± 4	47 ± 2	0,48
BO	5,41 ± 0,09	5,44 ± 0,08	0,34	52 ± 4	51 ± 4	0,34
Thal	5,62 ± 0,08	5,66 ± 0,08	0,3	42 ± 4	41 ± 4	0,31
Str	5,52 ± 0,07	5,51 ± 0,08	0,67	47 ± 3	48 ± 4	0,66
ZSV	5,60 ± 0,11	5,58 ± 0,07	0,57	43 ± 5	44 ± 4	0,59

TABLE 6.3 – La délétion du gène Xlf ne modifie pas les valeurs des paramètres de S-Index (SI) et sADC. Moyenne ± SD et valeur de significativité statistique (p) pour les paramètres de diffusion (sADC et SI) calculés dans les ROI de la SG pour les groupes WT et Xlf^{-/-}, avec N_{WT} = 7 souris et N_{Xlf^{-/-}} = 14 souris. Les résultats significatifs apparaissent en caractères gras.

Paramètre	ROI	WT	Xlf ^{-/-}	p
S3	Cc	228 ± 11	226 ± 12	0,65
	SB*	166 ± 11	157 ± 20	0,20
sFA	Cc	0,50 ± 0,02	0,49 ± 0,02	0,50
	SB*	0,39 ± 0,02	0,38 ± 0,03	0,21
sMD (10^{-4} mm ² /s)	Cc	5,39 ± 0,07	5,36 ± 0,08	0,18
	SB*	4,57 ± 0,07	4,73 ± 0,04	0,13
sAD (10^{-4} mm ² /s)	Cc	8,70 ± 0,14	8,60 ± 0,13	0,06
	SB*	6,77 ± 0,31	6,66 ± 0,16	0,25
sRD (10^{-4} mm ² /s)	Cc	3,74 ± 0,11	3,73 ± 0,12	0,88
	SB*	3,53 ± 0,08	3,71 ± 0,4	0,12

TABLE 6.4 – La délétion du gène Xlf ne modifie pas les valeurs des paramètres estimées à l'aide du modèle du tenseur de diffusion. Moyenne ± SD et valeur de significativité statistique (p) pour les paramètres de diffusion (S3, sFA, sMD, sAD et sRD) calculés dans les ROI de la SB pour les groupes WT et Xlf^{-/-}, avec N_{WT} = 7souris et N_{Xlf^{-/-}} = 14 souris.

6.4 Discussion

Dans ce chapitre, nous avons caractérisé par IRM un modèle transgénique de souris, muté sur les deux allèles du gène *Xlf* (*Xlf*^{-/-}). À l'âge adulte, ce modèle présente une atrophie cérébrale généralisée associée à des troubles comportementaux tels qu'une diminution de l'activité locomotrice et de la sociabilisation.

L'apoptose observée chez la souris *Xlf*^{-/-} au stade embryonnaire

L'augmentation significative du nombre de cellules marquées à la CC3 justifie une augmentation de l'apoptose chez les embryons *Xlf*^{-/-} à E14,5. Alors que certaines études confirment l'augmentation d'une légère apoptose chez les embryons *Xlf*^{-/-} (E18,5) (Abramowski et al., 2018), d'autres infirment ce résultat avec une très faible présence de cellules marquées à la CC3 (Liu et al., 2017; Balmus et al., 2016) qui peut être associée à une détection quasi nulle des dommages à l'ADN de type doubles brins dans le tube neural des embryons *Xlf*^{-/-} à E14,5 (Balmus et al., 2016). Cependant l'apoptose n'est pas le processus majeur puisque la différenciation prématurée des cellules souches neurales causerait une diminution plus importante du nombre de neurones matures que l'apoptose elle-même (voir annexe F).

Les altérations comportementales observées chez la souris *Xlf*^{-/-} adulte

Lors de cette étude préclinique, nous avons pu montrer que les souris transgéniques *Xlf*^{-/-} ont un poids équivalent aux souris WT. Une autre étude a observé un poids similaire entre les deux groupes (WT et *Xlf*^{-/-}) pour des souris âgées de 30 jours (Xing et al., 2017). La variation de poids entre les souris *Xlf*^{-/-} et WT est par conséquent pratiquement nulle à PN 30, mais s'accroît au cours du 2^{ème} et 3^{ème} mois. En supposant que la croissance est reflétée par le poids des souris, nous estimons que la croissance des souris *Xlf*^{-/-} est similaire à celle des souris sauvages au stade juvénile et s'écarte légèrement à l'âge adulte. Les problèmes de croissance mis en évidence dans le modèle souris *Xlf*^{-/-} peuvent être rapprochés de ceux qui surviennent chez les patients SCID (Buck et al., 2006).

D'autre part, le test comportemental de l'OF, réalisé au LRP sur des souris *Xlf*^{-/-} et WT âgées de 3 mois autres que celles utilisées pour les acquisitions IRM, a révélé une diminution significative de la distance parcourue ainsi qu'une durée d'immobilité plus importante chez les souris *Xlf*^{-/-}. L'activité locomotrice de ces souris semble alors réduite, ce qui est cohérent avec la tendance à la diminution de la vitesse de déplacement. Le temps passé au centre de l'OF semble indiquer de façon non significative un comportement plus anxieux chez ces souris *Xlf*^{-/-} par rapport aux souris WT. Les interactions sociales explorées à l'aide du "Three-chamber test for sociability and recognition" apparaissent également altérées chez les souris *Xlf*^{-/-}. En effet contrairement aux souris WT, les souris

Xlf^{-/-} ont tendance à préférer la souris 1 par rapport à la souris 2 dans la phase 3 du test. Ce qui est révélateur d'un comportement social apathique (en raison du manque d'intérêt pour les nouvelles interactions sociales) chez les souris Xlf^{-/-} si nous le comparons avec celui des souris WT qui présentaient un comportement social normal (avec un attrait à la fois pour les interactions sociales et les nouvelles interactions).

Les altérations anatomiques détectées *in vivo* en 3D par IRM sur le cerveau de souris Xlf^{-/-} au stade adulte

Le modèle souris Xlf^{-/-} présente des altérations cérébrales visibles en IRM anatomique. À notre connaissance, il n'existe pas d'étude sur ce modèle de souris transgénique qui estime le volume ou le poids du cerveau ainsi que le volume des différentes structures cérébrales. Néanmoins, la différenciation prématurée des cellules souches chez l'embryon peut traduire une diminution de neurones matures et par conséquent un développement altéré des structures cérébrales (voir annexe F).

De plus, des microcéphalies ont été observées chez les patients atteints d'un déficit immunitaire combiné sévère (SCID) (Buck et al., 2006). Par conséquent, notre modèle réplique la croissance anormale du cerveau liée à la mutation du gène Xlf^{-/-}.

L'absence d'altérations microstructurelles détectées *in vivo* par IRM sur le cerveau de souris Xlf^{-/-} au stade adulte

Les paramètres de diffusion estimés à partir des images obtenues par IRM de diffusion ne présentent pas de variations significatives. Par conséquent, en considérant la même interprétation biologique pour les paramètres de diffusion qu'au chapitre 5, notamment pour le S-Index, il semblerait que la modification du gène Xlf n'entraînerait pas de changement notable au niveau de la densité cellulaire ou un quelconque phénomène œdémateux. Ces modifications du paramètre S-Index dans les études des chapitres 5 et 6 pourraient alors s'expliquer par les effets à court terme chez l'embryon : l'apoptose pour les WT irradiées à 1 Gy (chapitre 5) et la différenciation prématurée des progéniteurs neuronaux en neurones matures pour les souris Xlf^{-/-} non irradiées. L'autre interprétation possible serait que la modification génétique entraîne des modifications microstructurelles, mais trop subtiles pour être détectées par IRM.

Limites de l'étude

Outre les limites méthodologiques dues à l'acquisition et au traitement des données présentées au chapitre 5, cette étude possède d'autres points de fragilité. En effet, la qualité des images pondérées en diffusion chez les souris Xlf^{-/-} est moindre que chez les souris WT en raison de nombreux artefacts présents sur les images qui ont mené à l'exclusion de près de 50% des animaux.

Il serait intéressant de mesurer la densité cellulaire par une méthode histologique, comme celle présentée dans le chapitre 5, afin d'établir si l'absence de variation microstructurale est bien réelle ou si elle est due à la limite de sensibilité de notre approche d'imagerie.

De même, il serait intéressant de compléter la comparaison entre les groupes WT et Xlf-/- d'un point de vue structurel à l'aide de tractogrammes reconstruits à partir d'acquisitions IRM *ex vivo* réalisées sur des cerveaux de souris fixés.

La corrélation entre les atrophies observées par IRM et les scores comportementaux n'a pas pu être réalisée du fait que les animaux utilisés pour ces deux modalités d'investigation sont différents. De plus, d'autres modalités d'IRM seraient plus appropriées pour établir cette corrélation, en particulier l'IRM fonctionnelle (IRMf). En effet, le contraste BOLD ("Blood Oxygenation Level Dependant") est indirectement sensible à l'activité neuronale, car l'état d'oxygénation du sang dans les vaisseaux sanguins est lié au flux sanguin local. En fonction des stimuli appliqués au cours de l'acquisition IRMf, il est possible de remonter aux régions cérébrales activées, notamment dans les zones motrices, sensorielles ou cognitives (Keilholz et al., 2017).

6.5 Conclusion

À notre connaissance, il s'agit de la première étude *in vivo* qui caractérise par IRM ce modèle de souris transgénique à l'âge adulte. Les effets de l'inhibition du gène Xlf-/- sur la macrostructure et la microstructure cérébrale ont pu être sondés à l'aide de la méthodologie IRM, développée au cours de cette thèse. Nous avons pu observer des atrophies à l'échelle du cerveau entier et des différentes structures cérébrales chez les souris Xlf-/- par rapport aux souris WT. Cette diminution significative des volumes est similaire à celle observée chez les souris WT irradiées *in utero* à 1 Gy (chapitre 5). Néanmoins, aucune variation significative des paramètres de diffusion entre les groupes Xlf-/- et Sham n'a été observée. Ce modèle étant caractérisé d'un point de vue volumétrique et microstructurel, nous pouvons dès lors investiguer les effets radio-induits, en particulier à faible dose, chez ce modèle défini comme radiosensible.

Bibliographie

- Vincent Abramowski, Olivier Etienne, Ramy Elsaid, Junjie Yang, Aurélie Berland, Laetitia Kermasson, Benoit Roch, Stefania Musilli, Jean-Paul Moussu, Karelia Lipson-Ruffert, Patrick Revy, Ana Cumano, François D. Boussin, and Jean-Pierre de Villartay. PAXX and Xlf interplay revealed by impaired CNS development and immunodeficiency of double KO mice. *Cell Death Differ*, 25(2) :444–452, February 2018. ISSN 1476-5403. doi : 10.1038/cdd.2017.184. URL <https://www.nature.com/articles/cdd2017184>.
- Gabriel Balmus, Ana C. Barros, Paul W. G. Wijnhoven, Chloé Lescale, Hélène Lenden Hasse, Katharina Boroviak, Carlos le Sage, Brendan Doe, Anneliese O. Speak, Antonella Galli, Matt Jacobsen, Ludovic Deriano, David J. Adams, Andrew N. Blackford, and Stephen P. Jackson. Synthetic lethality between PAXX and XLF in mammalian development. *Genes Dev.*, 30(19) :2152–2157, January 2016. ISSN 0890-9369, 1549-5477. doi : 10.1101/gad.290510.116. URL <http://genesdev.cshlp.org/content/30/19/2152>.
- Dietke Buck, Laurent Malivert, Régina de Chasseval, Anne Barraud, Marie-Claude Fondanèche, Ozden Sanal, Alessandro Plebani, Jean-Louis Stéphan, Markus Hufnagel, Françoise le Deist, Alain Fischer, Anne Durandy, Jean-Pierre de Villartay, and Patrick Revy. Cernunnos, a Novel Nonhomologous End-Joining Factor, Is Mutated in Human Immunodeficiency with Microcephaly. *Cell*, 124(2) :287–299, January 2006. ISSN 0092-8674. doi : 10.1016/j.cell.2005.12.030. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286740600002X>.
- A Fischer. Severe combined immunodeficiencies (SCID). *Clin Exp Immunol*, 122(2) :143–149, November 2000. ISSN 0009-9104. doi : 10.1046/j.1365-2249.2000.01359.x. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1905779/>.
- Karen M. Frank, JoAnn M. Sekiguchi, Katherine J. Seidl, Wojciech Swat, Gary A. Rathbun, Hwei-Ling Cheng, Laurie Davidson, Landy Kangaloo, and Frederick W. Alt. Late embryonic lethality and impaired V (D) J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature*, 396(6707) :173–177, November 1998. ISSN 1476-4687. doi : 10.1038/24172. URL <https://www.nature.com/articles/24172>.
- Yijie Gao, Yi Sun, Karen M. Frank, Pieter Dikkes, Yuko Fujiwara, Katherine J. Seidl, JoAnn M. Sekiguchi, Gary A. Rathbun, Wojciech Swat, Jiyang Wang, Roderick T. Bronson, Barbara A. Malynn, Margaret Bryans, Chengming Zhu, Jayanta Chaudhuri,

- Laurie Davidson, Roger Ferrini, Thomas Stamato, Stuart H. Orkin, Michael E. Greenberg, and Frederick W. Alt. A Critical Role for DNA End-Joining Proteins in Both Lymphogenesis and Neurogenesis. *Cell*, 95(7) :891–902, December 1998. ISSN 0092-8674. doi : 10.1016/S0092-8674(00)81714-6. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400817146>.
- Yansong Gu, JoAnn Sekiguchi, Yijie Gao, Pieter Dikkes, Karen Frank, David Ferguson, Paul Hasty, Jerold Chun, and Frederick W. Alt. Defective embryonic neurogenesis in Ku-deficient but not DNA-dependent protein kinase catalytic subunit-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(6) :2668–2673, March 2000. ISSN 0027-8424. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC15987/>.
- Sheila D. Keilholz, Wen-Ju Pan, Jacob Billings, Maysam Nezafati, and Sadia Shakil. Noise and non-neuronal contributions to the BOLD signal : applications to and insights from animal studies. *Neuroimage*, 154 :267–281, 2017. ISSN 1095-9572. doi : 10.1016/j.neuroimage.2016.12.019.
- Gang Li, Frederick W. Alt, Hwei-Ling Cheng, James W. Brush, Peter Goff, Mike M. Murphy, Sonia Franco, Yu Zhang, and Shan Zha. Lymphocyte-Specific Compensation For XLF/Cernunnos End-Joining Functions In V(D)J Recombination. *Mol Cell*, 31(5) : 631–640, September 2008. ISSN 1097-2765. doi : 10.1016/j.molcel.2008.07.017. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2630261/>.
- Xiangyu Liu, Zhengping Shao, Wenxia Jiang, Brian J. Lee, and Shan Zha. PAXX promotes KU accumulation at DNA breaks and is essential for end-joining in XLF-deficient mice. *Nat Commun*, 8(1) :1–13, January 2017. ISSN 2041-1723. doi : 10.1038/ncomms13816. URL <https://www.nature.com/articles/ncomms13816>.
- André Nussenzweig, Changhu Chen, Vera da Costa Soares, Mercedes Sanchez, Karen Sokol, Michel C. Nussenzweig, and Gloria C. Li. Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature*, 382(6591) :551–555, August 1996. ISSN 1476-4687. doi : 10.1038/382551a0. URL <https://www.nature.com/articles/382551a0>.
- Evelyne Sage and Naoya Shikazono. Radiation-induced clustered DNA lesions : Repair and mutagenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 107 :125–135, June 2017. ISSN 0891-5849. doi : 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.008. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584916310954>.
- Jean-Pierre de Villartay, Alain Fischer, and Anne Durandy. The mechanisms of immune diversification and their disorders. *Nat Rev Immunol*, 3(12) :962–972, December 2003. ISSN 1474-1741. doi : 10.1038/nri1247. URL <https://www.nature.com/articles/nri1247>.

Lisa Woodbine, Andrew R. Gennery, and Penny A. Jeggo. The clinical impact of deficiency in DNA non-homologous end-joining. *DNA Repair*, 16 :84–96, April 2014. ISSN 1568-7864. doi : 10.1016/j.dnarep.2014.02.011. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786414000482>.

Mengtan Xing, Magnar Bjørås, Jeremy A. Daniel, Frederick W. Alt, and Valentyn Oksenysh. Synthetic lethality between murine DNA repair factors XLF and DNA-PKcs is rescued by inactivation of Ku70. *DNA Repair (Amst)*, 57 :133–138, September 2017. ISSN 1568-7864. doi : 10.1016/j.dnarep.2017.07.008. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5584571/>.

Shan Zha, Frederick W. Alt, Hwei-Ling Cheng, James W. Brush, and Gang Li. Defective DNA repair and increased genomic instability in Cernunnos-XLF-deficient murine ES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(11) :4518–4523, March 2007. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.0611734104. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1838633/>.

Chapitre 7

Effets des radiations ionisantes à faible dose sur le cerveau en développement

Les chapitres 5 et 6 caractérisent par imagerie, d'un point de vue volumétrique et microstructural, d'une part les effets à long terme de l'irradiation *in utero* à forte dose sur le cerveau (chapitre 5) et d'autre part, l'impact de la délétion du gène *Xlf*^{-/-} sur le cerveau adulte (chapitre 6). Ce dernier chapitre vise alors à investiguer les conséquences d'une irradiation à faible dose (100 mGy) sur le cerveau de souris sauvages (WT) et transgéniques (*Xlf*^{-/-}) à deux âges du neuro-développement qui sont particulièrement connus pour être radiosensibles, à savoir les phases embryonnaire *in utero* (E14,5) et juvénile (10 jours postnatal, PN10). Cette étude a fait l'objet d'une présentation au congrès de l'ESMRMB (European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology) en 2019 sous la forme d'un poster électronique et au congrès de l'ICMRM (International Conference on Magnetic Resonance Microscopy) en 2019 sous la forme d'un poster également.

7.1 Matériels et méthodes

7.1.1 Protocoles d'irradiation et effectifs de l'étude

Cette étude s'est portée sur 6 groupes de souris C57BL6/N mâles âgées entre 2 et 3 mois : WT Sham, *Xlf*^{-/-} Sham, WT PN10, *Xlf*^{-/-} PN10, WT E14,5 et *Xlf*^{-/-} E14,5. Les effectifs, le poids et l'âge sont présentés dans la Table 7.1. Par souci de réduction du nombre d'animaux selon le principe de la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) en expérimentation animale, nous avons considéré les souris non exposées (Sham) comme contrôles pour les souris irradiées *in utero* (E14,5) et en période postnatale (PN10). Les souris WT et *Xlf*^{-/-} Sham ont notamment été présentées dans le chapitre 6.

Le poids des souris irradiées à faible dose (PN10 ou E14,5) a tendance à augmenter par rapport aux poids des souris non irradiées (Sham), tout comme l'âge auquel les acquisitions par imagerie par résonance magnétique (IRM) ont été réalisées. Quant aux souris *Xlf*^{-/-}, le poids moyen a tendance à diminuer chez les souris irradiées à faible dose alors que les

souris E14,5 sont plus vieilles et PN10 plus jeunes au moment des acquisitions IRM.

	WT			Xlf-/-		
	Sham	E14,5	PN10	Sham	E14,5	PN10
Effectifs	21	19	22	31	31	16
Poids (g)	24,7 ± 2,9	26,3 ± 2,0	26,6 ± 1,1	25,3 ± 1,5	23,1 ± 1,9	24,7 ± 2,5
Âge (jours)	73 ± 6	96 ± 16	84 ± 9	82 ± 7	84 ± 11	77 ± 8

TABLE 7.1 – Effectifs des 6 cohortes de souris étudiées dans ce chapitre. Le poids et l’âge moyen (moyenne ± écart-type (SD)) sont également indiqués pour les différents groupes au moment des acquisitions IRM.

Les souris étaient hébergées sans restriction ni alimentaire ni hydrique. La température était maintenue constante (19-22°C) avec un taux d’humidité entre 40 et 50 %. La luminosité dans la pièce d’hébergement était également fixée avec un cycle jour/nuit de 12h chacun. Les expérimentations animales ont été menées en accord avec la Directive européenne de 2010 et le comité d’éthique (APAFIS #20441-2019042915561380).

Les protocoles d’irradiation *in utero* et en période postnatale ont été présentés dans la section 4.1.1 du chapitre 4.

7.1.2 Protocole d’acquisition IRM

Le protocole d’acquisition mené sur les équipements détaillés dans la section 4.1.2 du chapitre 4 est décrit dans la section 4.2 du chapitre 4.

7.1.3 Analyses

Critère d’inclusion

La Table 7.2 résume les effectifs inclus pour les analyses volumétriques et portant sur les paramètres de diffusion.

Type d’analyse	WT			Xlf-/-		
	Sham	PN10	E14,5	Sham	PN10	E14,5
Volume	20	22	19	31	16	31
Diffusion	14	11	13	14	9	13

TABLE 7.2 – Nombre d’animaux inclus dans les groupes de souris non exposées (Sham), exposées au stade juvénile (PN10) et exposées *in utero* (E14,5) pour les analyses volumétrique et en diffusion.

Chez les souris non exposées, pour les mêmes raisons qu’évoquées dans le chapitre 5, l’analyse volumétrique a été conduite sur $N_{WTSham} = 20$ souris et l’analyse de diffusion sur $N_{WTSham} = 14$ souris. De même, nous avons vu dans le chapitre 6 que l’analyse volumétrique est conduite sur $N_{Xlf-/-Sham} = 31$ souris et l’analyse en diffusion sur $N_{Xlf-/-Sham} = 14$ souris.

Chez les souris irradiées PN10 ou E14,5 aucune lésion, œdème ou hypertrophie ventriculaire n'a été détecté sur les images obtenues en IRM anatomique. Toutes les souris irradiées à faible dose ont donc été incluses dans l'analyse volumétrique. Néanmoins des artefacts de type "ghosting" et/ou une variation du signal trop importante ($> 12\%$) entre chaque répétition sont présents dans les données obtenues en IRM de diffusion. Au total 50 % des souris WT PN10, 32% des souris WT E14,5, 44% des souris Xlf-/- PN10 et 58 % des souris Xlf-/- E14,5, des groupes respectifs ont été exclues.

Comparaisons inter-groupes et analyses statistiques

Pour les souris WT et Xlf-/- Sham, les moyennes et les écarts-types (SD) des volumes et des différents paramètres de diffusion ont déjà été calculés et présentés dans les chapitres 5 et 6.

De façon similaire les moyennes et SD des volumes ont été calculés à l'échelle totale du cerveau, de la substance grise (SG), de la substance blanche (SB), du liquide cébrospinal (LCS) et des 10 régions d'intérêt (ROI) définies, pour les souris irradiées à faible dose *in utero* ou en période postnatale. Les paramètres de diffusion (moyenne et SD) ont également été calculés dans les 11 ROI segmentées.

Comme dans les chapitres précédents (5 et 6), les comparaisons inter-groupes sont calculées uniquement entre deux groupes : un groupe irradié et un groupe non irradié. Au total, nous avons comparé les groupes :

- WT Sham et WT PN10,
- WT Sham et WT E14,5,
- Xlf-/- Sham et Xlf-/- PN10,
- Xlf-/- Sham et Xlf-/- E14,5

La variation normalisée entre les groupes irradiés et non exposés pour un paramètre P donné (volume ou paramètres de diffusion), est calculée chez les souris WT et Xlf-/- à partir des formules suivantes :

$$\Delta P_{WT_{PN10}} = \frac{P_{WT_{PN10}} - P_{WT_{Sham}}}{P_{WT_{Sham}}} \quad (7.1)$$

$$\Delta P_{WT_{E14,5}} = \frac{P_{WT_{E14,5}} - P_{WT_{Sham}}}{P_{WT_{Sham}}} \quad (7.2)$$

$$\Delta P_{Xlf-/-_{PN10}} = \frac{P_{Xlf-/-_{PN10}} - P_{Xlf-/-_{Sham}}}{P_{Xlf-/-_{Sham}}} \quad (7.3)$$

$$\Delta P_{Xlf-/-_{E14,5}} = \frac{P_{Xlf-/-_{E14,5}} - P_{Xlf-/-_{Sham}}}{P_{Xlf-/-_{Sham}}} \quad (7.4)$$

La variation de certains paramètres a été projetée sur le template souris TMBTA présenté dans la section 4.4.1 du chapitre 4 pour permettre une meilleure visualisation des effets de l'irradiation.

La significativité des comparaisons inter-groupes sur les paramètres estimés à partir des images IRM est calculée à l'aide d'un test de Student bilatéral. Le seuil de significativité est fixé à $p < 0,05$.

En ce qui concerne les données comportementales et histologiques, pour les deux groupes les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne (SEM). La significativité statistique entre les deux groupes est déterminée à partir d'un test de Mann-Whitney réalisé avec le logiciel Prism. Le seuil de significativité est fixé à $p < 0,05$.

7.2 Résultats

7.2.1 Apoptose précoce radio-induite par l'exposition à de faibles doses

Dès 4h post-irradiation *in utero*, l'apoptose a été mesurée chez les embryons Xlf^{-/-} et WT irradiés (au stade E14,5) à une dose de 100 mGy au Laboratoire des RadioPathologies (LRP, CEA, Fontenay-aux-Roses). L'apoptose n'a pas été mesurée chez les souriceaux à PN10, juste après l'irradiation. Le protocole du double marquage au DAPI (4',6 diamidino-2-phénylindole) et à la caspase 3 clivée (CC3), est identique à celui appliqué aux chapitres 5 et 6 (voir annexe D) et les embryons WT et Xlf^{-/-} non irradiés sont les mêmes que ceux utilisés dans le chapitre 6.

D'après la Figure 7.1, une augmentation du nombre de cellules positives à la CC3 est significative chez les embryons irradiés, à E14,5 aussi bien chez les WT (3 fois plus important) que chez les Xlf^{-/-} (5 fois plus important) par rapport aux souris Sham respectives (N = 4 pour chaque groupe).

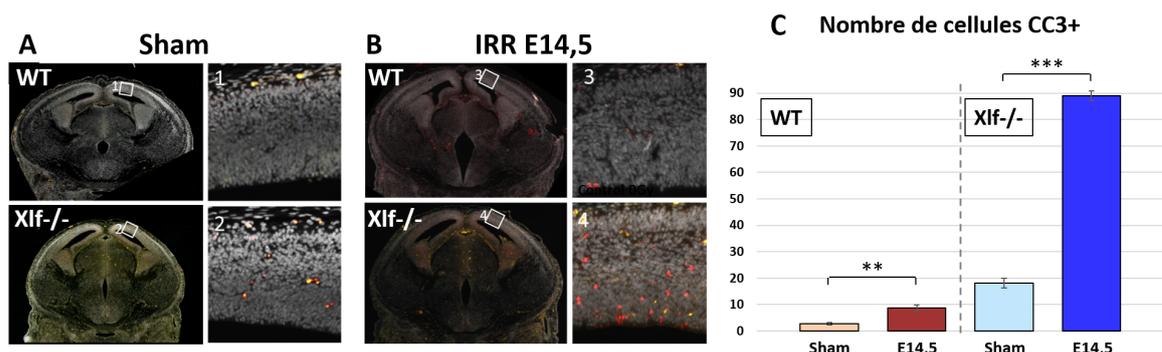


FIGURE 7.1 – L'irradiation *in utero* à faible dose induit une apoptose des cellules cérébrales de l'embryon en phase aiguë (4h post-irradiation) plus importante chez les souris Xlf^{-/-} que chez les souris WT. Coupes axiales doublement marquées au DAPI (gris) et à la CC3 (rouge) chez un embryon WT et Xlf^{-/-} Sham (A) et irradié à 100 mGy à E14,5 (B). Les encarts numérotés de 1 à 4 correspondent au zoom (x10) des régions correspondantes. (C) Moyenne \pm SEM du nombre de cellules positives pour la CC3 chez le groupe WT Sham (beige), WT E14,5 (marron), Xlf^{-/-} Sham (bleu clair) et Xlf^{-/-} E14,5 (bleu foncé) avec N = 4 embryons pour chaque groupe. La significativité des résultats a été calculée avec un test de Mann-Whitney : *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

7.2.2 L'impact à l'âge adulte sur le comportement des souris irradiées *in utero* à faible dose

À l'âge adulte, et quel que soit le groupe étudié, les souris ne présentaient pas de problème de prise alimentaire ou hydrique.

D'une part, des tests comportementaux (détaillés en annexe C) sur des souris WT et Xlf^{-/-} Sham et irradiées uniquement *in utero*, autres que celles qui ont servi à l'imagerie ont été menés au Laboratoire de RadioPathologie (LRP, CEA, Fontenay-aux-Roses). Ces différents tests n'ont pas encore été menés chez les souris irradiées à PN10.

Avec le test de l'"open-field" (OF), nous n'avons pas relevé de changement significatif en termes de locomotion ou d'anxiété entre les souris E14,5 (irradiées) et Sham (non irradiées) aussi bien dans le groupe WT que dans le groupe Xlf^{-/-}. Il peut juste être noté une tendance à une diminution de la distance parcourue chez les souris Xlf^{-/-} E14,5 par rapport aux souris Xlf^{-/-} Sham (Figure 7.2 A).

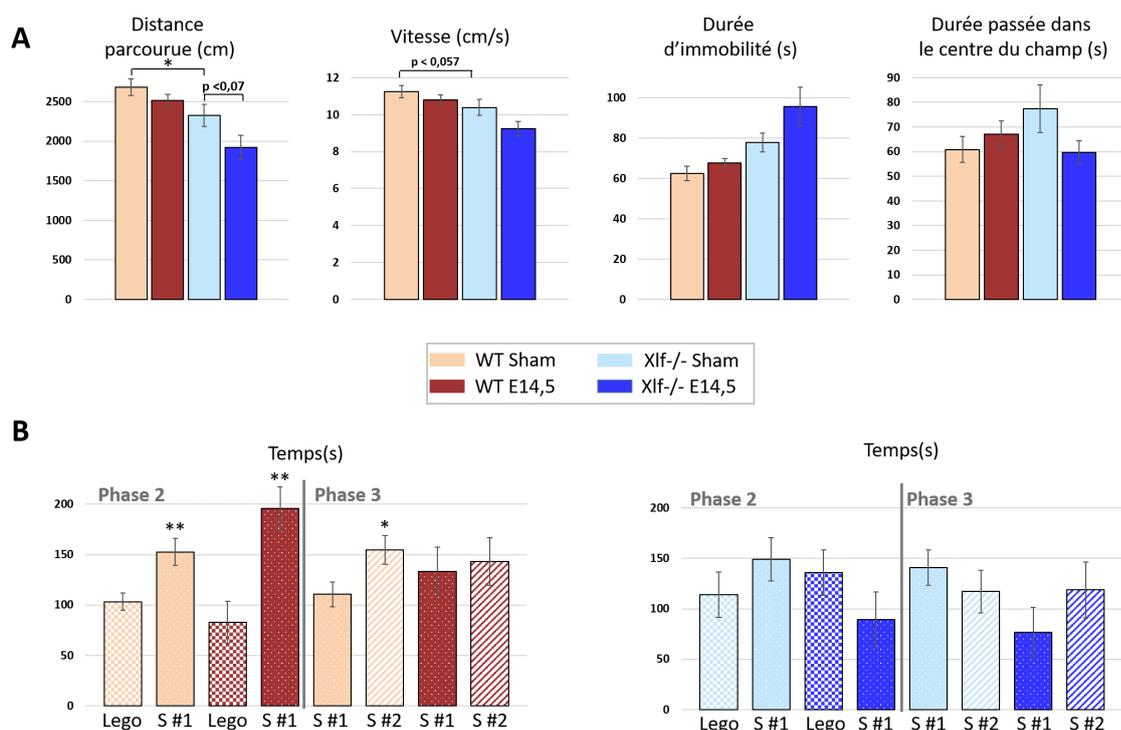


FIGURE 7.2 – L'irradiation *in utero* à faible dose affecte le comportement social des souris Xlf^{-/-} adultes plus manifestement que chez les souris WT. (A) Moyenne ± SEM de la distance parcourue (cm), de la vitesse (cm/s), de la durée d'immobilité (s) et de la durée passée dans le centre du champ (s) chez les souris WT Sham ($N_{WTSham} = 11$), WT E14,5 ($N_{WTE14,5} = 18$), Xlf^{-/-} Sham ($N_{Xlf-/-Sham} = 16$) et Xlf^{-/-} E 14,5 ($N_{Xlf-/-E14,5} = 15$) avec le test de l'OF. (B) Moyenne ± SEM du temps passé à explorer le légo, la souris 1 (S #1) et la souris 2 (S #2) durant les phases 2 et 3 du "3 chamber test for sociability and recognition" chez les souris WT Sham ($N_{WTSham} = 11$), WT E14,5 ($N_{WTE14,5} = 10$), Xlf^{-/-} Sham ($N_{Xlf-/-Sham} = 11$) et Xlf^{-/-} E14,5 ($N_{Xlf-/-E14,5} = 10$). La significativité des résultats a été calculée avec un test de Mann-Whitney : ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Le test du "Three chamber test for sociability and recognition" présenté en Figure 7.2 B, révèle que les comportements d'interactions sociales sont similaires pour la phase 2 du test entre les souris WT E14,5 et les souris WT Sham, c'est-à-dire qu'elles passent significativement plus de temps avec la souris 1 (S #1) qu'avec le légo. Pour la phase 3, l'augmentation du temps passé avec la souris 2 (S #2) n'est plus significative par rapport au temps passé avec S #1 chez les souris WT E14,5 contrairement aux souris WT Sham (partie gauche de la Figure 7.2,B). Concernant les souris *Xlf*^{-/-}, le groupe irradié au stade E14,5 présente un temps d'exploration identique entre le légo et la souris S #1 lors de la phase 2 du test. En revanche, les souris *Xlf*^{-/-} E14,5 ont tendance à s'intéresser davantage à la souris S #2 qu'à la S #1 pendant la phase 3 du test par comparaison aux souris *Xlf*^{-/-} Sham, comme le ferait une souris WT Sham (partie droite de la Figure 7.2,B).

7.2.3 Altérations volumétriques estimées à l'âge adulte chez les souris irradiées à faible dose

Chez les animaux sauvages (WT)

Comme présenté dans la Figure 7.3, l'analyse statistique ne révèle aucune variation de volume significative entre les groupes Sham et PN10. Néanmoins, nous avons pu observer une légère atrophie significative de -3% du volume cérébral total (SB+SG, $p = 1,5 \times 10^{-2}$) ainsi que de la SB (-5%, $p = 3,9 \times 10^{-2}$) chez les souris E14,5 par rapport aux souris Sham. Le volume de LCS est, quant à lui, augmenté de façon significative chez les souris WT irradiées *in utero* (+25%, $p = 2,8 \times 10^{-3}$).

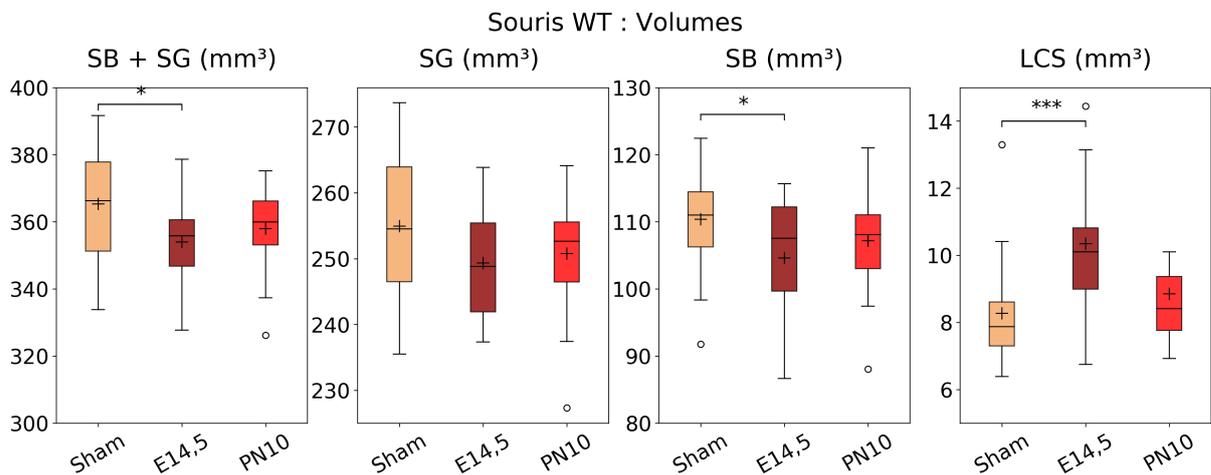


FIGURE 7.3 – L'irradiation *in utero* à faible dose n'induit pas de conséquences majeures sur la volumétrie cérébrale des souris sauvages adultes. Volumes des différents compartiments cérébraux issus de la segmentation pour le groupe de souris sauvages (WT) non exposées (Sham, beige), exposées à 100 mGy *in utero* (E14,5, marron) et en postnatal (PN10, rouge). La croix et la ligne symbolisent respectivement la moyenne et la médiane. La boîte s'étend du premier (Q1) au troisième (Q3) quartile et les extrémités des moustaches délimitent l'intervalle de confiance : $[Q1 - 1,5 \times IQR; Q3 + 1,5 \times IQR]$, avec IQR l'intervalle interquartile. La significativité des résultats a été calculée avec un test de Student : *** $p < 0,005$; * $p < 0,05$.

À plus petite échelle, les variations de volume des groupes PN10 et E14,5 par rapport au groupe Sham est calculé pour les 10 structures cérébrales définies (Figure 7.4). Seules les ROI du Cer, du Ctx et du BO présentent une variation de volume significative ($p < 0,05$) chez le groupe irradié à E14,5 par rapport au groupe Sham. La variation de volume dans ces régions s'élève à -2,7% dans le Cer ($p = 1,8 \times 10^{-2}$), à -2,5% dans le Ctx ($p = 2,0 \times 10^{-2}$) et à +3,5% dans le BO ($p = 1,5 \times 10^{-2}$). Le volume du Ctx est également réduit pour les souris PN 10 par rapport au groupe Sham (-2,0%, $p = 2,9 \times 10^{-2}$).

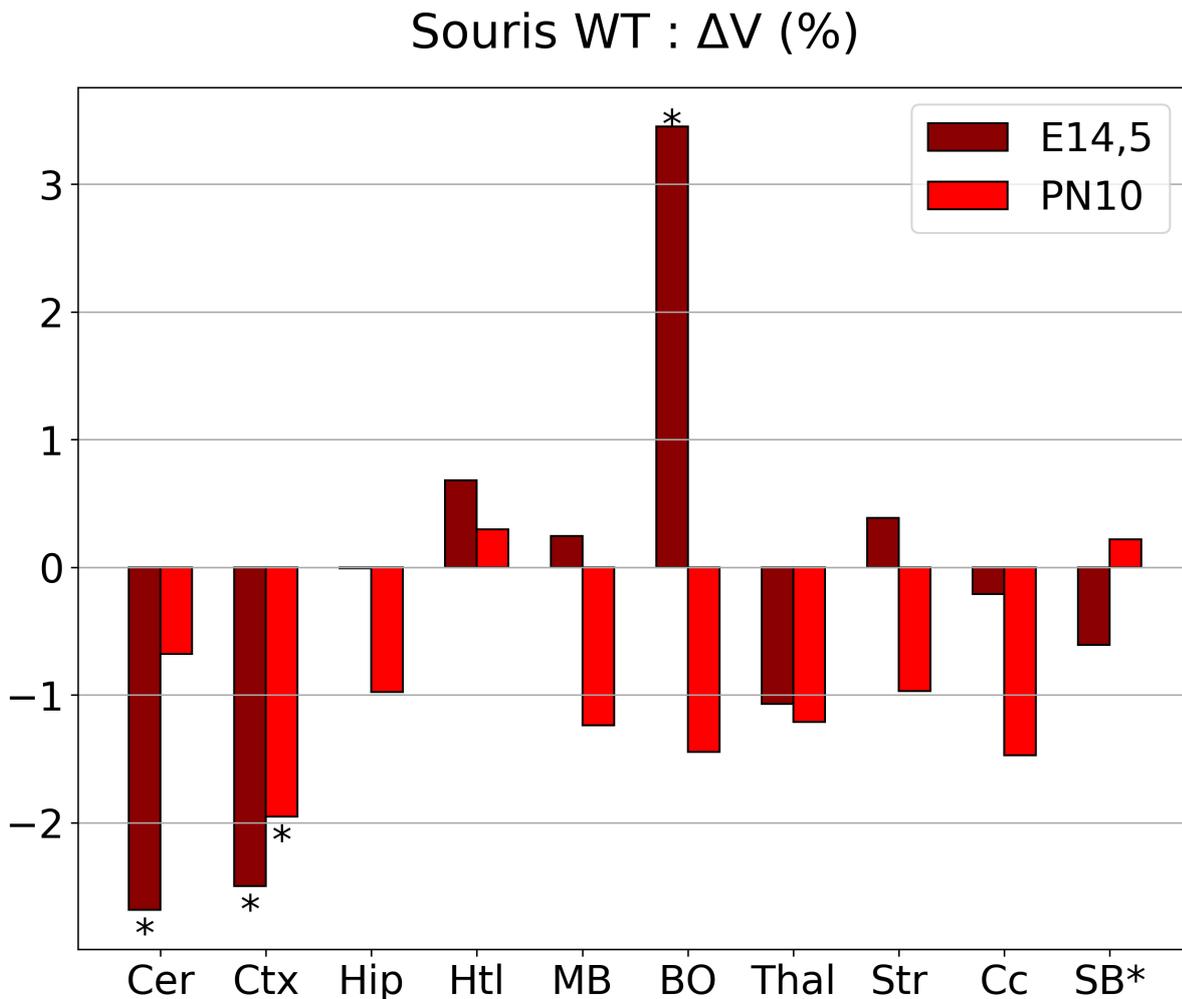


FIGURE 7.4 – L’irradiation *in utero* à faible dose provoque des altérations significatives chez la souris sauvage. Variations relatives du volume ΔV dans les différentes ROI chez les souris WT exposées à 100 mGy lors du développement embryonnaire (E14,5 marron) et lors de la période postnatale (PN10 rouge) : cervelet (Cer), cortex (Ctx), hippocampe (Hip), hypothalamus (Htl), mésencéphale (MB), bulbe olfactif (BO), thalamus (Thal), striatum (Str), corps calleux (Cc) et zones de substance blanche (Cc exclu, SB*). La significativité des résultats a été calculée avec un test de Student : * $p < 0,05$.

Chez les animaux transgéniques (Xlf-/-)

L’analyse statistique ne révèle aucune variation de volume significative entre les groupes Sham et PN10 (Figure 7.5). Néanmoins, l’irradiation *in utero* à faible dose entraîne une

atrophie significative de -3,9% du volume cérébral total (SB+SG, $p = 1,8 \times 10^{-5}$) ainsi que de la SG (-4,4%, $p = 1,2 \times 10^{-6}$) chez les souris Xlf^{-/-} E14,5 par rapport aux souris Xlf^{-/-} Sham.

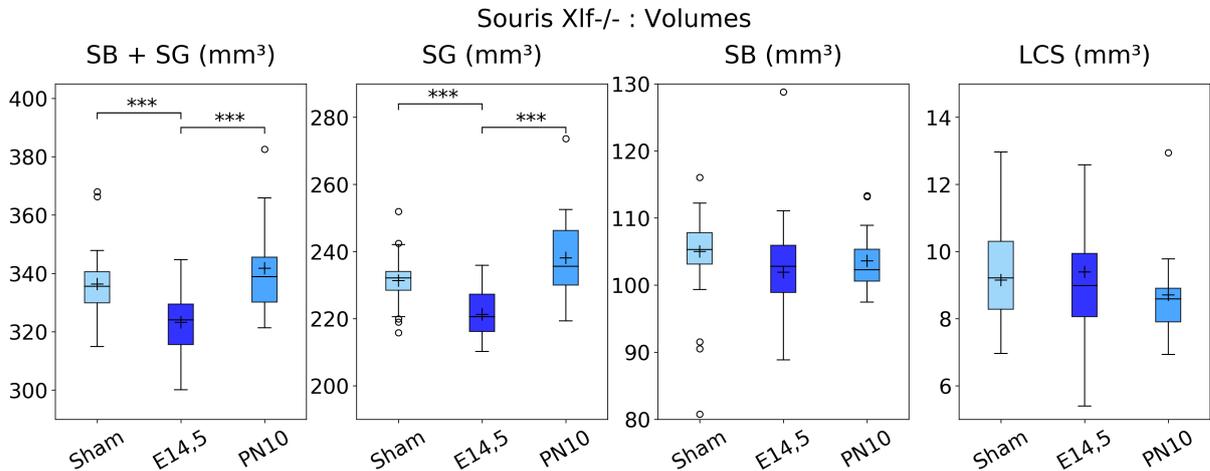


FIGURE 7.5 – L’irradiation *in utero* à faible dose provoque des atrophies cérébrales majeures et significatives chez les souris Xlf^{-/-} adultes. Volumes des différents compartiments cérébraux issus de la segmentation pour le groupe de souris génétiquement modifiées (Xlf^{-/-}) non irradié (Sham, bleu clair), irradié à une dose de 100 mGy *in utero* (E14,5, bleu foncé) ou en postnatal (PN10, bleu clair). La croix et la ligne symbolisent respectivement la moyenne et la médiane. La boîte s’étend du premier (Q1) au troisième (Q3) quartile et les extrémités des moustaches délimitent l’intervalle de confiance : $[Q1 - 1,5 \times IQR; Q3 + 1,5 \times IQR]$, avec IQR correspondant à l’intervalle interquartile. La significativité des résultats a été calculée avec un test de Student : *** $p < 0,005$.

Pour l’étude de volumétrie des différentes structures cérébrales, nous avons pu observer que l’ensemble des ROI présentent une variation de volume significative ($p < 0,005$) dans le groupe Xlf^{-/-} irradié à E14,5 par rapport au groupe Sham (Figure 7.6). La diminution de volume dans ces régions est comprise entre -3,3% dans le Cer ($p = 6,2 \times 10^{-4}$) et -8,8% dans le Cc ($p = 6,9 \times 10^{-11}$). Seul le BO présente une diminution significative de volume dans le groupe PN10 par rapport au groupe Sham (-3,6%, $p = 2,2 \times 10^{-4}$).

Comme présenté sur la Figure 7.7, les cartes de radiosensibilité cérébrale mettent en évidence une diminution de volume plus importante dans le Cc que dans les différentes régions de la SG dans le groupe Xlf^{-/-} irradié à E14,5 par rapport au groupe Xlf^{-/-} Sham. De plus, nous pouvons noter une variation volumétrique plus importante dans le Ctx (-6,5%, $p = 1,2 \times 10^{-10}$) et le Str (-7,1%, $p = 1,7 \times 10^{-11}$) que dans les autres ROI du cerveau (Thal : -5,2% $p = 3,7 \times 10^{-5}$, BO : -4,4% $p = 2,2 \times 10^{-4}$, Hip : -4,3% $p = 9,8 \times 10^{-4}$ et Htl : -3,8% $p = 1,3 \times 10^{-4}$) chez les souris irradiées *in utero* à faible dose par rapport aux souris non irradiées.

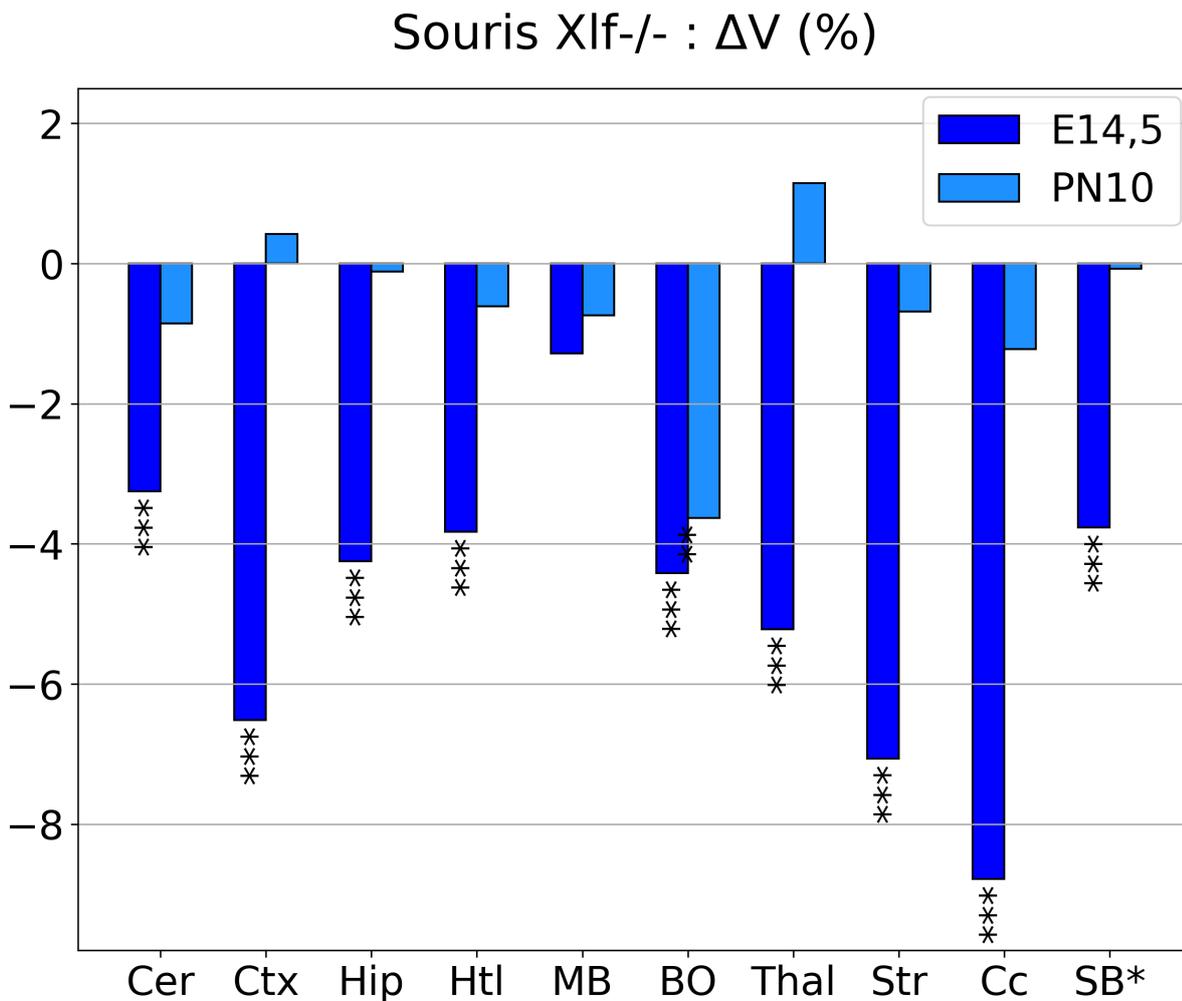


FIGURE 7.6 – L’irradiation *in utero* à faible dose provoque des atrophies cérébrales majeures et significatives à l’échelle des ROI chez les souris Xlf^{-/-} adultes. Variations relatives du volume ΔV dans les différentes ROI chez les souris Xlf^{-/-} exposées à 100 mGy au stade embryonnaire (E14,5, bleu foncé) ou en période postnatale (PN10, bleu clair). La significativité des résultats a été calculée avec un test de Student : *** $p < 0,005$.

7.2.4 Altérations de la microstructure cérébrale estimée à l’âge adulte chez les souris irradiées à faible dose

Substance grise

Chez les animaux sauvages (WT)

Comme présenté dans la Figure 7.8, les valeurs des paramètres de diffusion (ADC_0 , $sADC$ et SI) sont similaires entre les souris WT non irradiées et celles irradiées en période postnatale (PN10) puisqu’aucune différence significative n’a pu être mise en évidence entre ces deux groupes d’animaux. Toutefois, l’irradiation *in utero* entraîne des modifications des paramètres ADC_0 , $sADC$ et SI par comparaison aux souris non irradiées dans certaines régions appartenant à la SG. Par exemple, les valeurs de $sADC$ sont réduites de 1,6% ($p = 1,2 \times 10^{-2}$) tandis que les valeurs de SI sont augmentées jusqu’à 8,4% ($p = 1,2 \times 10^{-2}$) dans l’Htl. Les variations des paramètres sont également significatives dans le MB et

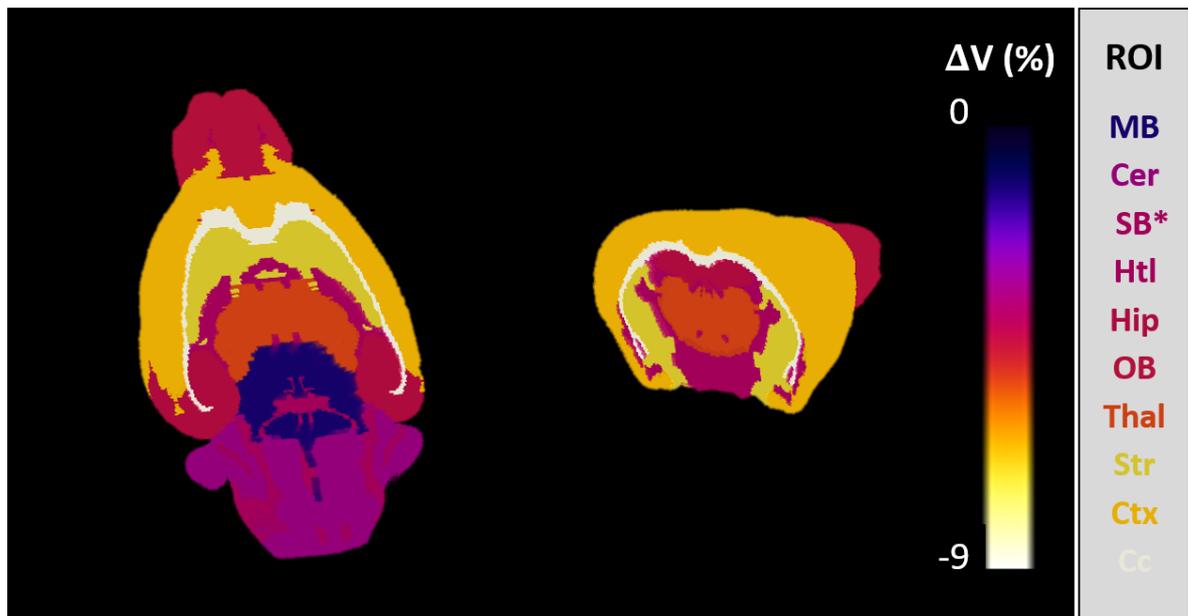


FIGURE 7.7 – Variations relatives du volume $\Delta V_{Xlf-/-E14,5}$ projetées sur une coupe coronale et axiale du template souris TMBTA. Cette représentation prend en compte toutes les variations, même celles qui ne sont pas significatives.

le Thal. Chez ces souris WT E14,5, les valeurs d' ADC_0 ont tendance à diminuer dans les différentes régions de la SG, hormis pour le Cer et la ZSV. Parmi les structures étudiées, seul l'Hip présente un ADC_0 significativement diminué d'environ 1% ($p = 1,0 \times 10^{-3}$).

D'autre part, d'après les Tables 7.3, 7.4 et 7.5, peu de variations des paramètres K, f_{IVIM} et D^* sont notables et significatives entre les trois groupes. En effet K est augmenté chez les souris WT irradiées à E14,5 dans la seule région du BO (+3%, $p = 2,8 \times 10^{-4}$) (Table 7.3) tandis que f_{IVIM} est diminué chez les souris irradiées à PN10 dans le Ctx (-11%, $p = 4,1 \times 10^{-2}$) (Table 7.4). Une diminution significative de la valeur de D^* a également été montrée dans le Ctx pour les groupes WT PN10 (-18%, $p = 3,3 \times 10^{-2}$) et E14,5 (-16%, $p = 3,9 \times 10^{-2}$) par rapport au groupe WT Sham (Table 7.5).

Chez les animaux transgéniques (Xlf-/-)

Les variations relatives des paramètres de diffusion (ADC_0 , sADC, K, f_{IVIM} et D^*) sont présentées sur la Figure 7.9 et les Tables 7.6, 7.7, 7.8.

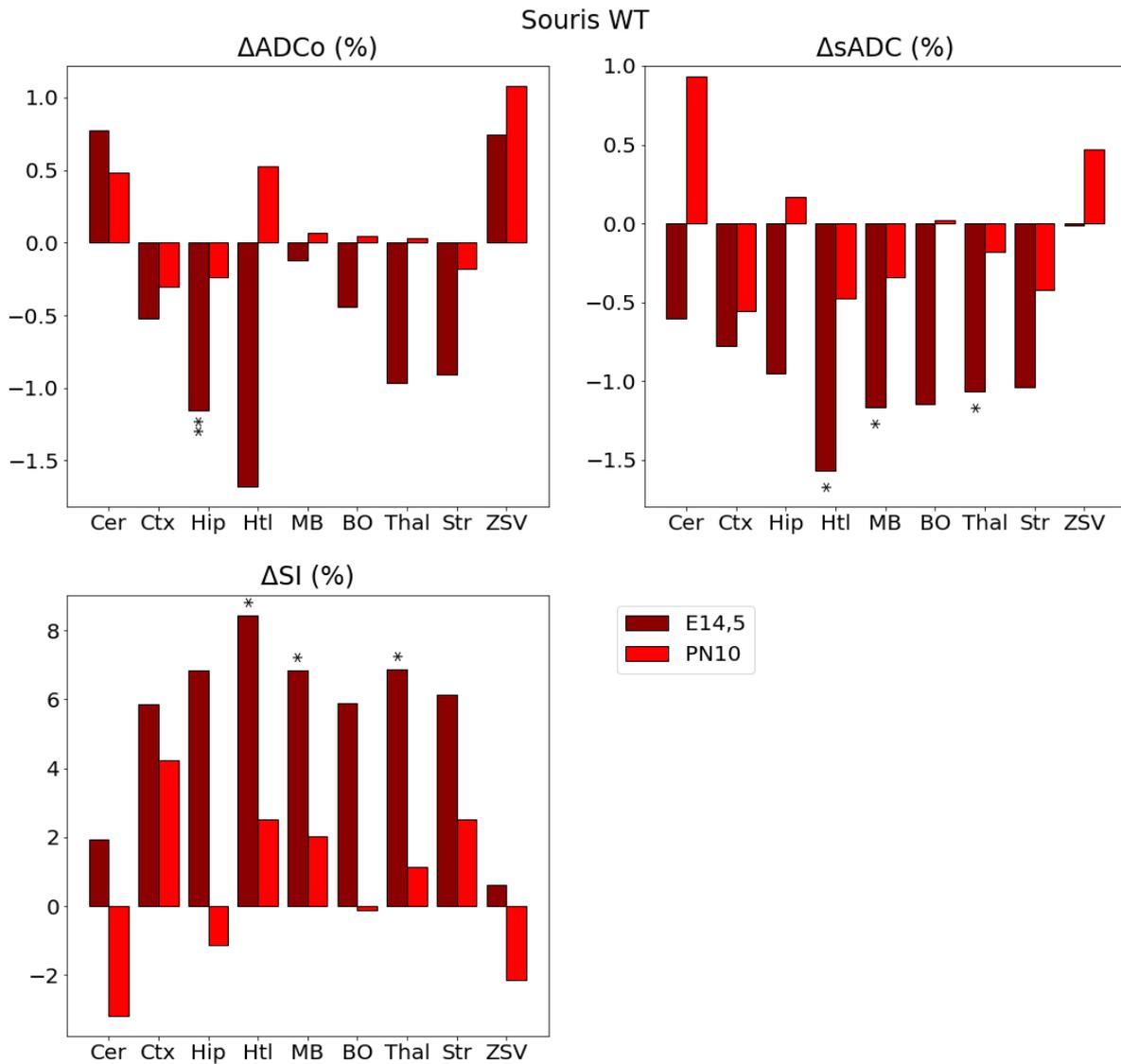


FIGURE 7.8 – L’irradiation faible dose modifie les valeurs d’ADC₀, de sADC et de S-Index (SI) chez les souris WT adultes. Variations relatives des paramètres de diffusion ADC₀, sADC et SI chez les souris WT dans les régions d’intérêt de la SG. Les variations du groupe de souris exposées à 100 mGy par rapport aux souris non irradiées figurent en marron pour l’irradiation *in utero* et en rouge pour l’irradiation postnatale. La significativité des résultats a été calculée avec un test de Student : ** p < 0,01 ; *p < 0,05.

Souris WT : Kurtosis

ROI	Sham	E14,5	PN10	$p_{E14,5/Sham}$	$p_{PN10/Sham}$
Cer	0,77 ± 0,03	0,77 ± 0,06	0,75 ± 0,06	0,89	0,22
Ctx	0,53 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,09	0,37
Hip	0,58 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,86	0,99
Htl	0,68 ± 0,03	0,68 ± 0,08	0,71 ± 0,04	0,74	0,09
MB	0,72 ± 0,02	0,73 ± 0,02	0,72 ± 0,02	0,06	0,77
BO	0,70 ± 0,01	0,73 ± 0,01	0,71 ± 0,02	2,8 × 10⁻⁴	0,83
Thal	0,66 ± 0,03	0,66 ± 0,02	0,67 ± 0,02	0,56	0,50
Str	0,61 ± 0,02	0,62 ± 0,02	0,61 ± 0,02	0,12	0,69
ZSV	0,62 ± 0,03	0,63 ± 0,03	0,62 ± 0,02	0,33	0,85

TABLE 7.3 – L’irradiation faible dose n’affecte pas la valeur du kurtosis chez les souris WT adultes. Moyenne ± SD de K (Kurtosis) calculé dans les ROI de la SG pour les groupes WT Sham, E14,5 et PN10. Les valeurs de significativité statistiques $p_{E14,5/Sham}$ et $p_{PN10/Sham}$ ont été calculées pour les deux comparaisons : E14,5 et PN10 par rapport au groupe Sham. Seuls les résultats qui apparaissent en caractères gras sont significatifs.

Souris WT : f_{IVIM}

ROI	Sham	E14,5	PN10	$p_{E14,5/Sham}$	$p_{PN10/Sham}$
Cer	3,0 ± 0,6	3,2 ± 1,0	3,2 ± 0,5	0,73	0,65
Ctx	2,0 ± 0,2	1,8 ± 0,4	1,7 ± 0,3	0,19	0,04
Hip	1,7 ± 0,4	1,7 ± 0,6	1,7 ± 0,4	0,98	0,93
Htl	3,4 ± 0,6	3,4 ± 1,0	3,0 ± 0,5	0,98	0,15
MB	3,6 ± 0,6	3,5 ± 0,5	3,6 ± 0,4	0,85	0,81
BO	2,7 ± 0,6	2,9 ± 0,3	2,8 ± 0,4	0,14	0,42
Thal	2,5 ± 0,3	2,7 ± 0,3	2,6 ± 0,4	0,26	0,83
Str	2,2 ± 0,3	2,2 ± 0,3	2,2 ± 0,3	0,68	0,69
ZSV	3,7 ± 0,9	3,6 ± 0,4	3,3 ± 1,0	0,80	0,39

TABLE 7.4 – L’irradiation faible dose n’affecte pas la valeur de f_{IVIM} chez les souris WT adultes. Moyenne ± SD de f_{IVIM} (%) calculés dans les ROI de la SG pour les groupes WT Sham, E14,5 et PN10. Les valeurs de significativité statistiques $p_{E14,5/Sham}$ et $p_{PN10/Sham}$ ont été calculées pour les deux comparaisons : E14,5 et PN10 par rapport au groupe Sham. Seuls les résultats qui apparaissent en caractères gras sont significatifs.

Souris WT : D*

ROI	Sham	E14,5	PN10	$p_{E14,5/Sham}$	$p_{PN10/Sham}$
Cer	7,7 ± 2,6	13,0 ± 12,1	8,6 ± 3,8	0,15	0,54
Ctx	16,1 ± 3,1	13,4 ± 3,3	13,3 ± 3,0	0,04	0,03
Hip	7,7 ± 0,7	7,8 ± 1,8	8,0 ± 1,1	0,88	0,48
Htl	7,0 ± 1,1	8,1 ± 2,7	8,2 ± 2,3	0,20	0,18
MB	9,0 ± 1,0	12,9 ± 9,8	9,0 ± 1,4	0,18	0,96
BO	8,8 ± 1,0	9,6 ± 1,4	9,8 ± 1,5	0,09	0,09
Thal	10,7 ± 2,4	11,1 ± 2,1	11,6 ± 3,5	0,68	0,50
Str	15,1 ± 7,7	15,9 ± 10,8	18,1 ± 10,7	0,83	0,43
ZSV	9,1 ± 2,7	10,2 ± 4,0	13,8 ± 13,1	0,39	0,29

TABLE 7.5 – L’irradiation faible dose n’affecte pas la valeur de D* chez les souris WT adultes. Moyenne ± SD de D* (10^{-3} mm²/s) calculés dans les ROI de la SG pour les groupes WT Sham, E14,5 et PN10. Les valeurs de significativité statistiques $p_{E14,5/Sham}$ et $p_{PN10/Sham}$ ont été calculées pour les deux comparaisons : E14,5 et PN10 par rapport au groupe Sham. Seuls les résultats qui apparaissent en caractères gras sont significatifs.

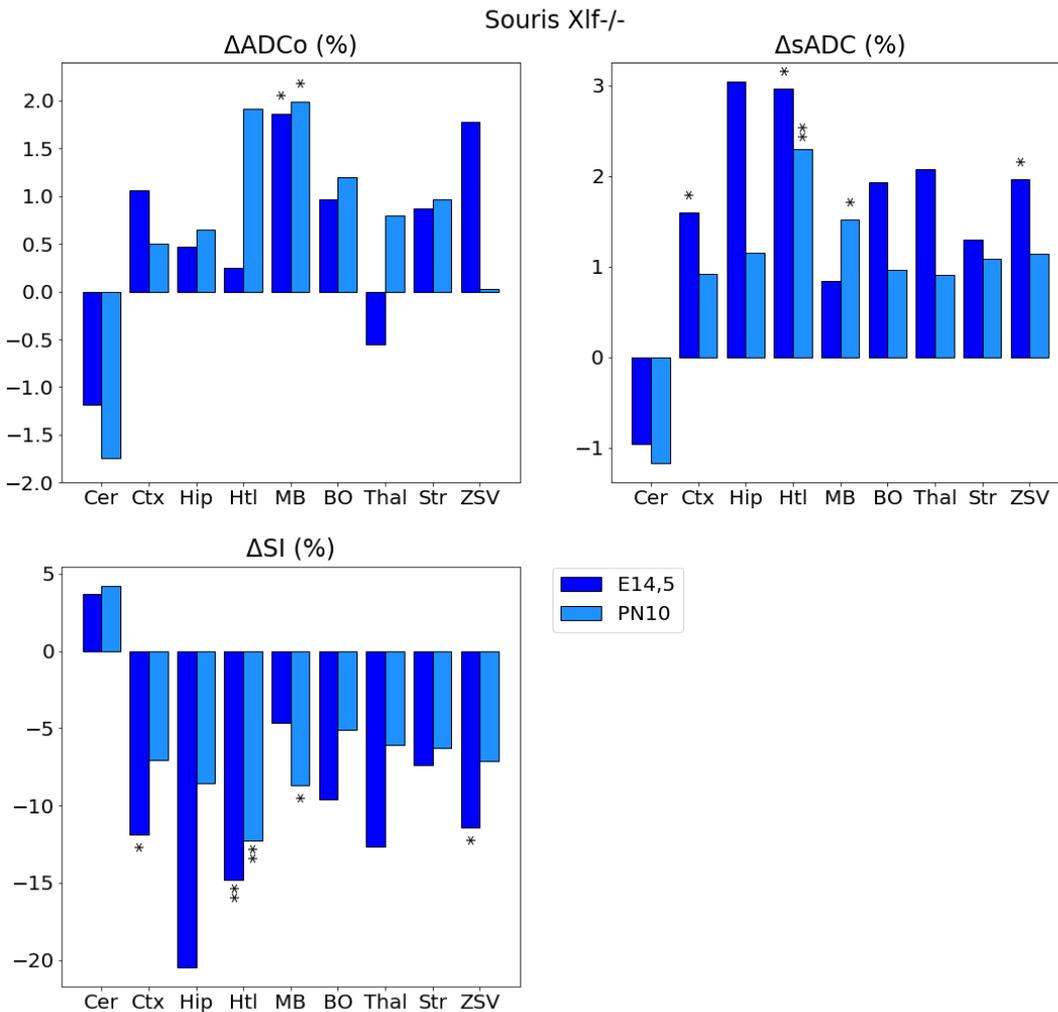


FIGURE 7.9 – L’irradiation faible dose engendre des variations dans l’estimation des paramètres ADC₀, sADC et S-Index (SI) chez les souris Xlf^{-/-} adultes. Variations relatives des paramètres de diffusion ADC₀, sADC et SI chez les souris transgéniques Xlf^{-/-} dans les régions d’intérêt de la SG. Les variations du groupe de souris exposées à 100 mGy par rapport aux souris non irradiées figurent en bleu foncé pour l’irradiation *in utero* et en bleu clair pour l’irradiation postnatale. La significativité des résultats a été calculée avec un test de Student : ** p<0,01 ; *p<0,05.

Souris Xlf-/- : K

ROI	Sham	E14,5	PN10	$p_{E14,5/Sham}$	$p_{PN10/Sham}$
Cer	0,75 ± 0,06	0,69 ± 0,08	0,75 ± 0,03	1,9 x 10⁻²	0,85
Ctx	0,54 ± 0,01	0,52 ± 0,02	0,53 ± 0,01	1,4 x 10⁻²	0,08
Hip	0,58 ± 0,03	0,55 ± 0,10	0,57 ± 0,01	0,31	0,51
Htl	0,70 ± 0,03	0,66 ± 0,06	0,69 ± 0,04	5,2 x 10 ⁻²	0,66
MB	0,71 ± 0,02	0,72 ± 0,03	0,71 ± 0,01	0,31	0,81
BO	0,72 ± 0,02	0,69 ± 0,08	0,72 ± 0,02	0,16	0,68
Thal	0,66 ± 0,02	0,61 ± 0,11	0,65 ± 0,01	0,09	5,0 x 10⁻²
Str	0,61 ± 0,02	0,60 ± 0,03	0,61 ± 0,01	5,1 x 10 ⁻²	0,3
ZSV	0,63 ± 0,02	0,62 ± 0,03	0,61 ± 0,02	0,15	1,8 x 10⁻²

TABLE 7.6 – L’irradiation faible dose engendre des variations dans l’estimation de K chez les souris Xlf-/- adultes. Moyenne ± SD de K calculés dans les ROI de la SG pour les groupes Xlf-/- Sham, E14,5 et PN10. Les valeurs de significativité statistiques $p_{E14,5/Sham}$ et $p_{PN10/Sham}$ ont été calculées pour les deux comparaisons : E14,5 et PN10 par rapport au groupe Sham. Seuls les résultats qui apparaissent en caractères gras sont significatifs.

Contrairement aux souris WT, les souris Xlf-/- irradiées lors de l’embryogenèse (E14,5) ou en période postnatale (PN10) présentent des variations significatives de certains paramètres de diffusion dans plusieurs régions de la SG. Par exemple, la valeur d’ADC₀ est augmentée d’environ 2% dans le MB pour les souris Xlf-/- E14,5 ($p = 3,2 \times 10^{-2}$) et pour les souris Xlf-/- PN10 ($p = 2,4 \times 10^{-2}$) (Figure 7.9). Les augmentations des valeurs de sADC et les diminutions des valeurs de SI sont significatives dans l’Htl et le MB pour le groupe PN10 tandis que chez les souris Xlf-/- irradiées au stade E14,5, l’Htl mais aussi le Ctx et la ZSV présentent une valeur de sADC plus élevée et une valeur de SI plus faible par rapport au groupe Xlf-/- Sham (Figure 7.9). De plus, les souris Xlf-/- E14,5 présentent une diminution des valeurs de K de 9% dans le Cer ($p = 1,9 \times 10^{-2}$) et d’environ 3% dans le Ctx ($p = 1,4 \times 10^{-2}$) (Table 7.6). Cependant, les paramètres f_{IVIM} (Table 7.7) et D^* (Table 7.8) ne varient pas significativement chez ces souris. Chez les souris PN10 le paramètre f_{IVIM} diminue de façon significative dans le Ctx (-11%, $p = 1,1 \times 10^{-2}$), le MB (-14%, $p = 1,8 \times 10^{-2}$) et la ZSV (-22%, $p = 6,0 \times 10^{-3}$) (Table 7.7). Les valeurs du kurtosis sont également diminuées de 4% dans la ZSV ($p = 1,8 \times 10^{-2}$) et de 2% dans le Thal ($p = 5,0 \times 10^{-2}$) chez les souris Xlf-/- PN10 par rapport aux souris Xlf-/- Sham (Table 7.6).

7.2.5 Substance blanche

Chez les animaux sauvages (souris WT)

Les variations des paramètres de diffusion anisotrope dans le Cc et la SB* sont présentées sur la Figure 7.10. Les souris irradiées à E14,5 présentent des valeurs de sMD, sAD et sRD plus faibles et des valeurs de sFA et SI3 plus élevées que les souris Sham. Ces différences sont significatives uniquement pour les paramètres sMD (-1,7%, $p = 8,7 \times 10^{-3}$) et sAD (-1,7%, $p = 7,8 \times 10^{-3}$). Dans la SB*, l’irradiation pendant la période

Souris Xlf-/- : f_{IVIM}

ROI	Sham	E14,5	PN10	$p_{E14,5/Sham}$	$p_{PN10/Sham}$
Cer	3,1 ± 0,6	3,2 ± 0,9	3,4 ± 0,7	0,65	0,34
Ctx	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,3	1,6 ± 0,1	0,35	1,1 x 10⁻²
Hip	1,7 ± 0,4	2,0 ± 0,6	1,6 ± 0,3	0,12	0,38
Htl	3,3 ± 0,9	3,5 ± 1,2	2,8 ± 0,6	0,57	0,20
MB	3,7 ± 0,5	3,5 ± 0,4	3,2 ± 0,4	0,18	1,8 x 10⁻²
BO	2,7 ± 0,3	2,9 ± 0,3	2,5 ± 0,3	0,07	0,21
Thal	2,6 ± 0,4	3,0 ± 0,9	2,5 ± 0,3	0,14	0,29
Str	2,3 ± 0,3	2,4 ± 0,3	2,3 ± 0,5	0,11	0,89
ZSV	3,8 ± 0,6	4,3 ± 0,9	3,0 ± 0,6	0,15	6,0 x 10⁻³

TABLE 7.7 – L’irradiation faible dose engendre des variations dans l’estimation de f_{IVIM} chez les souris Xlf-/- adultes. Moyenne ± SD de f_{IVIM} calculés dans les ROI de la SG pour les groupes Xlf-/- Sham, E14,5 et PN10. Les valeurs de significativité statistiques $p_{E14,5/Sham}$ et $p_{PN10/Sham}$ ont été calculées pour les deux comparaisons : E14,5 et PN10 par rapport au groupe Sham. Seuls les résultats qui apparaissent en caractères gras sont significatifs.

Souris Xlf-/- : D*

ROI	Sham	E14,5	PN10	$p_{E14,5/Sham}$	$p_{PN10/Sham}$
Cer	16,4 ± 14,0	16,9 ± 13,3	12,4 ± 15,2	0,93	0,55
Ctx	14,4 ± 2,0	15,1 ± 4,9	13,6 ± 4,4	0,65	0,63
Hip	7,3 ± 1,4	8,4 ± 2,2	6,8 ± 0,9	0,15	0,32
Htl	7,5 ± 1,4	7,7 ± 2,0	15,6 ± 16,8	0,85	0,22
MB	8,5 ± 1,2	9,5 ± 1,6	8,8 ± 2,2	0,11	0,73
BO	9,6 ± 1,7	11,0 ± 5,1	10,9 ± 3,3	0,37	0,34
Thal	11,7 ± 2,8	12,2 ± 5,2	11,2 ± 4,3	0,30	0,79
Str	17,9 ± 9,9	17,4 ± 10,9	25,8 ± 16,2	0,90	0,24
ZSV	11,4 ± 11,2	9,4 ± 3,3	15,8 ± 14,0	0,53	0,45

TABLE 7.8 – L’irradiation faible dose engendre des variations dans l’estimation de D* chez les souris Xlf-/- adultes. Moyenne ± SD de D* (10^{-3} mm²/s) calculés dans les ROI de la SG pour les groupes Xlf-/- Sham, E14,5 et PN10. Les valeurs de significativité statistiques $p_{E14,5/Sham}$ et $p_{PN10/Sham}$ ont été calculées pour les deux comparaisons : E14,5 et PN10 par rapport au groupe Sham. Seuls les résultats qui apparaissent en caractères gras sont significatifs.

postnatale tend à augmenter tous les paramètres par comparaison aux souris WT non irradiées. Pour les souris WT irradiées *in utero* (E14,5), seuls les paramètres de sFA et de SI3 ont tendance à augmenter alors que les paramètres de sMD, de sAD et de sRD ont tendance à diminuer.

Chez les animaux transgéniques (Xlf^{-/-})

Les variations des paramètres de diffusion anisotrope dans le Cc et la SB* sont présentées sur la Figure 7.11. Les souris irradiées (PN10 ou E14,5) présentent des valeurs moyennes de sMD et sRD plus élevées que les souris Sham dans le Cc. Ces augmentations sont significatives uniquement chez les souris E14,5 pour les paramètres sMD (+1,9%, $p = 2,7 \times 10^{-3}$) et sRD (+5,4%, $p = 1,4 \times 10^{-4}$). Les paramètres sAD, sFA et SI3 ont tendance à augmenter dans le Cc des souris PN10 alors que ces valeurs mesurées chez les souris E14,5 tendent à diminuer. Une diminution significative d'environ 6% ($p = 6,4 \times 10^{-4}$) et de 8% ($p = 1,6 \times 10^{-3}$) pour les paramètres sFA et SI3 respectivement a été mise en évidence. Dans la SB*, une tendance à l'augmentation des valeurs des paramètres de sFA et de SI3 ainsi qu'une diminution des valeurs de sMD, de sAD et de sRD sont détectées chez les souris Xlf^{-/-} E14,5 et PN10 par rapport aux souris Xlf^{-/-} Sham.

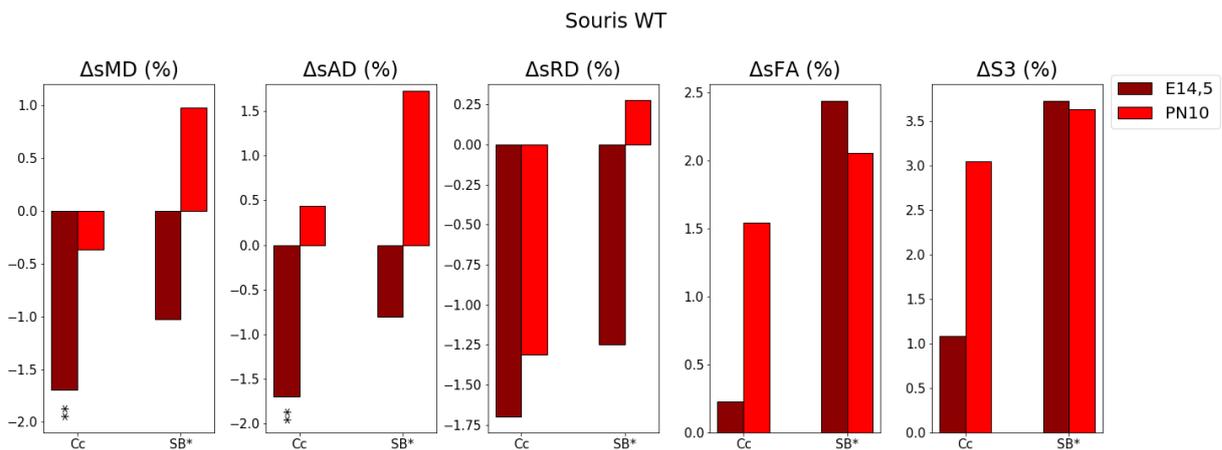


FIGURE 7.10 – L’irradiation faible dose engendre de légères variations sur les paramètres estimés de la microstructure chez les souris Xlf^{-/-} adultes. Variations relatives des paramètres de diffusion sMD, sAD, sRD, sFA et SI3 chez les souris sauvages WT dans les régions d’intérêt de la SB (Cc et SB*). Les variations du groupe des souris irradiées à 100 mGy par rapport aux souris sauvages figurent en marron pour l’irradiation *in utero* et en rouge pour l’irradiation postnatale. La significativité des résultats a été calculée avec un test de Student : ** $p < 0,01$.

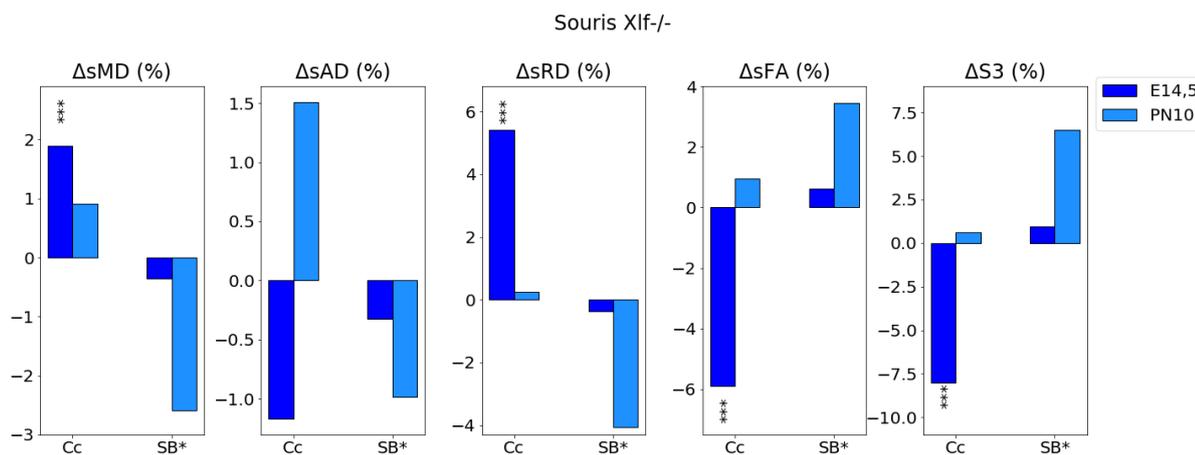


FIGURE 7.11 – L’irradiation faible dose engendre des variations sur les paramètres estimés de la microstructure chez les souris Xlf^{-/-} adultes. Variations relatives des paramètres de diffusion sMD, sAD, sRD, sFA et SI3 chez les souris transgéniques Xlf^{-/-} dans les régions d’intérêt de la SB. Les variations du groupe des souris irradiées à 100 mGy par rapport aux souris non irradiées figurent en bleu foncé pour l’irradiation *in utero* et en bleu clair pour l’irradiation postnatale. La significativité des résultats a été calculée avec un test de Student *** $p < 0,005$.

7.3 Discussion

Dans ce chapitre, nous avons caractérisé par IRM les effets cérébraux à l’âge adulte par une faible dose (100 mGy) selon le degré de maturation du cerveau, soit chez l’embryon (E14,5) soit chez l’animal juvénile (PN10). De plus, ces effets radio-induits détectables par IRM ont été évalués chez des souris sauvages (souris WT) et des souris présentant une radiosensibilité génétique (souris Xlf^{-/-}). Alors que nous détectons par IRM peu de changements chez les souris WT irradiées par rapport aux souris Sham, les souris irradiées Xlf^{-/-} présentent à la fois des atrophies et des paramètres de diffusion altérés par comparaison aux souris Xlf^{-/-} Sham, notamment lors de l’irradiation *in utero*.

L’irradiation *in utero* à faible dose provoque une apoptose précoce des cellules cérébrales de l’embryon

Le taux d’apoptose 4h post-irradiation n’a été établi que pour les groupes Sham et E 14,5. La quantification des cellules cérébrales positives à la CC3 témoigne d’un impact délétère de l’irradiation chez les embryons Xlf^{-/-} par rapport aux embryons WT, car pour une même dose d’irradiation (100 mGy) le taux d’apoptose est environ 1,6 fois plus élevé.

Le taux d’apoptose chez les souris sauvages non irradiées ou exposées *in utero* à une faible dose de RI reste tout de même inférieur à celui observé chez les souris Xlf^{-/-}, d’autant plus lorsqu’elles sont irradiées. Les souris Xlf^{-/-} non irradiées présentent alors 4h post-irradiation un profil similaire à celui des souris WT irradiées à faible dose *in utero*, ce qui confirme une nouvelle fois la radiosensibilité induite par l’absence du gène Xlf^{-/-}

dans ce modèle de souris transgénique.

L'irradiation *in utero* à faible dose entraîne des altérations comportementales à l'âge adulte

Par rapport à la croissance des souris qui peut être établie à partir du poids corporel des souris à un âge donné, il a pu être mis en évidence que les souris déficientes en Xlf-/- irradiées *in utero* semblent présenter un léger retard de croissance non significatif par rapport aux souris Sham. En effet, les souris Xlf -/- E14,5 sont caractérisées par un poids plus faible que les souris Xlf -/- Sham. Les autres groupes ne semblent pas présenter de retard (ou d'avance) sur leur croissance par rapport à leurs contrôles respectifs.

Le test de l'OF a été réalisé au LRP sur des souris Xlf-/- et WT non irradiées ou irradiées *in utero* à 100 mGy, âgées de 3 mois. Cette étude comportementale, réalisée sur des souris différentes de celles utilisées pour le protocole d'imagerie, n'a pas révélé d'altération locomotrice significative. Cependant, les souris Xlf-/- E14,5 semblent présenter une tendance assez marquée en faveur d'un déficit locomoteur décrit par une diminution de la distance parcourue, de la vitesse de déplacement ainsi qu'une augmentation de la durée d'immobilité. Cette hypothèse ne peut cependant pas être confrontée à d'autres études, puisqu'à notre connaissance ce modèle n'a pas encore été exploré sur le plan comportemental.

Quant aux interactions sociales, décrites à l'aide du "3 chambers sociability test", les résultats montrent qu'elles sont similaires entre les souris WT non irradiées (Sham) ou exposées à une faible dose de RI pendant l'embryogenèse (E14,5), bien qu'il y ait une tendance à ce que la sociabilisation des souris WT E14,5 soit atténuée notamment sur le plan de la nouveauté sociale. L'analyse des données comportementales obtenues avec ce test sous-entend que l'irradiation *in utero* à 100 mGy affecte le comportement social des souris WT. En revanche le comportement des souris Xlf-/- E 14,5 est atypique et aléatoire. En effet, le niveau d'interactions sociales est diminué, pendant la phase 2 du test alors qu'au cours de la phase 3 du test, il est augmenté et s'apparente à celui que pourraient avoir des souris WT non irradiées. D'autres investigations, avec des effectifs plus importants et/ou d'autres tests, sont nécessaires pour établir de façon claire l'impact de l'irradiation *in utero* à faible dose sur le comportement social des souris Xlf-/-.

L'irradiation *in utero* à faible dose provoque des atrophies cérébrales à l'âge adulte

Chez les souris WT

Chez les souris du groupe WT PN10, nous avons uniquement observé une diminution légèrement significative d'environ 2% du volume du Ctx. Ces observations ne peuvent être corroborées par d'autres études, car à notre connaissance cette condition d'irradiation (100

mGy au stade juvénile) n'est pas investiguée.

Chez les souris du groupe WT E14,5, deux régions cérébrales (Cer et Ctx) possèdent un volume moindre tandis que le BO possède un volume plus élevé que les chez les souris WT Sham. Ces variations pondérées par la proportion de volume occupé par le Cer, Ctx et BO dans le cerveau total aboutissent à l'absence d'une diminution significative de volume de la SG. Comme dans l'étude de Saito et al. (2015), nous avons également reporté une dilatation ventriculaire consécutive à l'irradiation *in utero*, comme en témoigne l'augmentation du volume de LCS.

Mis à part pour le Cer et le Ctx, le niveau d'apoptose significativement augmenté chez les souris WT E14,5 observé 4h post-irradiation ne perturbe donc pas à long terme le développement des structures cérébrales. L'augmentation du volume du BO pourrait être la conséquence d'un pic de la neurogenèse dans la zone sous-ventriculaire qui se traduit par une migration plus élevée des précurseurs neuronaux dans le BO. Ainsi, *in fine*, le nombre de cellules neuronales serait augmenté dans le BO, ce qui conduirait à un volume plus conséquent de cette structure cérébrale.

Chez les souris Xlf-/-

À notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à évaluer l'impact de l'irradiation à faible dose de RI sur le volume cérébral dans un modèle animal de radiosensibilité génétique tel que les souris Xlf-/. Chez les souris du groupe Xlf/- PN10, nous n'avons pas observé de variations volumétriques significatives. Néanmoins, par cette étude volumétrique menée en IRM nous avons montré que l'irradiation à E14,5 affecte le volume cérébral total de ces souris, en particulier le volume de la SG. En effet, seul le volume de la région MB n'est pas significativement diminué alors que celui des autres régions de la SG diminue significativement de 3 à 6 %. La diminution des volumes des différentes structures cérébrales contribue à la diminution globale de la SG. Nous avons également mesuré une diminution significative des volumes du Cc et des autres structures de la SB (regroupées dans la ROI nommée SB*). Contrairement au volume cérébral global, l'irradiation à 100 mGy n'affecte pas le volume du LCS chez les souris Xlf/-.

Le niveau d'apoptose significativement augmenté chez les souris Xlf/- E14,5 à 4h post-irradiation semble donc perturber à long terme le développement des structures cérébrales. Cette mort cellulaire radio-induite semble majeure et trop importante pour qu'un quelconque mécanisme de compensation ne rétablisse une croissance "normale" à long terme.

L'irradiation *in utero* ou au stade juvénile à faible dose modifie la microstructure du cerveau

Chez les souris WT

De façon identique à l'analyse volumétrique, les altérations des paramètres de diffusion sont majoritairement reportées chez les souris WT E14,5. Les variations des paramètres de diffusion observées aussi bien dans la SG (via le sADC et le SI) que dans la SB (via le sAD et le SI3) chez les souris WT E14,5 par rapport aux souris WT Sham sont contraires à celles observées chez les souris WT irradiées au même âge (E14,5) mais à forte dose (1 Gy).

Alors qu'un déficit de densité cellulaire dans les structures cérébrales appartenant à la SG, ainsi qu'une baisse de la densité axonale dans le Cc est une interprétation possible pour l'effet de l'irradiation à forte dose au stade embryonnaire (Pérès et al., 2018; Gupta et al., 2013), elle n'est pas envisageable dans le cas de l'irradiation faible dose. En effet, l'ensemble des observations réalisées chez les souris WT E14,5 irradiées à 100 mGy seraient au contraire favorables à une augmentation de la densité cellulaire en raison de l'augmentation du SI dans certaines régions de la SG (Htl, Thal, MB). De plus, une augmentation des valeurs du Kurtosis dans le BO a été mesurée chez ces souris WT E14,5, ce qui renforce l'hypothèse en faveur d'une augmentation de la densité cellulaire probablement causée par une augmentation de la migration cellulaire via l'augmentation de la neurogenèse de la zone sous-ventriculaire. La diminution de f_{IVIM} dans le Ctx des souris WT E14,5 peut quant à elle être interprétée comme un déficit vasculaire lié, soit à une malformation des vaisseaux cérébraux, soit à une diminution des cellules endothéliales (Saito et al., 2015). L'hypothèse d'une modification de la vascularisation est donc à considérer, d'autant plus que le niveau d'apoptose apparaît diminué 4h post-irradiation dans le télencéphale, ce qui conduirait à long terme à des atteintes des cellules endothéliales.

Chez les souris WT PN10, une diminution légèrement significative du paramètre f_{IVIM} et D^* a été reportée dans le Ctx. Le déficit de cellules endothéliales peut être à l'origine d'une moindre vascularisation et de la diminution de volume observé dans la même région (Sándor et al., 2014).

Chez les souris Xlf-/-

Alors que les souris Xlf-/- présentent des altérations volumétriques uniquement lorsque l'irradiation a lieu *in utero*, des variations des paramètres de diffusion dans la SG sont tout de même visibles chez les souris irradiées au stade juvénile. En particulier, nous avons observé une augmentation des valeurs du paramètre sADC associée à la diminution des valeurs de SI dans l'Htl et le MB. Un déficit de densité cellulaire dans ces structures cérébrales est une interprétation possible au vu des observations réalisées par des études précédentes (Pérès et al., 2018). Une diminution de f_{IVIM} dans le Ctx, le MB et la ZSV a également été mesurée et renseigne sur le fait que la fraction vasculaire est diminuée

dans ces régions du cerveau. La ZSV présente également une valeur de kurtosis diminuée cohérente avec l'interprétation déduite des variations de sADC et SI.

La diminution de sADC associées à l'augmentation du SI mesurée dans le Ctx, l'Htl, la ZSV a déjà été observée dans le chapitre 5 chez les souris WT irradiées *in utero* à 1 Gy. L'hypothèse qu'un déficit de densité cellulaire soit à l'origine de ces observations peut alors être émise. De même, l'augmentation des paramètres sMD et sRD associée à la diminution des paramètres sFA et SI3 dans le Cc des souris Xlf^{-/-} E14,5, est favorable à l'interprétation d'une démyélinisation radio-induite (Gupta et al., 2013). La valeur du kurtosis se trouve diminuée dans le Cer et le Ctx, ce qui indique une diminution du nombre d'obstacles pour la diffusion des molécules d'eau, soit de la densité cellulaire dans ces régions. Ce résultat est cohérent avec les variations des paramètres sADC et SI observées dans le Ctx.

Limites de l'étude

Outre les limites méthodologiques dues à l'acquisition et au traitement des données présentées au chapitre 5, ainsi qu'à la qualité réduite des images IRM obtenues chez les souris Xlf^{-/-} par rapport aux images acquises chez les souris WT, cette étude possède d'autres points de fragilité.

Une des limitations majeures de cette étude concerne la définition du groupe de souris non irradié (Sham). En effet, contrairement aux souris exposées *in utero* ou au stade juvénile, les souris Sham ne sont pas manipulées avant l'âge adulte. Le stress qui peut survenir lors de la manipulation des animaux n'est alors pas tout à fait identique. Une étude complémentaire avec des souris Sham subissant les mêmes manipulations à PN10 ou à E14,5 devrait être réalisée pour valider la conformité du groupe Sham et exclure que les effets que nous observons ne soient pas simplement causés par le stress au moment de la manipulation des souris.

L'absence d'études comportementales menées chez les souris PN10 ne permet pas, à l'heure actuelle, de valider notre modèle d'irradiation chez les jeunes enfants exposés à de faibles doses de radiations ionisantes, comme c'est le cas dans un cadre diagnostique, sur le plan cognitif. De même, l'absence d'études histologiques pour ces mêmes souris PN10 ne permet pas d'établir si l'absence d'effet à long terme est la cause d'absence d'effet à court terme, ou s'il y a un mécanisme compensatoire qui se met en place. La quantification de l'apoptose à 4h post-irradiation serait notamment la bienvenue pour conclure sur l'absence d'une mort neuronale des cellules cérébrales chez les souriceaux irradiés à faible dose. A contrario, si nous détectons de l'apoptose au cours de la phase aiguë de l'irradiation chez les souriceaux, nous pourrions commencer à établir les limites de sensibilité de notre approche IRM pour la détection des atteintes neuropathologiques radio-induites.

De plus, des études histologiques complémentaires chez les souris irradiées *in utero* ou au stade postnatal pourraient valider les hypothèses sur la relation, entre la variation des

paramètres de diffusion et les processus biologiques impliqués dans la réponse à l'exposition aux RI, comme les dommages vasculaires, les altérations de la neurogenèse (positives ou négatives) ou la diminution de la densité cellulaire.

Enfin une corrélation quantitative ne peut toujours pas être établie même si nous possédions l'ensemble des données histologiques, comportementales, et d'imagerie chez les groupes E14,5 et Sham puisque ce ne sont pas les mêmes animaux qui ont servi pour les tests comportementaux et le protocole d'imagerie IRM.

7.4 Conclusion

Pour la première fois, à notre connaissance, la caractérisation des effets cérébraux chez des souris déficientes dans le système de réparation de l'ADN NHEJ (Xlf^{-/-}) et irradiées à faible dose (100 mGy) à deux âges d'irradiation particulièrement radiosensibles (stades embryonnaire et juvénile) a été réalisée de façon non invasive par IRM.

Nous avons alors pu mettre en évidence que l'irradiation à une faible dose (100 mGy) induisait peu de changements visibles en IRM chez les souris sauvages contrairement aux souris transgéniques. En effet, ces dernières présentent des atrophies notables dans la plupart des structures cérébrales étudiées. L'amplitude des changements volumétriques chez les souris Xlf^{-/-} E14,5 sont du même ordre de grandeur que ceux observés chez les souris WT irradiées à 1 Gy au même âge. Ces résultats sous-entendent une potentialisation d'un facteur 10 de l'irradiation lorsque la double mutation du gène Xlf est présente.

Toujours chez les souris Xlf^{-/-}, des altérations microstructurelles sont visibles et particulièrement intenses dans le cas d'une irradiation *in utero*. En se basant sur l'interprétation biologique des paramètres de diffusion établie au chapitre 5, ces altérations refléteraient une raréfaction cellulaire dans la SG accompagnée d'une démyélinisation dans la SB.

De plus, l'irradiation *in utero* à faible dose des souris Xlf^{-/-} a des conséquences néfastes à court terme (apoptose), qui, contrairement aux souris WT, ne se résolvent pas à long terme, comme en témoignent les déficits comportementaux tels que la baisse de l'activité locomotrice et des interactions sociales.

Les effets de l'irradiation au stade juvénile sont beaucoup plus modérés, même chez les souris Xlf^{-/-}. Par exemple, nous n'observons pas d'atrophie cérébrale significative et les variations des paramètres de diffusion sont beaucoup plus localisées et de plus faible amplitude.

Par conséquent, l'irradiation à faible dose aux stades embryonnaire et juvénile peut être à l'origine de changements cérébraux plus ou moins néfastes et réversibles suivant le fond génétique du modèle animal. C'est pourquoi, il apparaît pertinent de vérifier le bon fonctionnement des systèmes de réparation de l'ADN chez les femmes enceintes et les enfants, avant toute exposition volontaire aux RI.

Bibliographie

Mamta Gupta, Poonam Rana, Richa Trivedi, B. S. Hemanth Kumar, Ahmad Raza Khan, Ravi Soni, R. K. S. Rathore, and Subash Khushu. Comparative evaluation of brain neurometabolites and DTI indices following whole body and cranial irradiation : a magnetic resonance imaging and spectroscopy study. *NMR Biomed*, 26(12) :1733–1741, December 2013. ISSN 1099-1492. doi : 10.1002/nbm.3010.

Elodie Anne Pérès, Olivier Etienne, Antoine Grigis, Fawzi Boumezbeur, François Dominique Boussin, and Denis Le Bihan. Longitudinal Study of Irradiation-Induced Brain Microstructural Alterations With S-Index, a Diffusion MRI Biomarker, and MR Spectroscopy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 102(4) :1244–1254, 2018. ISSN 1879-355X. doi : 10.1016/j.ijrobp.2018.01.070.

Shigeyoshi Saito, Kazuhiko Sawada, Yuki Mori, Yoshichika Yoshioka, and Kenya Murase. Brain and arterial abnormalities following prenatal X-ray irradiation in mice assessed by magnetic resonance imaging and angiography. *Congenit Anom (Kyoto)*, 55(2) : 103–106, May 2015. ISSN 1741-4520. doi : 10.1111/cga.12101.

Nikolett Sándor, Fruzsina R. Walter, Alexandra Bocsik, Petra Sántha, Boglárka Schilling-Tóth, Violetta Léner, Zoltán Varga, Zsuzsanna Kahán, Mária A. Deli, Géza Sáfrány, and Hargita Hegyesi. Low Dose Cranial Irradiation-Induced Cerebrovascular Damage Is Reversible in Mice. *PLoS One*, 9(11), November 2014. ISSN 1932-6203. doi : 10.1371/journal.pone.0112397. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4231057/>.

Chapitre 8

Conclusion et perspectives

Conclusion générale

L'étude des effets biologiques des rayonnements ionisants (RI) va bénéficier du développement de nouveaux biomarqueurs IRM. Leur application en recherche préclinique va permettre de mieux cerner ces effets, par exemple à partir de modèles de rongeurs pour lesquels il est possible de contrôler les conditions d'exposition et de moduler les mécanismes de sensibilité ou de résilience face aux RI. Au cours de cette thèse nous avons en particulier développé une approche non invasive par IRM anatomique et de diffusion avec pour objectif de détecter et de caractériser les altérations radio-induites que nous avons validée avec un modèle de souris C57BL6/N irradié *in utero* à 1 Gy, et ensuite appliqué pour l'étude d'irradiation à une dose relativement faible de 100 mGy.

Notre protocole d'acquisitions IRM et les outils d'analyse que nous avons développés et optimisés s'inscrivent naturellement dans le prolongement de travaux réalisés antérieurement dans le laboratoire pour caractériser l'atteinte de régions cérébrales impliquées dans la neurogenèse (hippocampe, bulbe olfactif, zone sous-ventriculaire) chez la souris adulte suite à une irradiation forte dose (Pérès et al., 2018). Comme détaillé dans le chapitre 4 et illustré par les résultats dans les chapitres 5 à 7, nous avons notamment implémenté le concept d'IRM de diffusion reposant sur un "Signature Index" (SI) sensible aux altérations dans la microstructure des tissus et une extension de son utilisation en présence de diffusion anisotrope comme dans la substance blanche cérébrale. De plus, nous avons mis en place un pipeline d'analyse semi-automatique des données anatomiques et de diffusion, ce qui nous a permis d'estimer de façon reproductible et efficace les variations de volumes et de paramètres de diffusion induites par les RI, ainsi que de mener des analyses de groupes à travers nos cohortes d'animaux irradiés.

Notre première étude, focalisée sur la caractérisation de souris C57BL6/N irradiées *in utero* à 1 Gy (cf. chapitre 5), nous a permis de détecter des atteintes volumétriques et microstructurelles conséquentes à travers le cerveau et ainsi de valider la sensibilité et la robustesse de notre approche. Plus spécifiquement, une atrophie globale de 14 % a été observée chez ces souris à l'âge adulte avec des atteintes relatives plus ou moins marquées

des différentes régions cérébrales telles qu'illustrée par la Figure 5.7. En parallèle, nous avons observé grâce à l'imagerie de diffusion des hausses de coefficient de diffusion apparent (ADC_0) de l'ordre de 2 à 3 %, réinterprétées de façon synergétique par des baisses significatives de SI (jusqu'à -16 %) avec là aussi des différences régionales significatives (Figure 5.9). En lien avec les données histologiques à notre disposition, nous interprétons ces changements comme la marque d'une réduction de la densité cellulaire résultante d'une part de l'apoptose massive ayant lieu à court terme après irradiation et d'autre part d'une neurogenèse modérément compromise. De par les différents tests comportementaux réalisés dans ce modèle de souris irradié à forte dose, ces modifications structurelles et microstructurelles ne semblent pas impacter la locomotion chez les souris adultes, mais pourraient être à l'origine du déficit observé au niveau des interactions sociales.

Avec notre seconde étude, nous nous sommes intéressés à la caractérisation, en l'absence de RI, de la neuroanatomie d'un modèle original de radiosensibilité lié à la mutation *Xlf*^{-/-} (cf. chapitre 6). Ces souris présentent à l'âge adulte une atrophie globale du cerveau de 9 % (Figure 6.8) sans atteinte manifeste de la microstructure (Tables 6.1, 6.2, 6.3.), potentiellement liée à la différenciation prématurée des cellules souches neurales au cours du développement chez les souris *Xlf*^{-/-}. D'un point de vue comportemental, ces altérations neurodéveloppementales se manifestent à long terme par des déficits locomoteurs et d'interactions sociales chez les souris *Xlf*^{-/-} adultes.

Après validation de la méthodologie, nous avons étudié les effets de l'irradiation faible dose (100 mGy) (cf. chapitre 7). En raison de la radiosensibilité particulière des cellules souches neurales au cours du neurodéveloppement, nous nous sommes intéressés en particulier à des expositions aux stades embryonnaire (E14,5) et juvénile (PN10). Nous avons été en mesure de détecter et de quantifier des atteintes volumétriques et microstructurelles, modestes, mais significatives chez la souris C57BL6/N irradiée. Nous avons notamment observé un rehaussement du S-Index, qui peut s'interpréter comme une petite prolifération cellulaire ou une densification du tissu interstitiel d'après les observations histologiques réalisées avec le modèle forte dose (WT irradié à 1 Gy à E14,5). Par ailleurs, quel que soit le fond génétique (WT ou *Xlf*^{-/-}), l'exposition au stade embryonnaire E14,5 est associée à des altérations plus marquées en raison de la plus forte radiosensibilité des cellules neuronales à E14,5 par rapport à PN10, à l'exception de certaines régions cérébrales comme le bulbe olfactif ou l'hippocampe qui semblent présenter une résilience vis-à-vis de l'irradiation. Enfin la mutation du gène *Xlf*^{-/-} et la déficience des cellules à réparer correctement leur ADN se manifeste par une potentialisation (d'un ordre de grandeur) de l'effet des RI avec des variations de volumes et de paramètres de diffusion observées chez les souris *Xlf*^{-/-} irradiées à E14,5 avec une dose de 100 mGy comparables à celles observées chez nos souris WT irradiées *in utero* à 1 Gy. Ces souris présentent d'ailleurs des troubles sensorimoteurs (déficit locomoteur non significatif) et comportementaux (apathique et interactions aléatoires vis-à-vis de ses congénères) qui se rapprochent des anomalies comportementales observées chez les souris WT irradiées *in utero* à 1 Gy.

Limites et améliorations possibles

La méthodologie développée dans cette thèse est susceptible d'être bien évidemment améliorée. Sur le plan de l'acquisition des données, l'obtention d'images IRM pondérées en diffusion suivant plus de directions permettrait d'augmenter le rapport signal sur bruit et de mieux garantir l'invariabilité des signaux par rotation par le moyennage géométrique en présence d'anisotropie. Il deviendrait alors aussi possible d'investiguer l'anisotropie plus précisément le long des faisceaux de substance blanche (analyse statistique TBSS, "Tract-Based Spatial Statistic") (Smith et al., 2006). Dans le cadre de cette thèse, nous avons pu montrer que seules deux valeurs de pondération en diffusion étaient nécessaires pour caractériser les effets radio-induits, notamment via le calcul du S-Index, ce qui permet soit : (i) de diminuer le temps d'acquisition par souris de presque un facteur 7 (3 valeurs de b au lieu de 20 en considérant les images à $b = 0$) ; (ii) d'envisager de façon plus concrète l'acquisition de plus de directions ; (iii) soit d'acquérir d'autres données IRM, par exemple IRM fonctionnelle en activation ou au repos ("resting-state"). Ces études fonctionnelles bien que controversées pour certains aspects (notamment en ce qui concerne le stress de la manipulation et l'influence de l'agent analgésique employé) sont particulièrement intéressantes pour sonder la connectivité entre structures cérébrales et constitue de fait un pont conceptuel entre anatomie, microstructure et fonction cérébrale. Nous avons déjà mené une première étude pilote sur des cohortes non irradiées pour mettre en place un pipeline d'analyse de données d'IRM fonctionnelle au repos.

La durée des acquisitions peut encore être raccourcie avec les nouvelles méthodes de compression et d'encodage parcimonieux issues de l'intelligence artificielle, comme la méthode SPARKLING développée au laboratoire (Lazarus et al., 2017). L'utilisation d'antennes volumiques (et non pas de surface) permet aussi de réduire les hétérogénéités du champ radiofréquence et donc du signal sur l'ensemble du cerveau.

Il reste le problème des distorsions géométriques. Elles ont été partiellement corrigées par post-traitement lors de ce travail, mais une correction plus grande peut-être obtenue en encodant les signaux spatialement (encodage de phase) dans deux directions opposées (par exemple antérieur postérieur et postérieur antérieur) avec un algorithme déjà existant ("top-up") (Andersson et al., 2003). Malheureusement pour corriger les distorsions des différentes pondérations de diffusion cette approche double le temps d'acquisition. Pour ne pas augmenter de façon drastique le temps d'acquisition, nous avons décidé d'appliquer la même correction pour toutes les valeurs de pondération de diffusion. Nous avons commencé et validé l'intégration de cette étape supplémentaire pour les images A0 (Figure 8.1). Une étape supplémentaire de validation est donc nécessaire avant d'appliquer systématiquement cette correction pour toutes les pondérations de diffusion des acquisitions futures.

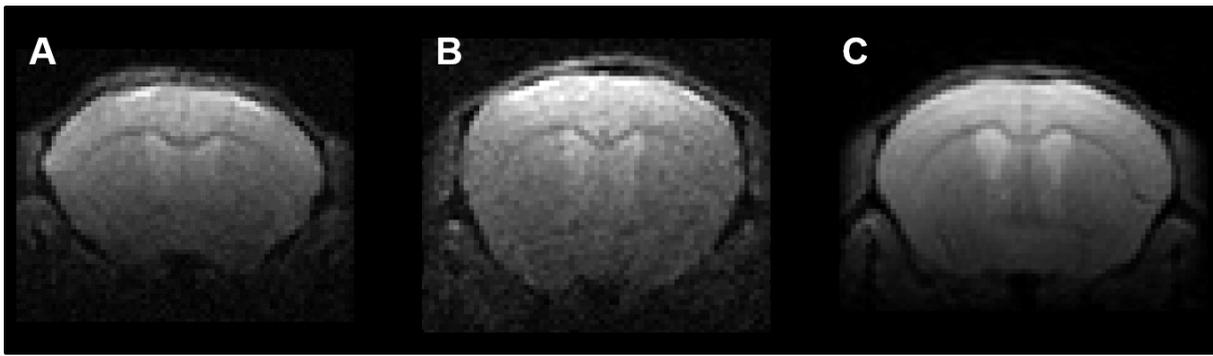


FIGURE 8.1 – Coupes axiales d'images IRM (A0) avec un encodage de phase de bas en haut (A) et de haut en bas (B). Le résultat d'une correction "top-up" (C) est obtenu à partir des images A et B.

L'analyse volumétrique peut également bénéficier d'une approche statistique avec la méthode VBM ("Voxel Based Morphometry") (Ashburner et Friston, 2000) pour détecter des variations de volumes à l'échelle du voxel plutôt qu'à l'échelle de régions d'intérêt relativement larges dans lesquelles des variations opposées auraient pu se compenser (Figure 8.2). Cette option aurait toutefois nécessité des cohortes plus larges afin d'atteindre des seuils statistiques satisfaisants après l'application d'une correction pour les comparaisons multiples.

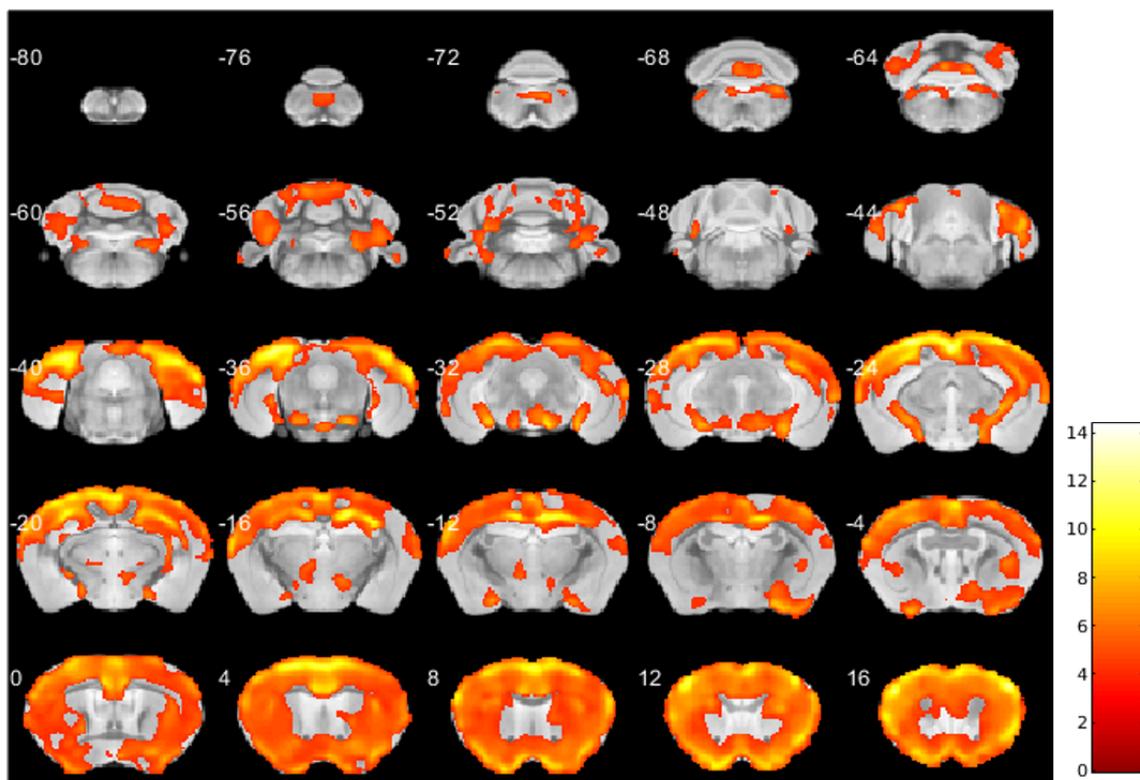


FIGURE 8.2 – Résultats de l'analyse VBM réalisée sur les sujets WT Sham ($N_{Sham} = 20$) et irradiés 1 Gy à E14,5 ($N_{IRR} = 13$). Le seuil statistique a été fixé à 0,05 et l'échelle de couleur donne la valeur statistique t pour le contraste Sham > IRR. L'atrophie chez les sujets IRR est globale et significative pour la majorité des régions.

Au-delà de ces considérations techniques, la limite plus importante de nos études concerne l'état d'avancement de nos données histologiques. En effet, il reste à conforter les interprétations de nos variations de S-Index par des corrélats cellulaires semi-quantitatifs tels que l'estimation de densités de cellules neuronales, gliales et microgliales. Ces études histologiques sont en cours et devraient bientôt être disponibles pour parfaire notre vision globale des atteintes des différentes populations cellulaires. L'ensemble de nos données seront alors (re)soumises pour publication dans des revues à comité de lecture. Avec ces validations histologiques en main nous pourrions remplacer avantageusement pour le calcul du S-Index la librairie de signaux "signatures" aujourd'hui arbitrairement utilisée dans cette thèse par des signaux de référence réels.

Perspectives

En conclusion la méthodologie développée (IRM de diffusion par Signature Index et analyse semi-automatique par régions cérébrales) permet de mettre en évidence, *in vivo* et de manière non invasive, les effets de l'irradiation sur le cerveau, aux échelles macroscopiques et microscopiques. Il s'agit donc d'un outil très pertinent pour mieux appréhender les effets et mécanismes de l'irradiation sur le tissu cérébral. En particulier cette méthodologie ouvre la voie à de très nombreuses études complémentaires que ce soit (i) pour la complétion et l'affinement de la relation effets-doses, ce qui pourrait impacter les normes en radioprotection appliquées chez l'Homme; (ii) pour poursuivre notre exploration des facteurs de sensibilité et de résilience aux RI qu'ils soient génétiques ou environnementaux (stress, polluants, ...); (iii) pour utiliser cette démarche dans le but de prédire à l'échelle individuelle et *a posteriori* si un stress génotoxique s'est produit pendant les phases de développement cérébral et de quel type était ce stress; (iv) pour explorer les effets à très long terme chez la souris âgée ou pour optimiser des protocoles de radiothérapie sur des modèles animaux de gliomes avec la possibilité d'évaluer simultanément l'efficacité du traitement et de suivre longitudinalement les effets sur les tissus sains environnants à court, moyen et long termes (études longitudinales). Ce dernier axe est particulièrement intéressant car il correspond le plus clairement aux besoins de la communauté médicale, en particulier lorsqu'il s'agit de jeunes patients porteurs de tumeurs cérébrales. La méthodologie proposée est complètement non-invasive, applicable chez l'Homme en clinique et il serait stimulant si ce travail de thèse permettrait un jour d'améliorer la prise en charge, le soin et le suivi (par IRM de diffusion notamment) de ces patients pour lesquels la vie commence.

Bibliographie

Jesper L. R. Andersson, Stefan Skare, and John Ashburner. How to correct susceptibility distortions in spin-echo echo-planar images : application to diffusion tensor imaging. *NeuroImage*, 20(2) :870–888, October 2003. ISSN 1053-8119. doi : 10.1016/S1053-8119(03)00336-7. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811903003367>.

John Ashburner and Karl J. Friston. Voxel-Based Morphometry—The Methods. *NeuroImage*, 11(6) :805–821, June 2000. ISSN 1053-8119. doi : 10.1006/nimg.2000.0582. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811900905822>.

Carole Lazarus, Pierre Weiss, Nicolas Chauffert, Franck Mauconduit, Michel Bottlaender, Alexandre Vignaud, and Philippe Ciuciu. SPARKLING : Novel Non-Cartesian Sampling Schemes for Accelerated 2D Anatomical Imaging at 7T Using Compressed Sensing. page 5, 2017.

Elodie Anne Pérès, Olivier Etienne, Antoine Grigis, Fawzi Boumezbeur, François Dominique Boussin, and Denis Le Bihan. Longitudinal Study of Irradiation-Induced Brain Microstructural Alterations With S-Index, a Diffusion MRI Biomarker, and MR Spectroscopy. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*, 102(4) : 1244–1254, November 2018. ISSN 0360-3016. doi : 10.1016/j.ijrobp.2018.01.070. URL [https://www.redjournal.org/article/S0360-3016\(18\)30184-6/abstract](https://www.redjournal.org/article/S0360-3016(18)30184-6/abstract).

Stephen M. Smith, Mark Jenkinson, Heidi Johansen-Berg, Daniel Rueckert, Thomas E. Nichols, Clare E. Mackay, Kate E. Watkins, Olga Ciccarelli, M. Zaheer Cader, Paul M. Matthews, and Timothy E. J. Behrens. Tract-based spatial statistics : Voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *NeuroImage*, 31(4) :1487–1505, July 2006. ISSN 1053-8119. doi : 10.1016/j.neuroimage.2006.02.024. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811906001388>.

Annexe A

Liste des publications et communications

Articles en préparation

- **Mouton L.**, Etienne O., Barrière D.A., Pérès E.A, Boumezbeur F., Boussin F.D., Le Bihan D. Non-invasive assessment of whole brain radiosensitivity following *in utero* irradiation in mice : an anatomical and diffusion MRI study.
- Bery A., Etienne O., Pérès E.A, **Mouton L.**, Laugeray A., Desmaze C., Gauthier L.R., Martin M., Boumezbeur F., Abramovski V., Mortaud S., de Villatray J-P., Le Bihan D., Menuet A., Boussin F.D. Impaired brain development and behavior of Xlf null mice linked to chromosome instability-induced premature neurogenesis.
- **Mouton L.**, Ribeiro M., Mouthon M.A., Boumezbeur F., Le Bihan D., Ricard D., Boussin F.D., Verrelle P. Experimental and preclinical tools to explore the main neurological impacts of brain irradiation : current insights and perspectives.

Communications orales

- **ESMRMB 2019** (oral) : "Characterization of long-term cerebral alterations in a mouse model of *in utero* high dose irradiation using anatomical and diffusion MRI". **L. Mouton**, O. Etienne, D.A. Barrière, E.A. Pérès, F. Boumezbeur, F.D. Boussin, D. Le Bihan
- **ESMRMB 2019** (poster électronique) : "MRI characterization of long-term cerebral alterations in a NHEJ mouse model following low dose irradiation at the juvenile stage". **L. Mouton**, O. Etienne, D.A. Barrière, E.A. Pérès, J.-P. de Villatray, F. Boumezbeur, F.D. Boussin, D. Le Bihan
- **ICRR 2019** (oral) : "Characterization of long-term cerebral alteration in a mouse model of *in utero* irradiation using anatomical and diffusion MRI". **L. Mouton**,

- O. Etienne, D.A. Barrière, E.A. Pérès, F. Boumezbeur, F.D. Boussin, D. Le Bihan
- **ICMRM 2019** (poster) : "MRI characterization of long-term brain damage induced by low dose irradiation at two different exposure ages in the mouse". **L. Mouton**, O. Etienne, D.A. Barrière, E.A. Pérès, F. Boumezbeur, F.D. Boussin, D. Le Bihan
 - **SFRMB 2019** (poster) : "Caractérisation des effets radio-induits à long terme chez la souris irradiée *in utero* par IRM anatomique. **L. Mouton**, O. Etienne, D.A. Barrière, J.-P. de Villatray, F. Boumezbeur, F.D. Boussin, D. Le Bihan
 - **ERR 2018** (oral) : "Assessment of long term grey matter alterations in a mouse model of *in utero* irradiation using anatomical and diffusion MRI". **L. Mouton**, O. Etienne, D.A. Barrière, F. Boumezbeur, F.D. Boussin, D. Le Bihan

Annexe B

Introduction physique de l'imagerie par résonance magnétique

Dans cette annexe, les bases physiques sur lesquelles reposent l'imagerie par résonance magnétique (IRM) seront exposées. L'objectif est de rappeler, ou d'introduire pour les non-experts, le concept, les séquences de base et les différentes modalités de l'IRM.

B.1 La résonance magnétique nucléaire

B.1.1 Les applications basées sur le principe de la résonance magnétique nucléaire

Au cours des années 1950, les applications qui reposent sur le principe de la résonance magnétique nucléaire (RMN) se développèrent. La Chimie s'approprie ces connaissances pour caractériser la matière condensée et l'industrie Varian s'investit en commercialisant les premiers spectromètres à électroaimants dès 1953-1955. Les innovations apportées en RMN aboutirent avec l'apparition de nouveaux spectromètres et de nouvelles industries comme Bruker. La résolution des spectres RMN s'améliora notamment avec la méthode impulsionnelle qui remplaça la méthode continue. Les chercheurs impliqués dans ces innovations ne sont pas en reste puisque certains d'entre eux se sont également vu remettre le prix Nobel. C'est le cas de Richard Robert Ernst en 1991 qui développa la méthodologie de la transformée de Fourier (TF) (Ernst et Anderson, 1966; Ernst et al., 1990) qu'il utilisa lors de ses expériences de spectroscopie RMN à deux dimensions. Cette double TF fut considérée comme une avancée majeure dans le domaine puisqu'elle permet d'étendre l'analyse par spectroscopie RMN sur des échantillons plus complexes. Kurt Wüthrich eut également le privilège d'accéder au prix Nobel de Chimie en 2002 pour ses travaux méthodologiques. Il réussit à caractériser tridimensionnellement des protéines par sa méthode d'assignement séquentiel. Elle consiste à acquérir par spectroscopie RMN 2D une carte de connectivité $^1\text{H} - ^1\text{H}$ spatiale et temporelle.

La spectroscopie RMN se développa dans le but d'investiguer par analyse structurale

ou chimie analytique des échantillons variés, de la matière condensée au petit animal en passant par les tissus biologiques. En parallèle, l'idée d'obtenir des images à partir du signal RMN émergea et Raymond Vahan Damadian proposa dès 1969 d'utiliser la RMN au service de la santé et plus particulièrement dans la détection de tumeur (Damadian, 1970). En 1973 Paul Lauterbur développa la technique pour reconstruire des images à partir du signal RMN du proton de l'hydrogène (^1H) qu'il baptisa Zeugmatographie (décrite dans la section B.3.2) (Lauterbur, 2004). Avant de réaliser les premières images sur le tissu humain en 1975, l'IRM fut d'abord testée sur des tubes capillaires et sur d'autres objets comme le poivron. De son côté et de façon indépendante, Peter Mansfield mit au point une technique d'acquisition d'images RMN rapide appelée imagerie écho planaire ou "Echo Planar Imaging" (EPI) en 1977 (Mansfield et Maudsley, 1977). Raymond Vahan Damadian procéda la même année à la première acquisition IRM chez l'Homme. Ce qui entraîna la fabrication des premiers appareils IRM commerciaux. Lauterbur et Mansfield reçurent le prix Nobel de médecine en 2003 pour leurs contributions dans le développement de cette nouvelle technique d'imagerie par RMN.

L'IRM est une technique d'imagerie qui utilise la RMN pour explorer de façon non invasive les tissus biologiques. Le phénomène RMN, comme son nom l'indique, se déroule à l'échelle du noyau atomique. Les noyaux atomiques, constitués de protons et neutrons, possèdent un moment magnétique élémentaire (lié à un moment cinétique élémentaire appelé spin) leur donnant des propriétés magnétiques macroscopiques, de sorte qu'ils soient sensibles au phénomène RMN. Les noyaux atomiques ayant un nombre pair de neutrons et de protons ont, toutefois, un moment magnétique nul. Par exemple les isotopes naturels du carbone (^{12}C) et de l'oxygène (^{16}O) ne sont pas visibles en RMN. C'est pourquoi pour étudier les milieux biologiques il faut recourir à des isotopes, certes stables, mais à faible abondance naturelle, ce qui peut conduire à la nécessiter de les injecter (Table B.1).

L'hydrogène (spin $1/2$) est le noyau de référence en IRM du fait :

1. de ses propriétés magnétiques très favorables
2. de sa très grande abondance naturelle, principalement au sein de la molécule d'eau dont la concentration dans les tissus est de 55 M (70% du poids du corps vient de l'eau et 9 molécules sur 10 dans le cerveau sont des molécules d'eau).

Par la suite, on ne s'intéressera donc qu'à l'IRM des spins des protons de l'hydrogène, que l'on notera simplement par ^1H .

B.1.2 De l'aimantation microscopique ($\vec{\mu}$), à l'aimantation macroscopique (\vec{M})

La RMN est un phénomène physique qui se base sur les interactions entre le moment magnétique $\vec{\mu}$ du spin, défini dans la section B.1.1 précédente, avec un champ magnétique extérieur. Tout comme le ferait un aimant, en l'absence d'un champ magnétique extérieur,

Isotope	Valeur de spin	Abondance naturelle (%)	Rapport gyromagnétique ($10^7 \text{rad} \times T^{-1} \times s^{-1}$)	Sensibilité relative	Fréquence RMN à 2,35T (MHz)
^1H	1/2	99,985	26,752	1	100
^2H	1	0,015	4,107	$1,45 \times 10^{-6}$	15,351
^3He	1/2	$1,4 \times 10^{-4}$	-20,380	$5,75 \times 10^{-7}$	76,181
^7Li	3/2	92,58	10,398	0,272	38,866
^{13}C	1/2	1,108	6,728	$1,76 \times 10^{-4}$	25,145
^{14}N	1	99,63	1,934	$1,00 \times 10^{-3}$	7,228
^{15}N	1/2	0,37	-2,712	$3,86 \times 10^{-6}$	10,137
^{17}O	5/2	0,037	-3,629	$1,08 \times 10^{-5}$	13,562
^{19}F	1/2	100	25,181	0,834	94,094
^{23}Na	3/2	100	7,08	$9,27 \times 10^{-2}$	26,466
^{31}P	1/2	100	10,841	$6,65 \times 10^{-2}$	40,481
^{39}K	3/2	93,1	1,25	$4,75 \times 10^{-4}$	4,672
^{129}Xe	1/2	26,44	-7,452	$5,71 \times 10^{-3}$	27,856

TABLE B.1 – Les différents isotopes sensibles en RMN et leurs caractéristiques. Les valeurs sont issues de De Graaf (2007). La sensibilité relative est calculée comme étant le produit de la sensibilité magnétique avec la l’abondance naturelle par rapport à la sensibilité du ^1H .

le moment magnétique $\vec{\mu}$ de chaque spin individuel est orienté de façon aléatoire (Figure B.1,A). En présence d’un champ magnétique extérieur noté \vec{B}_0 et orienté suivant \vec{z} comme sur la Figure B.1, les moments magnétiques $\vec{\mu}$ des spins individuels s’orientent suivant \vec{B}_0 , mais de façon parallèle ou anti-parallèle (Figure B.1,C), correspondant à deux états énergétiques :

$$E = -\vec{\mu} \times \vec{B}_0 \quad (\text{B.1})$$

$$= m_s \times \gamma \times \frac{h}{2\pi} \times B_0 \quad (\text{B.2})$$

$$= \pm \frac{1}{2} \times \gamma \times \frac{h}{2\pi} \times B_0, \quad (\text{B.3})$$

avec B_0 l’intensité du champ magnétique en Tesla (T), γ le rapport gyromagnétique (MHz/T) et h la constante de Planck ($h = 6,6 \times 10^{-34}$ J.s) (Figure B.1,B). La répartition entre ces deux orientations obéit à la loi statistique de Maxwell-Boltzmann, avec un très léger excédent en faveur de l’orientation parallèle à la température ambiante (ou celle du corps), de l’ordre de 1×10^{-6} . C’est cette infime différence qui va être responsable du moment magnétique microscopique, \vec{M}_z utilisé en IRM (donc orienté suivant \vec{B}_0 , Figure B.1, D). Comme cette différence dépend directement de l’intensité B_0 , on voit l’intérêt d’utiliser des champs magnétiques élevés (11,7 T pour les études présentées dans le manuscrit).

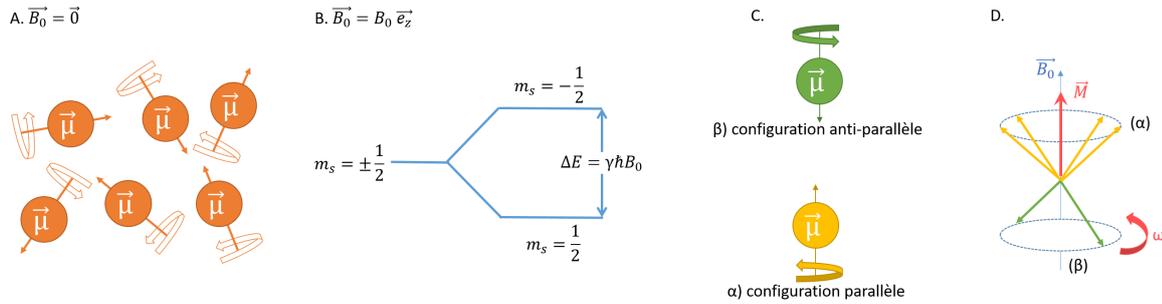


FIGURE B.1 – De l’aimantation microscopique $\vec{\mu}$ à l’aimantation macroscopique \vec{M} . En l’absence de champ magnétique extérieur, les moments magnétiques s’orientent aléatoirement et possèdent une valeur de spin $\pm 1/2$ (A). En présence d’un champ magnétique extérieur \vec{B}_0 , les moments magnétiques se distinguent par la valeur de leur spin ($+ 1/2$ ou $-1/2$) (B) et s’orientent parallèlement ou anti-parallèlement à \vec{B}_0 (C). L’aimantation macroscopique \vec{M} résulte de la somme des moments magnétiques microscopiques $\vec{\mu}$ (D).

B.2 Expérience canonique de résonance magnétique

B.2.1 Excitation radiofréquence

La différence d’énergie entre les niveaux "parallèles" et "anti-parallèles" est égale à :

$$h \times \gamma \times \frac{B_0}{2\pi} = h\nu. \tag{B.4}$$

Il est alors possible d’induire des transitions des moments magnétiques entre ces deux niveaux en "irradiant" les noyaux par des ondes électromagnétiques (photons) d’énergie correspondante, soit de fréquence $\nu = \gamma \times \frac{B_0}{2\pi}$: c’est le principe fondamental de la RMN. Pour le noyau d’hydrogène cette fréquence, appelée fréquence de Larmor, est de 42,6 MHz/T. Nous nous plaçons donc dans le domaine des radiofréquences, bien loin des rayons X ou γ qui sont aussi utilisés en imagerie, mais avec leurs effets ionisants. C’est pour cette raison que le terme "nucléaire" a été retiré pour l’IRM afin d’éviter toute confusion.

Une expérience de RMN va donc consister à modifier cette aimantation macroscopique d’équilibre via des impulsions radiofréquences (RF) (cette "excitation" peut aussi être réalisée de manière continue, mais pas en IRM) et à recueillir les photons qui vont être réémis par les noyaux quand ceux-ci vont retrouver leur aimantation d’équilibre.

Ces impulsions vont avoir deux effets :

1. une perturbation de l’équilibre entre les états parallèle et anti-parallèle avec deux situations particulières, l’annulation de l’aimantation macroscopique M_z (on parle d’impulsions 90° car tout se passe comme si l’aimantation macroscopique avait basculé dans un plan transversal) et l’inversion de l’aimantation en $-M_z$ (impulsion dite 180°).
2. une mise en cohérence des moments magnétiques élémentaires. À l’équilibre les moments élémentaires ne sont pas en fait tout à fait alignés avec \vec{B}_0 mais obéissent

à un mouvement de précession (comme une toupie précesse autour d'un champ de gravité terrestre), chacun de manière indépendante. Sous l'effet d'une impulsion RF les moments magnétiques vont synchroniser leur précession, ce qui fait apparaître une composante transversale M_{xy} . L'impulsion 90° induit la synchronisation maximale tandis que l'impulsion 180° ne crée aucune composante transverse M_{xy} .

Il se trouve que la composante transversale, M_{xy} précesse autour de l'axe Z (défini par \vec{B}_0) à la fréquence de Larmor. Les équations de Maxwell (électromagnétisme) et la loi de Biot et Savart nous indiquent qu'en plaçant une boucle de conducteur dont l'axe est dans le plan XY (perpendiculaire à \vec{B}_0) ce moment magnétique tournant y fait apparaître un courant. C'est le signal RMN qui sera utilisé pour faire les images IRM. La composante longitudinale du moment macroscopique M_z ne "tourne" pas dans une boucle de courant d'axe parallèle à \vec{B}_0 ne verrait aucun courant (et donc aucun signal). Cette différence fondamentale (qui s'explique par la valeur du spin du photon qui est de 1, ce qui lui vaut d'avoir une polarisation circulaire positive ou négative) va avoir des conséquences majeures en IRM.

En effet pour des raisons techniques les aimants des scanners IRM ont la forme de cylindres (solénoïdes réalisés à partir de matériaux supraconducteurs afin d'y faire circuler des courants de très haute intensité pour atteindre des champs magnétiques suffisamment élevés). Le champ \vec{B}_0 est donc dans l'axe de ce cylindre, tout comme l'axe des sujets d'expérimentation (Homme, rongeurs, échantillons etc.). Il serait tentant d'envelopper la tête des sujets d'une série de boucles de conducteurs (bobine) afin d'amplifier le signal recueilli, mais cette configuration est interdite (axe parallèle à \vec{B}_0). Faute de pouvoir disposer d'aimants gigantesques (permettant de positionner les sujets transversalement) il faut donc se contenter de boucles positionnées parallèlement au corps (bobines dites de surface), avec une couverture à distance et bien moins optimale du cerveau.

D'autre part, les impulsions 90° et 180° jouent un rôle fondamental en IRM et leur calibration (qui dépend de la configuration des sujets) est une étape importante précédant l'acquisition des images.

B.2.2 Évolution de l'aimantation au cours du temps

Les signaux induits par les impulsions RF (via l'aimantation transversale M_{xy}) ont une vie courte (quelques millisecondes ou dizaines de millisecondes) du fait du retour à l'équilibre de l'aimantation macroscopique à l'arrêt des impulsions. Tout d'abord, la synchronisation des moments magnétiques élémentaires va rapidement disparaître, ce qui va annuler M_{xy} et donc le signal. Cette désynchronisation est le fait que ces moments "voient" des champs magnétiques qui sont localement un peu différents. Phénoménologiquement la décroissance de M_{xy} suit une loi exponentielle de constante de temps T_2 (temps de relaxation spin-spin ou T_2) ou T_2^* si on inclut des sources externes d'hétérogénéité de champ, comme par exemple près des interfaces entre l'air, les os et les tissus. Une autre partie importante d'un examen IRM est le "shim", c'est à dire le réglage de l'homogénéité

du champ magnétique dans la partie du corps à imager à l'aide de variations de champ induites par de petites bobines de courant (bobines de shim).

Parallèlement, mais en général avec une constante T_1 plus longue, la composante longitudinale M_z va retrouver sa valeur d'équilibre (donnée par la statistique de Boltzmann). Cette constante dépend de l'interaction des moments élémentaires avec les atomes et molécules présents dans les tissus (relaxation spin-réseau).

B.2.3 Équation générale et référentiels

Une expérience de RMN ou d'IRM va consister en l'utilisation de combinaisons d'impulsions RF ("séquence IRM") qui vont manipuler l'aimantation des noyaux d'hydrogène, jouant sur les évolutions temporelles de l'aimantation transversale et longitudinale, via les temps de relaxations T_2 ou T_2^* et T_1 . D'une part il va falloir profiter des courtes périodes pendant lesquelles l'aimantation M_{xy} existe pour enregistrer des signaux nécessaires à la création d'images, d'autre part on va moduler l'amplitude de M_{xy} via les constantes de relaxation qui varient beaucoup selon les tissus et leurs états, ce qui est à l'origine du contraste générique dans les images IRM, avec la densité des noyaux hydrogène.

En l'absence d'échange chimique et de diffusion, l'évolution temporelle de l'aimantation \vec{M} est décrite par l'équation de Bloch (Torrey, 1949) :

$$\frac{d\vec{M}(t)}{dt} = \gamma \vec{M}(t) \times \vec{B}(t). \quad (\text{B.5})$$

avec $\vec{B}(t)$ le champ magnétique effectif auquel l'aimantation est soumise à l'instant t .

Elle décrit phénoménologiquement la précession de \vec{M} autour de \vec{B}_0 dans le référentiel fixe ou référentiel du laboratoire. Ce référentiel utilise un système de coordonnées cartésiennes (Oxyz), comme représenté sur la Figure B.2. Il existe un autre référentiel dans lequel la résolution de ce système d'équations différentielles est simplifiée : le référentiel tournant. Ce référentiel noté (Ox'y'z') est le référentiel dans lequel le plan (Oxy) tourne autour de l'axe (Oz) à une vitesse angulaire $\omega = -\gamma B_0$. Le champ \vec{B}_1 apparaît alors stationnaire (Figure B.2).

Pendant l'excitation

Au cours de l'excitation, le champ magnétique effectif $\vec{B}(t)$ est égale à la somme de \vec{B}_0 et de $B_1\vec{t}(t)$:

$$\vec{B}(t) = \vec{B}_0 + B_1\vec{t}(t) = \left(B_0 - \frac{\omega}{\gamma} \right) \vec{e}_z + B_{1x}\vec{e}_x. \quad (\text{B.6})$$

avec \vec{e}_z et \vec{e}_x les vecteurs unitaires suivant \vec{B}_0 et \vec{B}_1 respectivement. Le champ $-\frac{\omega}{\gamma}\vec{e}_z$ est équivalent à la rotation du repère tournant. Lorsque \vec{B}_1 est à la résonance ($\omega = \omega_0$), le champ $\vec{B}(t)$ est alors égal à $B_1\vec{t}(t)$. Par conséquent, seul le champ \vec{B}_1 peut influencer \vec{M}

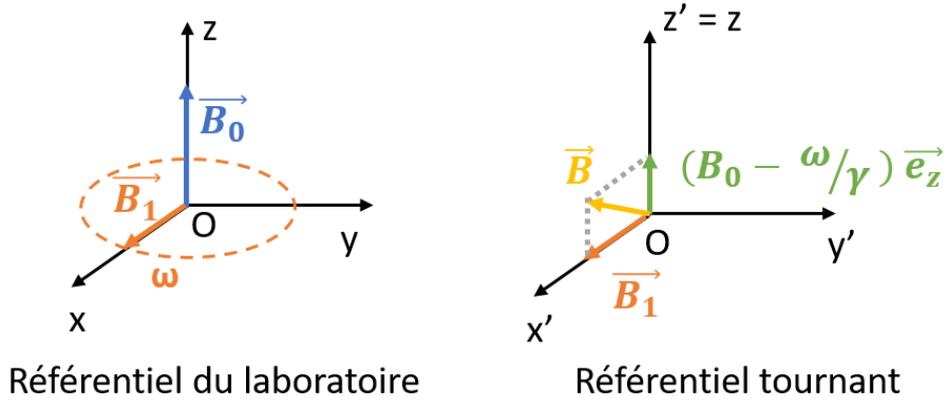


FIGURE B.2 – Système de référentiels utilisé pour la description de l'évolution de l'aimantation.

et l'équation (B.5) dans le référentiel tournant devient :

$$\frac{d\vec{M}'(t)}{dt} = \gamma \vec{M}'(t) \times \vec{B}_1(t). \quad (\text{B.7})$$

L'aimantation \vec{M} décrit alors un mouvement de précession autour de \vec{B}_1 . À la résonance, une fraction de l'aimantation longitudinale est excitée et bascule suivant \vec{B}_0 . Tandis que \vec{B}_0 effectue une rotation autour de \vec{B}_1 à la vitesse angulaire $\omega_1 = 2\pi\nu_1 = \gamma B_1$.

Lorsque l'on applique \vec{B}_1 pendant un temps τ relativement court, l'aimantation longitudinale $M_{z'}$ est alors basculée d'un angle $\alpha = \omega_1 \times \tau = 2\pi\nu_1\tau$

Après l'excitation

Par contre lorsque l'impulsion RF cesse, $\vec{B}(t) = \vec{B}_0$ et l'équation (B.5) décrit un mouvement de précession libre de \vec{M}' autour de \vec{B}_0 dans le référentiel fixe du laboratoire (Oxyz) (Figure B.3). L'équation (B.5) se décompose suivant les trois composantes ($M_{x'}(t)$, $M_{y'}(t)$, $M_{z'}(t)$). En prenant en considération les phénomènes de relaxation des spins qui se produisent à la suite d'une excitation ($\alpha=90^\circ$) lorsqu'ils retournent à leur état d'équilibre, on obtient :

$$\begin{aligned} \frac{dM_{x'}(t)}{dt} &= \gamma (M_{y'}(t)B_0(t) - M_{z'}(t)B_{1y}(t)) - \frac{M_{x'}(t)}{T_2} \\ \frac{dM_{y'}(t)}{dt} &= \gamma (M_{z'}(t)B_{1x}(t) - M_{x'}(t)B_0(t)) - \frac{M_{y'}(t)}{T_2} \\ \frac{dM_{z'}(t)}{dt} &= \gamma (M_{x'}(t)B_{1y}(t) - M_{y'}(t)B_{1x}(t)) - \frac{M_{z'}(t) - M_0}{T_1} \end{aligned} \quad (\text{B.8})$$

avec T_1 ou T_2 les temps de relaxation du système de spins. Sans l'ajout de ces termes, l'aimantation suivrait un mouvement de précession perpétuel, ce qui n'a pas de sens

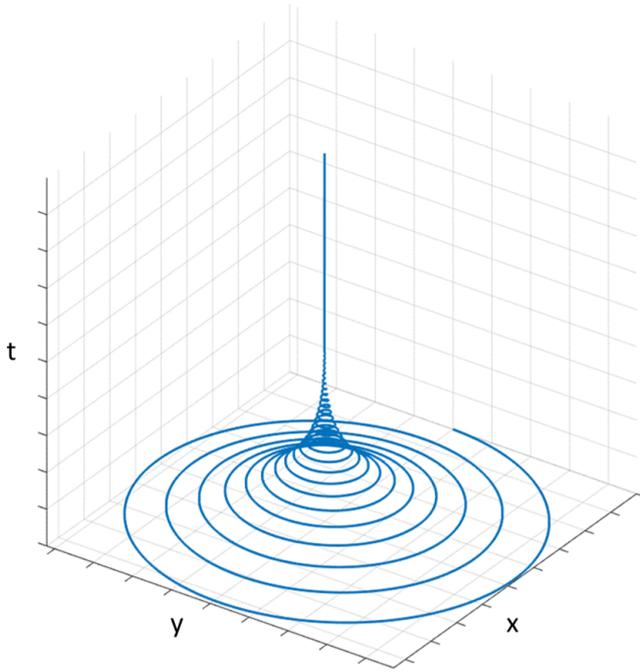


FIGURE B.3 – Évolution temporelle de l'aimantation transversale dans le référentiel fixe du laboratoire : précession libre.

physique. La résolution de ce système d'équations est simplifiée lorsque l'on adopte le référentiel tournant ($Ox'y'z'$). Les composantes ($M'_x(t)$, $M'_y(t)$, $M'_z(t)$) sont reliées aux composantes ($M_x(t)$, $M_y(t)$, $M_z(t)$) par les équations :

$$\begin{aligned} M'_x(t) &= M_x \cos(\omega t) + M_y \sin(\omega t) \\ M'_y(t) &= M_y \cos(\omega t) - M_x \sin(\omega t) \\ M'_z(t) &= M_z(t) \end{aligned} \quad (\text{B.9})$$

Dans ce référentiel ($Ox'y'z'$), la précession de l'aimantation s'effectue à la fréquence ($\nu_0 - \nu$). L'évolution de l'aimantation est alors régie par le système d'équations différentielles suivant :

$$\begin{aligned} \frac{dM'_x(t)}{dt} &= -(\omega_0 - \omega) M'_y(t) - \frac{M'_x(t)}{T_2} \\ \frac{dM'_y(t)}{dt} &= (\omega_0 - \omega) M'_x(t) - \frac{M'_y(t)}{T_2} \\ \frac{dM'_z(t)}{dt} &= -\frac{M'_z(t) - M_0}{T_1} \end{aligned} \quad (\text{B.10})$$

En pratique, la relaxation de la composante transversale est noté T_2^* . Elle tient compte du l'inhomogénéité macroscopique non aléatoire du champ \vec{B}_0 dans l'échantillon (ΔB_0). T_2^* est donc défini par :

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma(\Delta B_0) \quad (\text{B.11})$$

$T_2^* < T_2$ traduit l'accélération de la relaxation par les inhomogénéités de champ magnétique qui peuvent être causées par le flux sanguin ou la présence de fer dans l'échantillon.

En combinant les équations (B.9) et (B.10), on obtient les solutions de $M_{x'y'}(t)$ et

$M_{z'}(t)$ dans le référentiel $(Ox'y'z')$, la composante $M_{x'y'}(t)$ étant une grandeur complexe :

$$\begin{aligned}
 M_{x'}(t) &= M_0 \cos [(\omega_0 - \omega) t] \exp\left(-\frac{t}{T_2^*}\right) \\
 M_{y'}(t) &= M_0 \sin [(\omega_0 - \omega) t] \exp\left(-\frac{t}{T_2^*}\right) \\
 M_{z'}(t) &= M_0 \left(1 - \exp\left(\frac{-t}{T_1}\right)\right) \\
 M_{x'y'}(t) &= M_{x'}(t) + iM_{y'}(t) = M_0 \exp[i(\omega_0 - \omega) t] \exp\left(-\frac{t}{T_2^*}\right)
 \end{aligned}
 \tag{B.12}$$

Le mouvement de précession dans le référentiel $(Oxyz)$ se décompose alors par une diminution de la composante $M_{z'}$ et une augmentation de la composante $M_{x'y'}$ de façon exponentielle dans le référentiel $(Ox'y'z')$ (Figure B.4).

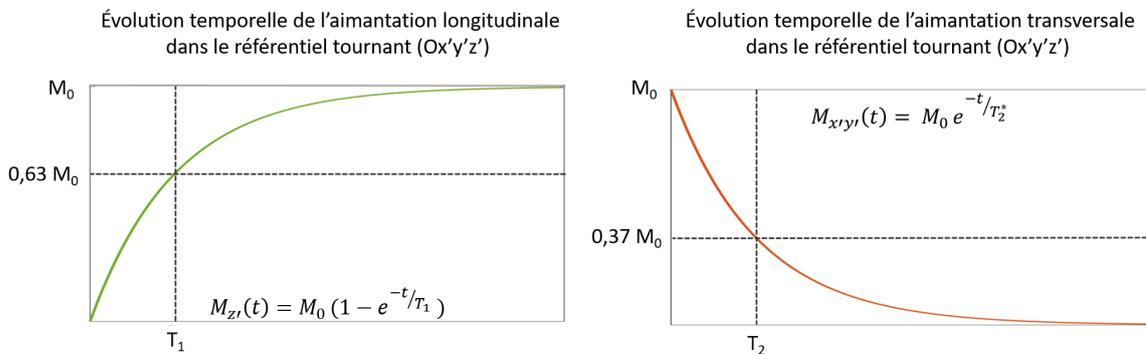


FIGURE B.4 – Évolutions temporelles de l'aimantation longitudinale (gauche, courbe verte) et transversale (droite, courbe rouge) dans le référentiel tournant à la résonance après une excitation RF de 90° .

B.2.4 Le signal RMN

D'après la loi de Biot et Savart, au cours de la relaxation des spins, les variations du vecteur transversal de l'aimantation ($M_{x',y'}^{\vec{}}$) induisent un courant électrique ou différence de potentiel (ddp) dans l'antenne de réception. En pratique, la bobine de réception est une boucle dont la normale est placée perpendiculairement à \vec{B}_0 . On désigne par "Free Induction Decay" (FID) le signal temporel RMN émis à la fréquence de Larmor à la suite d'une excitation :

$$\text{Signal}(t) = k \times M_{x',y'}(t) \times \cos(\omega_0 t + \phi)
 \tag{B.13}$$

Dans le cadre d'un monochromate, la FID se traduit dans le domaine fréquentiel par un spectre défini par une résonance unique $\nu_0 - \nu$. La partie réelle correspond au spectre d'absorption à la fréquence $\nu_0 - \nu$ et la partie imaginaire au spectre de dispersion (Figure B.5).

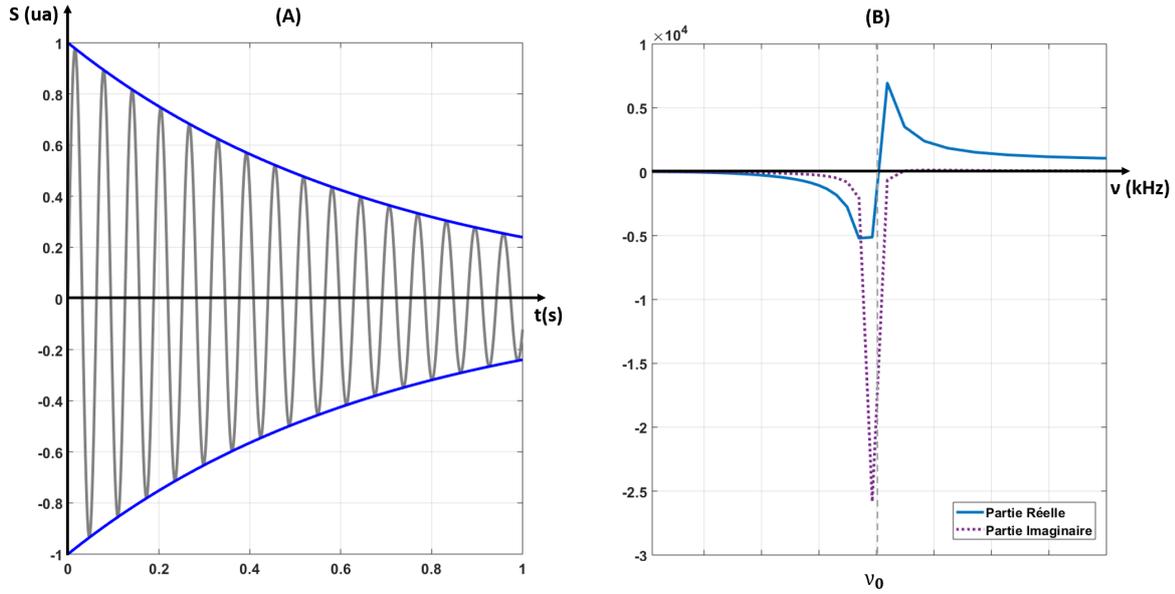


FIGURE B.5 – Évolution temporelle et fréquentielle du signal RMN. (A) Signal FID en unité arbitraire d'un monochromate. (B) Spectres d'absorption et de dispersion obtenus pour un monochromate. Les spectres d'absorption et de dispersion sont déphasés de $\pi/2$.

B.2.5 Les temps caractéristiques de relaxation T_1 , T_2 , T_2^*

Tel que formalisé par les équations (B.12), l'évolution temporelle de \vec{M} est régie par deux temps caractéristiques T_1 et T_2 . La relaxation longitudinale ou spin-réseau s'effectue par des interactions intermoléculaires (rotations, collisions). A contrario, la relaxation transversale aussi appelée spin-spin est régie par les interactions des spins avec les champs magnétiques locaux générés par des molécules paramagnétiques comme l'hémoglobine. La perte de cohérence de phase redistribue alors l'énergie entre les spins et provoque la décroissance de $M_{x,y}$ (Figure B.4).

Les valeurs de ces temps caractéristiques varient en fonction de la mobilité des molécules. Par exemple, on sait notamment que le temps T_1 dans les tissus augmente avec le champ \vec{B}_0 tandis que T_2 diminue. La Table B.2 résume les différents temps de relaxation pour les principaux tissus cérébraux : la substance grise(SG), la substance blanche (SB) et le liquide cébrospinal (LCS).

Tissus	T_1 (ms)	T_2 (ms)
SG	810	100
SB	680	90
LCS	2500	1400

TABLE B.2 – Valeurs des temps de relaxation des principaux tissus cérébraux à 1 T (Lakrimi et al., 2011).

Les temps de relaxation T_1 , T_2 et T_2^* sont à l'origine des contrastes les plus souvent exploités en IRM anatomique. On parle d'imagerie pondérée T_1 , T_2 et T_2^* respectivement.

B.2.6 La méthode d'écho de spin

Le signal d'écho a été découvert de manière fortuite par Hahn qui voyait réapparaître un signal sur son oscilloscope bien après une impulsion initiale (donc pas une FID) (Hahn, 1950). Il crut d'abord à un artefact, mais comme cet écho est réapparu le lendemain il a fini par comprendre qu'il s'agissait d'un phénomène avéré. L'écho apparaît à un temps $2t$ (aussi appelé temps d'écho (TE)) quand deux impulsions RF séparées par un intervalle t (ou TE/2) se succèdent, la 2^{ème} re-synchronisant les aimantations élémentaires qui se sont décalées suite aux variations locales du champ. La désynchronisation intrinsèque (T_2) persiste toutefois et l'amplitude de l'écho est inférieure à celle de la FID initiale. L'amplitude maximale est atteinte avec une paire d'impulsion 90° - 180° (séquence d'écho de spin (SE), Figure B.6). En jouant sur la valeur de TE on peut donc moduler M_{xy} et donc le signal selon la valeur de T_2 .

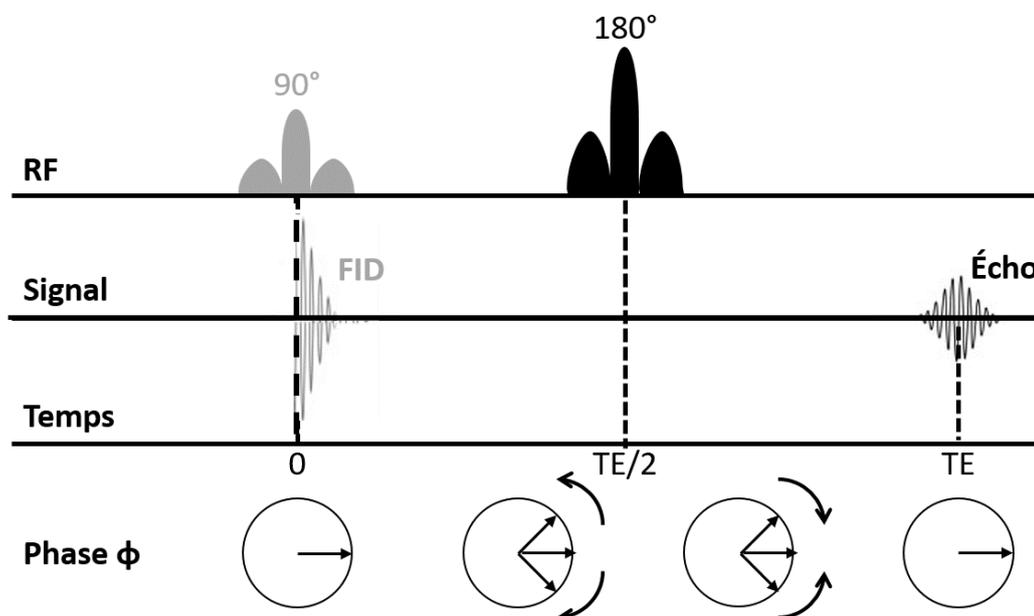


FIGURE B.6 – Chronogramme de la séquence d'écho de spin (SE). En l'absence de refocalisation, le signal décroît en T_2^* . Avec la refocalisation, les spins sont rephasés au temps TE.

Si on fait suivre une séquence d'écho de spin (SE) par une autre après un intervalle de temps TR, l'aimantation longitudinale M_z peut ne pas avoir retrouvé son état d'équilibre, selon le rapport TR/T_1 . L'aimantation M_{xy} (et donc le signal) du 2^{ème} écho sera donc amputée, la 2^{ème} impulsion 90° arrivant sur une aimantation incomplète. Le signal dépendra alors à la fois de T_1 et de T_2 .

Une autre séquence d'intérêt est l'inversion-récupération. Une impulsion 180° est utilisée précédant la séquence SE 90° - 180° d'un temps TI (temps d'inversion). L'aimantation M_z se trouve donc à une valeur comprise entre $-M_{z0}$ et $+M_{z0}$ (si M_{z0} est l'aimantation à

l'équilibre) au moment de l'impulsion 90° et le signal résultant (via M_{xy}) en sera dépendant, donnant un contraste dépendant de T_1 . Avec un temps $TI = T_1/\ln(2)$ l'aimantation M_z devient nulle lors de l'impulsion 90° . En présence de deux tissus de T_1 différents il devient possible de supprimer la contribution de l'un au signal total. Cette technique est notamment utilisée pour éliminer la contribution du LCS dans le cerveau ou encore de la graisse dans la myéline.

B.3 De la RMN à l'IRM

B.3.1 L'ajout de gradients de champ magnétique

Reste à obtenir des images, ce qui signifie encoder dans l'espace l'aimantation M_{xy} . Une manière de procéder est de rendre le signal homogène uniquement dans un petit volume d'intérêt (voxel) et de balayer de cette façon l'ensemble des voxels de l'objet ou organe que l'on souhaite imager. C'est la méthode des pionniers comme Damadian et Hinshaw, mais elle souffre de deux inconvénients majeurs : l'acquisition est très longue et les signaux très faibles (puisque seul le signal d'un voxel est acquis à la fois).

La méthode de Lauterbur est celle qui est restée (et qui lui a valu un prix Nobel en 2003 avec Mansfield). Elle repose sur l'utilisation de gradients de champs magnétiques (méthode qui avait été aussi proposée par le français Gabillard dans les années 1950). Puisque la fréquence de Larmor dépend de B_0 , on va volontairement rendre B_0 dépendant de l'espace, de manière contrôlée en superposant au champ B_0 un gradient de champ magnétique G ($= dB_0/dx$, pour la direction X). Au point X le champ est $B = B_0 + Gx$ et la fréquence de Larmor $\nu(X) = \gamma \frac{B_0 + Gx}{2\pi}$. Le signal IRM devient alors une sorte d'interférogramme comportant une somme de signaux suivant une distribution de fréquences selon leur origine spatiale. Une TF permet ensuite d'obtenir la distribution des signaux le long de la direction X . À noter que tous les noyaux d'hydrogène dans un plan de coordonnée X auront la même fréquence, on n'a donc en fait qu'une projection le long de la direction X . Afin d'obtenir une localisation en 3D dans l'espace il faut donc répéter le processus d'encodage dans 3 directions perpendiculaires. En pratique, et pour gagner du temps, les 3 encodages vont être réalisés séquentiellement au sein de la même séquence en jouant sur de petites variantes (impulsions de gradients présentes durant les impulsions RF ou durant l'acquisition du signal ou entre les impulsions RF et la lecture du signal) comme on va le voir (section B.3.2).

Les séquences décrites précédemment (SE, inversion-récupération) vont donc se compliquer avec l'adjonction d'impulsions de gradient aux impulsions RF, l'ensemble réalisant une véritable partition. Un point essentiel est que les signaux FID sont quasiment inutilisables en IRM car le signal décroît trop rapidement, surtout en présence d'impulsions de gradient qui désynchronisent les aimantations, et ne permettent donc pas l'encodage spatiale. Il est donc nécessaire de "retarder" les signaux pour en permettre l'encodage, ce qui paraît naturellement avec l'utilisation de la séquence SE.

Un point technique : Comme on peut le deviner la résolution spatiale va dépendre du pouvoir de séparation en fréquences, et donc de l'intensité des gradients de champ. Les scanners IRM destinés à l'animal disposent donc de systèmes de gradients bien plus intenses que pour les scanners IRM cliniques. Il faut noter que le champ magnétique supplémentaire utilisé pour l'encodage est aussi aligné avec \vec{B}_0 , ce qui veut dire que les gradients sont en fait dB_0/dz , dB_0/dy et dB_0/dx , ce qui rend la géométrie des bobines de conducteurs particulièrement complexe à réaliser (motifs en "selle de cheval"). D'autre part le champ magnétique crée par les courants envoyés dans ces bobines de gradient va s'opposer au champ principal, créant des forces de vibrations conséquentes, directement ou par l'intermédiaire de courants de Foucault induits dans l'ensemble de la structure du scanner IRM, à l'origine du bruit généré pendant les examens. Ces courants de Foucault, d'autant plus forts que les impulsions de gradients sont rapides et intenses, vont aussi perturber le champ magnétique localement et donc la correspondance supposée (programmée) entre position et fréquence de Larmor. Il en résulte des erreurs d'encodage qui se traduisent par des déformations géométriques des images qu'il va falloir corriger aussi bien lors de leurs acquisition que du traitement des signaux comme nous le verrons (ce problème est particulièrement important pour l'IRM de diffusion avec l'encodage "Echo Planar Imaging" ou EPI).

B.3.2 Encodage spatial du signal IRM

Une image IRM est une matrice d'éléments de volume de dimensions $(\Delta x, \Delta y, \Delta z)$ appelé voxels. Chaque voxel renferme le signal IRM complexe (amplitude et phase) provenant d'un élément de volume de l'objet imagé. La correspondance entre l'objet et l'image se fait via l'encodage spatial du signal IRM. Il repose sur trois méthodes distinctes : la sélection de coupe, l'encodage fréquentiel et l'encodage de phase. Elles nécessitent l'utilisation de gradients de champs magnétiques, à priori linéaires, suivant les trois directions de l'espace : G_x, G_y, G_z . Une autre convention pour les gradients d'encodage peut s'appliquer : $G_{coupe}, G_{phase}, G_{lecture}$. Pendant l'application des gradients G_x, G_y et G_z , le champ magnétique externe vu des spins contenu dans le voxel situé aux coordonnées (x_0, y_0, z_0) est égal à :

$$B(x_0, y_0, z_0) = (B_0 + G_z \times z_0) + (G_x \times x_0) + (G_y \times y_0) \quad (\text{B.14})$$

La combinaison des impulsions RF et des gradients d'encodage donnent lieu à des séquences IRM représentées généralement par un chronogramme. Quelle que soit la séquence d'imagerie choisie, elle se décompose en trois modules indépendants au minimum : l'excitation, l'encodage spatial et la lecture du signal IRM. Les séquences sont définies par deux paramètres temporels : le temps d'écho (TE) et le temps de répétition (TR). Le TE correspond au délai temporel entre l'excitation et le moment où le signal est maximum. Le TR est le délai temporel entre deux excitations successives.

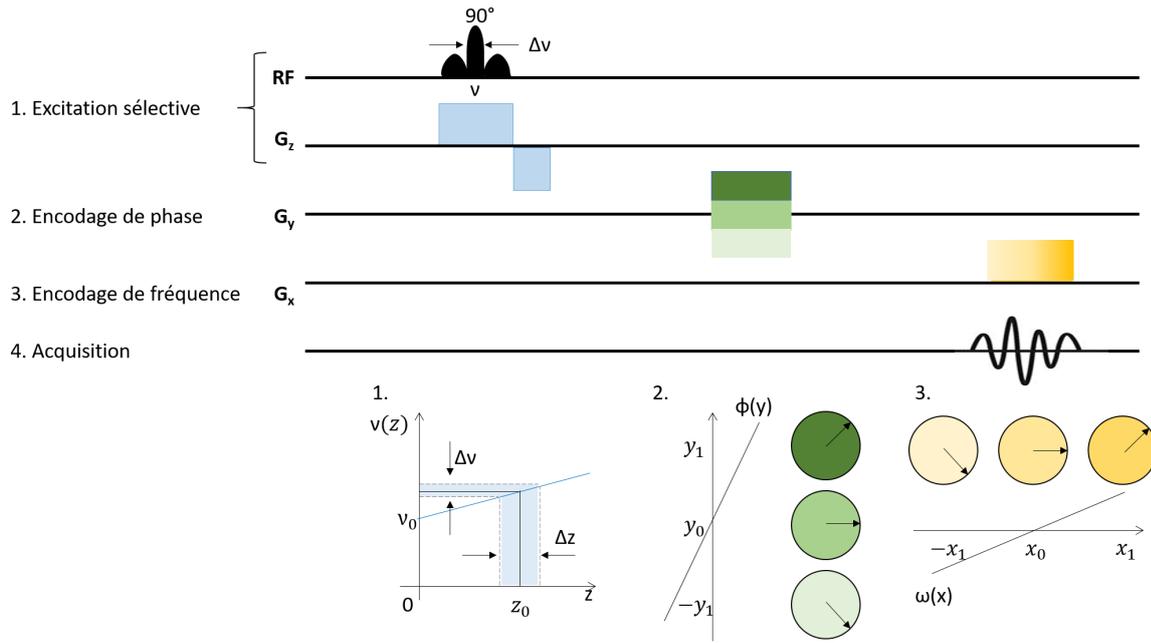


FIGURE B.7 – L’encodage spatial du signal IRM sur l’axe z , y et x successivement pour une séquence gradient écho (GE) 2D. Pour l’excitation sélective, un gradient de déphasage négatif est appliqué à la suite du gradient G_z de sélection de coupe.

Sélection de coupe

Le plus souvent les séquences IRM débutent par l’excitation sélective spatialement d’une coupe (sauf si on procède à des manipulations d’aimantation de type inversion), par exemple suivant (Oz) de l’espace d’épaisseur Δz comme représenté sur la Figure B.7. Elle s’obtient par l’application concomitante de l’impulsion RF d’excitation et du gradient de sélection de coupe G_z .

La fréquence de l’impulsion RF (ν) détermine la position z des spins destinés à être basculés :

$$\nu(z) = \frac{\gamma}{2\pi} (B_0 + G_z \times z) \quad (\text{B.15})$$

En pratique, l’épaisseur de coupe Δz est définie par les paramètres du gradient G_z et de l’impulsion RF :

$$\Delta z = \frac{2\pi \Delta \nu}{\gamma \times G_z} \quad (\text{B.16})$$

avec $\Delta \nu$ la bande passante de l’impulsion RF et G_z l’intensité du gradient.

Encodage de phase

Dans l’exemple explicité sur la Figure B.7, nous avons choisi d’effectuer l’encodage de phase suivant la direction (Oy) et l’encodage de fréquence suivant la direction (Ox) . À la suite de l’excitation sélective, l’encodage de phase consiste à appliquer le gradient de champ magnétique G_y . Les spins acquièrent alors une phase ϕ qui varie selon la position

sur l'axe (Oy) et le temps t après l'excitation suivant l'équation :

$$\phi(y, t) = \int_0^t \omega(y, t) \times dt = \int_0^t \gamma \times (B_0 + G_y \times y) \times dt \quad (\text{B.17})$$

$$\phi(y, t) = \gamma B_0 \int_0^t dt + \gamma \int_0^t G_y \times y \times dt \quad (\text{B.18})$$

Encodage de fréquence

Enfin, l'encodage de fréquence consiste en l'application du gradient de champ magnétique G_x au cours de la lecture de l'écho de gradient. La fréquence de précession dépend alors linéairement de la position des spins sur l'axe (Ox) suivant l'équation :

$$\omega(x) = \gamma (B_0 + B(x)) = \gamma \times (B_0 + G_x \times x) \quad (\text{B.19})$$

Ainsi après l'application de ces trois méthodes d'encodage, chaque voxel de la coupe sélectionnée de coordonnées (x_0, y_0) contient une densité de spins $\rho(x_0, y_0)$ avec une phase $\phi(y_0)$ et une fréquence de précession $\nu(x_0)$. Ainsi, le triplet (coupe, phase, fréquence) donne la localisation du signal IRM. Dans cet exemple, on considère un encodage cartésien de l'espace de Fourier.

Espace de Fourier (k-space)

L'espace de Fourier, aussi appelé k-space est un espace mathématique dont les axes principaux sont les fréquences spatiales k_x, k_y, k_z . Tout comme l'espace image, le k-space est représenté par une grille de dimensions $N_{k_x} \times M_{k_y}$ en 2D. En reprenant l'exemple de la séquence GE 2D de la Figure B.7, à chaque TR une nouvelle ligne du k-space est acquise. L'espace de Fourier est alors rempli sur une grille cartésienne tel qu'illustré sur la Figure B.8.

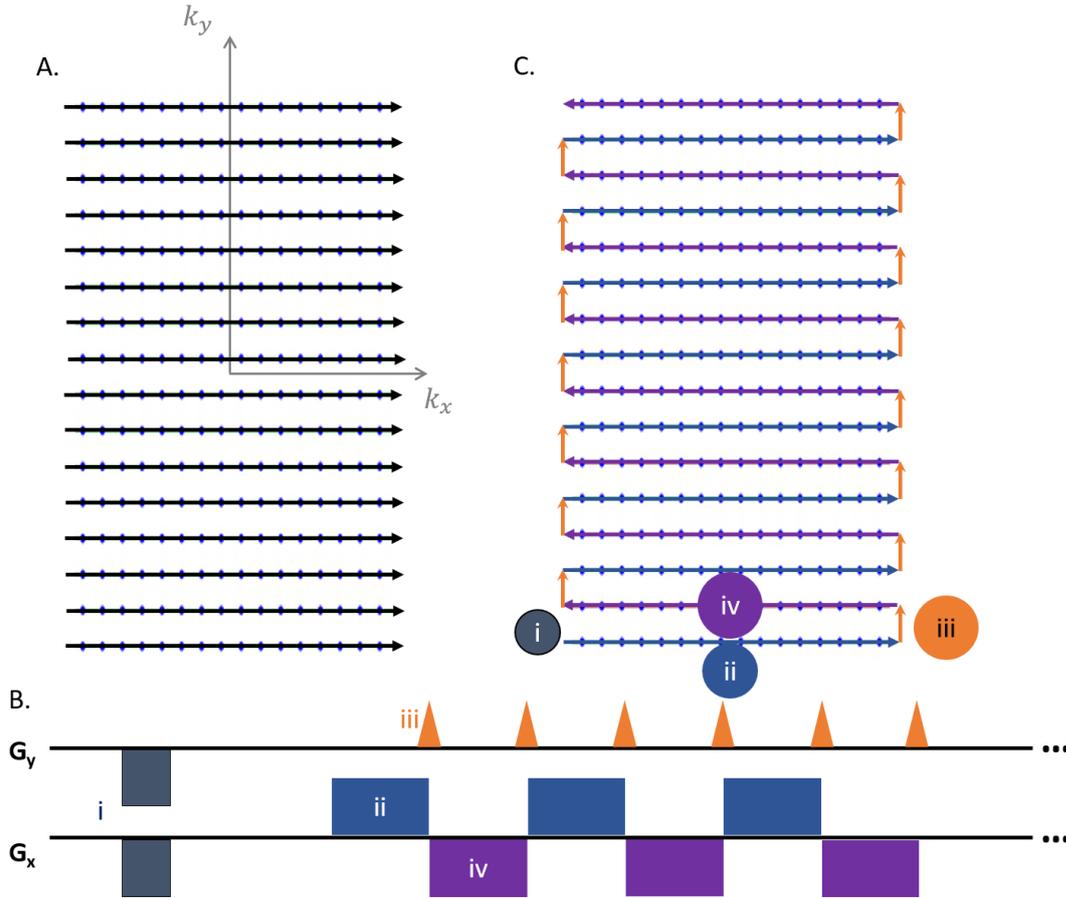


FIGURE B.8 – Encodage spatial du signal IRM et espace de Fourier. Trajectoire dans l'espace de Fourier avec un encodage cartésien (A). À chaque nouveau TR, une ligne de l'espace de Fourier est acquise dans la direction \vec{k}_x selon l'encodage présenté sur la Figure B.7. L'encodage du signal selon la méthode EPI (B) repose sur (i) la position de l'origine dans l'espace de Fourier, (ii) la lecture dans le sens donné par \vec{k}_x via le gradient de lecture G_x , (iii) changement de position sur l'axe k_y , via le gradient de phase G_y , (iv) la lecture dans le sens donné par $-\vec{k}_x$. La trajectoire dans l'espace de Fourier associée à l'encodage EPI est représenté en (C).

G_x et G_y permettent de se déplacer suivant k_x et k_y respectivement. Le centre de l'espace de Fourier correspond aux faibles déphasages tandis que la périphérie correspond aux déphasages plus élevés. Le contraste de l'image est encodé sur les basses fréquences spatiales tandis que les détails liés à la résolution de l'image sont encodés sur les hautes fréquences spatiales.

La fréquence d'échantillonnage $\delta\omega$ est restreinte par le théorème de Nyquist-Shanon :

$$\delta\omega_r \geq 2\nu_{max} \quad (\text{B.20})$$

$$\delta\omega_r \geq \frac{\gamma}{2\pi} G_r FOV_r \quad (\text{B.21})$$

avec $r=x, y, z$ et FOV_r , le champ de vue dans la direction r de l'espace image.

Pour rappel, le signal provenant d'un voxel (x, y) recueilli au temps d'écho TE est un signal complexe donné par :

$$s(x, y) = \rho(x, y) \times \exp(i\phi(x, y)) \quad (\text{B.22})$$

$$= \rho(x, y) \times \exp(i\gamma B_0 TE) \times \exp(i\gamma G_x \tau_x x) \times \exp(i\gamma G_y \tau_y y) \quad (\text{B.23})$$

Avec $\rho(x, y)$ la densité de protons et τ_x, τ_y la durée des gradients G_x et G_y . Au total, le signal de la coupe est obtenu en sommant le signal de chaque voxel :

$$S(x, y) = \int_x \int_y s(x, y) \quad (\text{B.24})$$

$$S(x, y) \propto \int_x \int_y \rho(x, y) \times \exp(i\gamma(G_x \tau_x x + G_y \tau_y y)) dx dy \quad (\text{B.25})$$

$$S(x, y) \propto \int_x \int_y \rho(x, y) \times \exp(i\gamma(k_x x + k_y y)) dx dy \quad (\text{B.26})$$

$$\propto TF(\rho(x, y)) \quad (\text{B.27})$$

$$(\text{B.28})$$

avec $k_x = \gamma G_x \tau_x$ et $k_y = \gamma G_y \tau_y$. De façon plus générale : $k_x(t) = \gamma \int_0^t G_x dt$ et $k_y = \gamma \int_0^t G_y dt$. La densité de proton $\rho(x, y)$ est alors obtenu par TF inverse du signal.

Outre le schéma d'encodage cartésien présenté sur la Figure 3.5 (A), il existe une multitude de schéma d'encodage : radial, spatial, spirale, aléatoire, etc. (Zhu et al., 2013; Scheffler et Hennig, 1996; Wright et al., 2014). Des techniques d'encodage ont également été développées pour ne pas acquérir l'intégralité du k-space tout en conservant le signal nécessaire à la reconstruction de l'image IRM. Par cette méthode de sous-échantillonnage, le nombre d'excitations et par conséquent le temps global d'acquisition est réduit (Wu et Miller, 2017; Scheffler et Hennig, 1996). Une autre technique consiste à acquérir le maximum de points dans l'espace de Fourier, voir leur intégralité (si on ne sous-échantillonne pas), en un seul TR : c'est la méthode de l'imagerie écho planaire ou EPI (Poustchi-Amin et al., 2001). Son principe est présenté sur la Figure 3.5 (B et C). Le k-space est balayé de gauche à droite et de haut en bas avec un schéma d'encodage de type créneau (dans le cas d'un encodage blippé). Le gradient de codage de phase (en orange sur la Figure 3.5 B et C) est intermittent et se répète, alors que le gradient de codage en fréquence est continue, seul son signe est inversé après chaque blip. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite des gradients à la fois intenses (lecture rapide du signal) et performants avec des temps de montée relativement courts pour les commutations de gradients. De plus l'encodage EPI est également sensible aux artefacts de déplacement chimique eau-graisse, qui se manifestent par le déplacement du signal de la graisse dans la direction de phase, c'est pourquoi il est recommandé de procéder à une saturation du signal de la graisse. Les distorsions géométriques sont une autre source d'artefact qui est favorisée lors de l'emploi d'un encodage EPI, notamment à cause de la présence de courants de Foucault. Ils favorisent également l'apparition d'artefacts de Nyquist du fait de l'acquisition non

parfaite de l'échantillonnage en fréquence. L'EPI est particulièrement utilisé en IRM de diffusion qui nécessite sans cela un temps d'acquisition relativement long et entraîne donc une sensibilité accrue aux artefacts de mouvements comme le ghosting. Il s'agit d'apparition d'images fantômes (augmentation d'intensité du signal dans une zone où il n'est pas censé être produit ou une diminution du signal qui devrait être produit), dans la direction d'encodage de phase.

B.3.3 La séquence d'écho de gradient

Parmi les séquences d'acquisition du signal IRM, on retrouve la séquence d'écho de gradient (GE pour "gradient echo"). Une séquence GE débute par une excitation avec un angle de bascule $\alpha \leq 90^\circ$. La lecture du signal IRM (FID) est conjointe à l'application d'un gradient bipolaire. Le premier lobe de ce gradient bipolaire, appelé gradient de rephasage (G(-)), est appliqué en amont du second lobe (G(+)). L'aire du gradient G(-) correspond à la moitié de l'aire de (G(+)) et son intensité est de signe opposé mais de valeur absolue égale. La plupart du temps, l'intensité de G(-) est négative alors que celle de G(+) est positive. L'application de G(-) induit une dispersion de la précession des spins et donc un déphasage tandis que G(+) permet la refocalisation des spins. Le moment où le rephasage est complet est appelé écho. Néanmoins, la séquence GE reste sensible à la présence d'inhomogénéités du champ magnétique macroscopique T_2^* , T_1 et à la densité de protons. La Figure B.9 schématise le chronogramme d'une séquence GE 3D. Dans le référentiel tournant (en négligeant l'effet des gradients d'imagerie), le signal IRM obtenu à partir de la séquence GE est défini théoriquement par l'équation :

$$S_{GE} = \frac{S_0 \times \sin(\alpha) \left(1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right) \times \exp\left(-\frac{TE}{T_2}\right)\right)}{1 - \cos(\alpha) \times \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right)} \quad (\text{B.29})$$

En fonction du TR, délai temporel entre deux excitations successives, et de la relaxation des spins, il est possible d'acquérir de multiples échos : c'est le principe de la séquence "multi gradient echo" ou MGE présenté dans la Figure B.10.

Pour un TR faible par rapport à la relaxation des spins, les résidus de l'aimantation transversale qui précèdent dans leur état d'équilibre persistent et contaminent le signal du TR suivant. Ces séquences portent le nom générique de SSFP pour "Steady State Free Precession". D'autres séquences dérivées à partir de la séquence GE dites "spoilées" (séquences SPGR, FLASH, FFE) limitent cette contamination. L'élimination de l'aimantation résiduelle peut s'effectuer par :

- la calibration du TR de façon à ce que sa valeur soit équivalente à environ 5 fois la valeur du T_2^* du tissu.
- un gradient de déphasage supplémentaire dont l'amplitude est variable à la fin de chaque TR.
- une impulsion RF de déphasage. C'est la méthode la plus efficace, elle consiste

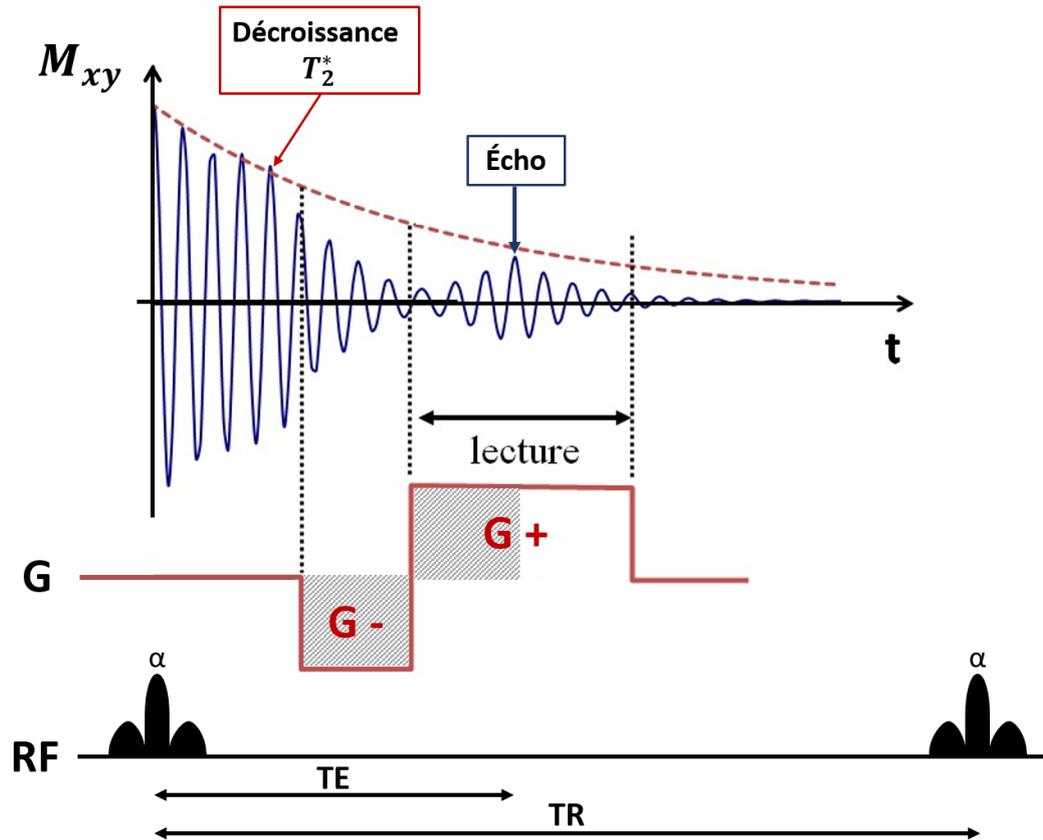


FIGURE B.9 – Écho de gradient 3D à la suite d’une excitation non sélective. L’aire du gradient G^- est égale à la moitié de l’aire du gradient G^+ . L’écho est recueilli au temps TE .

à faire varier la phase de façon aléatoire pour obtenir un déphasage indépendant spatialement.

B.3.4 La séquence d’écho de spin

La deuxième famille de séquence IRM est la séquence d’écho de spin (SE pour "spin echo"). Le concept de l’écho de spin a déjà été présenté dans la sous-section B.2.6. La séquence d’imagerie SE utilise les impulsions RF de l’écho de spin de Hahn (90° - 180° , sous-section B.2.6) auxquels des gradients de champ magnétique sont ajoutés dédiés à la localisation spatialement de l’écho recueilli (Figure B.11). Dans le référentiel tournant, le signal IRM obtenu à partir de la séquence SE est défini théoriquement par l’équation :

$$S_{SE} = S_0 \times \left(1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right) \times \exp\left(-\frac{TE}{T_2}\right) \right) \quad (\text{B.30})$$

Mis à part les modules de préparation du signal (nécessaire pour l’inversion-récupération), il est également possible de modifier cette séquence SE pour obtenir d’autres séquences IRM. En effet, tant que la relaxation T_2 n’est pas complète, il est possible d’acquérir

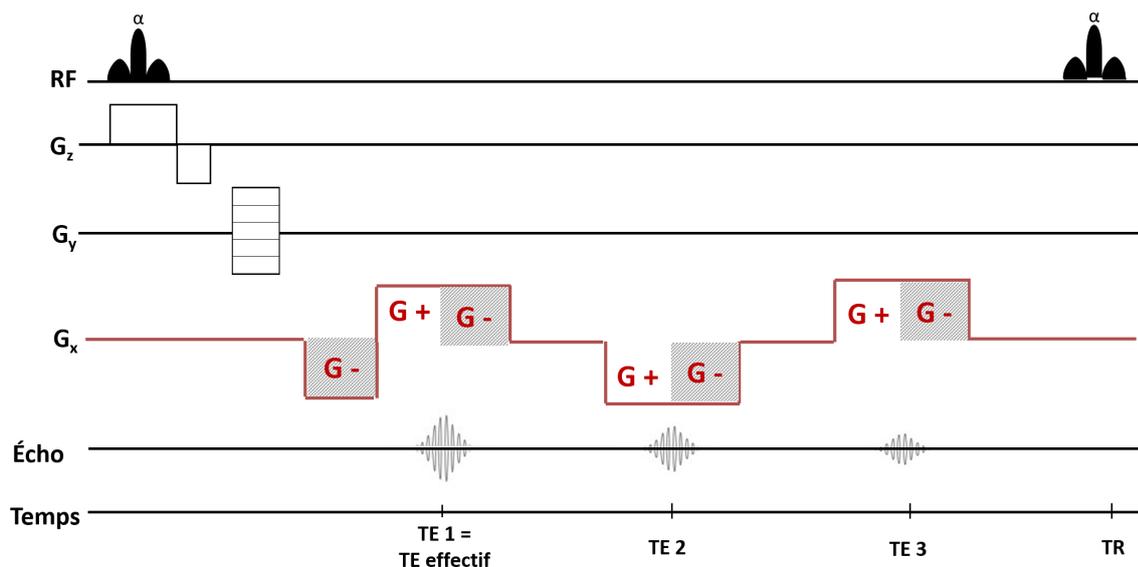


FIGURE B.10 – Chronogramme d'une séquence IRM "multi gradient echo" (MGE) 2D.

d'autres échos. Des impulsions RF 180° sont émises à $n \times TE/2$ avec $n = 1, 3, 5, 7 \dots$ et forment un train d'échos stimulés observés à $n \times TE/2$ avec $n = 2, 4, 6, 8 \dots$. C'est le principe de la séquence CPMG (du nom de Carr Purcell Meiboom Gill) (Meiboom et Gill, 1958) (Figure B.11, B). Globalement, l'inconvénient de ces séquences SE est le TR, relativement long qui entraîne des temps d'acquisitions importants par rapport aux séquences de type GE décrites dans la sous-section précédente B.3.3.

Des séquences SE dites rapides (Fast SE, Turbo SE) sont utilisées pour pallier à cet inconvénient. Le nombre d'acquisitions est réduit par le facteur Turbo qui est le nombre d'échos recueillis durant TR. En effet l'encodage spatial, décrit dans la section B.3.2, appliqué est différent pour chaque écho, ce qui permet de réduire le nombre de TR nécessaires pour acquérir le signal de tout un échantillon (Figure B.12).

B.3.5 Principaux contrastes en IRM

L'image IRM repose sur la carte de densité des noyaux ^1H des molécules d'eau (ρ) dans les tissus. Tel qu'évoqué précédemment, l'intensité du signal IRM est susceptible de représenter les variations de densité locale des molécules d'eau ainsi que ses caractéristiques. Par exemple la mobilité par les temps de relaxation T_1 et T_2 , ou encore les variations de concentration locales de molécules paramagnétiques et diamagnétiques qui influencent la pondération T_2^* .

L'optimisation de ces contrastes passe par le choix des séquences IRM et/ou l'ajout de modules spécifiques de préparation de l'aimantation \vec{M} . La Figure B.13 illustre les pondérations classiques accessibles en IRM. Comme illustré, la pondération en densité de protons présente un contraste modéré entre les compartiments. Dans le cas d'un monochromate, il est généralement obtenu avec un TE court et un TR long.

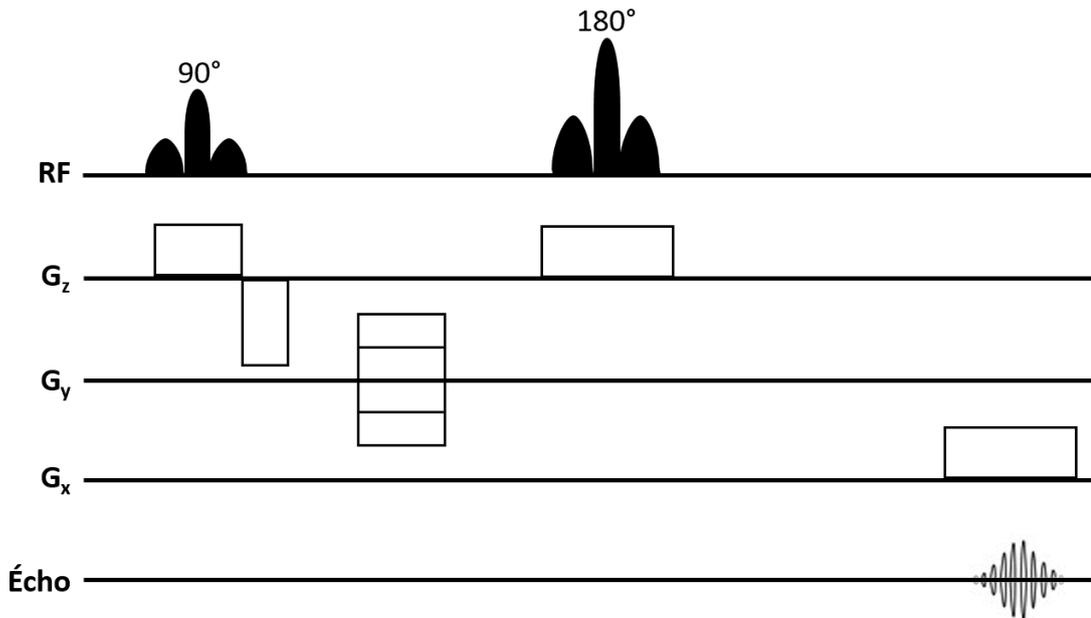


FIGURE B.11 – Chronogramme d'une séquence IRM de type SE.

Le contraste T_1 est obtenu le plus souvent à l'aide d'un module d'inversion appliqué en amont de l'excitation à un temps d'inversion TI. Ce temps est choisi de façon à ce que le LCS apparaisse en hypointensité (noir). La SB présentant la valeur de T_1 la plus courte possède l'intensité la plus élevée tandis que la SG présente une valeur de T_1 intermédiaire associée à un contraste gris.

Le contraste T_2 est le plus souvent obtenu à l'aide d'une séquence appartenant à la famille des séquences SE. La valeur effective du TE est choisie de sorte à être similaire au T_2 des tissus et le TR long. Les hypersignaux dans les images pondérées T_2 sont relatifs au LCS et/ou aux oedèmes. L'intensité du signal est plus modérée pour la SB alors que la SG apparaît grise.

Outre les contrastes T_1 et T_2 , l'IRM est une modalité d'imagerie versatile qui génère de très nombreux contrastes en raison de sa sensibilité à un certain nombre de phénomènes physiologiques. C'est le cas de l'IRM de diffusion (chapitre 3), de l'IRM fonctionnelle (Ogawa et al., 1990; Keilholz et al., 2017) ou encore de la spectroscopie RMN (Prost, 2008).

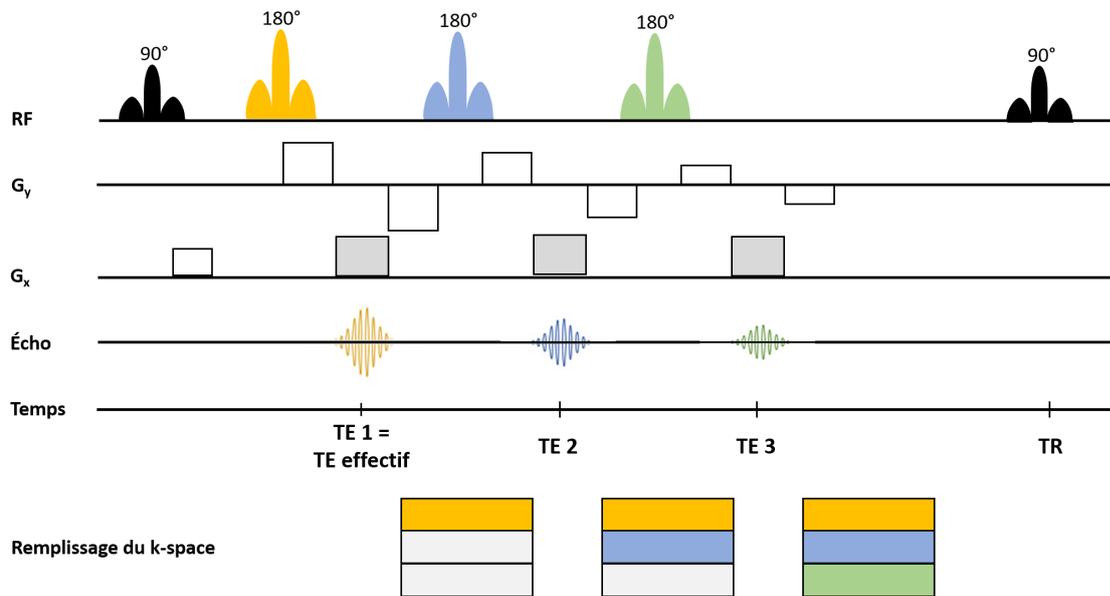


FIGURE B.12 – Chronogramme d'une séquence IRM de type Turbo SE, pour un facteur d'accélération (Turbo) de 3. En un seul TR, 3 lignes du k-space sont acquises.

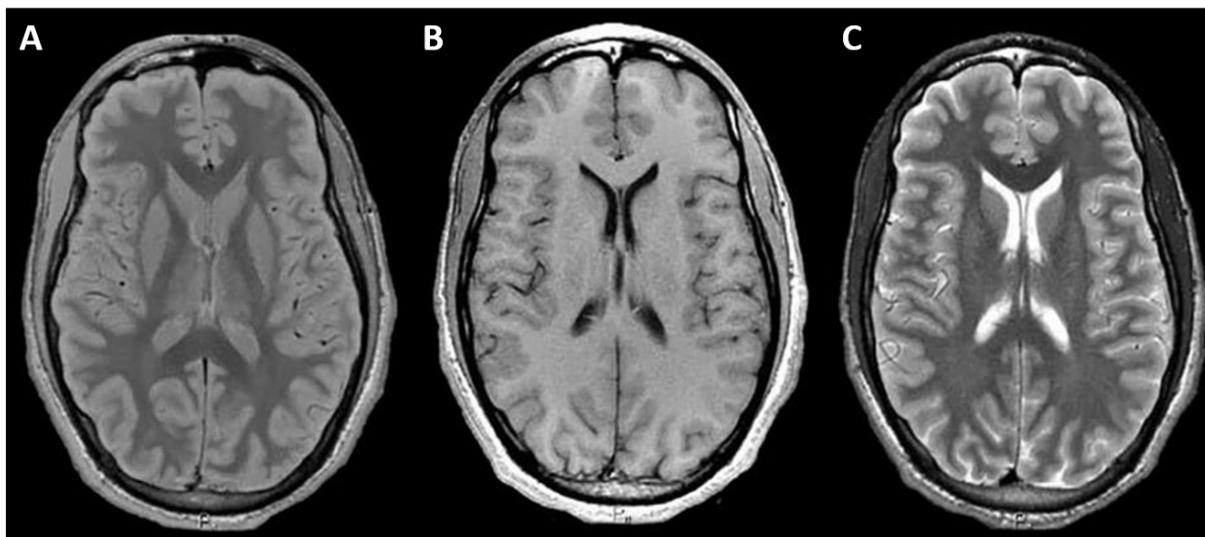


FIGURE B.13 – Exemple d'images IRM d'un cerveau humain non pathologique avec différents contrastes (Tanenbaum et al., 2017). Différentes pondérations sont présentées : (A) densité de protons, (B) T_1 , (C) T_2 .

Bibliographie

- Raymond Damadian. Tumor Detection by Nuclear Magnetic Resonance. 171 :1151–1153, 1970.
- Robin A. De Graaf. *In vivo NMR spectroscopy : principles and techniques*. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ, 2nd ed edition, 2007. ISBN 978-0-470-02670-0. OCLC : ocn124036293.
- R. R. Ernst and W. A. Anderson. Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance. *Review of Scientific Instruments*, 37(1) :93–102, 1966. ISSN 0034-6748, 1089-7623. doi : 10.1063/1.1719961. URL <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1719961>.
- R. R. Ernst, G. Bodenhausen, and A. Wokaun. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in one and two dimensions*. London / New York, oxford university press edition, 1990.
- Erwin L. Hahn. Spin echoes. *Physical review*, 80(4) :580, 1950.
- Shella D. Keilholz, Wen-Ju Pan, Jacob Billings, Maysam Nezafati, and Sadia Shakil. Noise and non-neuronal contributions to the BOLD signal : applications to and insights from animal studies. *Neuroimage*, 154 :267–281, 2017. ISSN 1095-9572. doi : 10.1016/j.neuroimage.2016.12.019.
- M Lakrimi, A M Thomas, G Hutton, M Kruip, R Slade, P Davis, A J Johnstone, M J Longfield, H Blakes, S Calvert, M Smith, and C A Marshall. The principles and evolution of magnetic resonance imaging. *J. Phys. : Conf. Ser.*, 286 :012016, 2011. ISSN 1742-6596. doi : 10.1088/1742-6596/286/1/012016. URL <http://stacks.iop.org/1742-6596/286/i=1/a=012016?key=crossref.39a46bd4391d4154499c3d883208c30f>.
- Paul C. Lauterbur. All Science is Interdisciplinary-from Magnetic Moments to Molecules to Men. *Bioscience Reports*, 24(3) :165–178, 2004. ISSN 0144-8463, 1573-4935. doi : 10.1007/s10540-005-2578-1.
- Peter Mansfield and A. Maudsley. Planar Spin Imaging by NMR. 27 :101–119, 1977.
- S. Meiboom and D. Gill. Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Review of Scientific Instruments*, 29(8) :688–691, 1958. ISSN 0034-6748, 1089-7623. doi : 10.1063/1.1716296.

- S. Ogawa, T. M. Lee, A. S. Nayak, and P. Glynn. Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields. *Magn Reson Med*, 14(1) :68–78, 1990. ISSN 0740-3194.
- Mehdi Poustchi-Amin, Scott A. Mirowitz, Jeffrey J. Brown, Robert C. McKinstry, and Tao Li. Principles and Applications of Echo-planar Imaging : A Review for the General Radiologist. *RadioGraphics*, 21(3) :767–779, 2001. ISSN 0271-5333. doi : 10.1148/radiographics.21.3.g01ma23767. URL <https://pubs.rsna.org/doi/full/10.1148/radiographics.21.3.g01ma23767>.
- Robert W. Prost. Magnetic resonance spectroscopy. *Medical Physics*, 35(10) :4530–4544, 2008. ISSN 2473-4209. doi : 10.1118/1.2975225. URL <https://aapm.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1118/1.2975225>.
- Klaus Scheffler and Jürgen Hennig. Frequency resolved single-shot MR imaging using stochastic k-space trajectories. *Magnetic Resonance in Medicine*, 35(4) :569–576, 1996. ISSN 1522-2594. doi : 10.1002/mrm.1910350417. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mrm.1910350417>.
- L. N. Tanenbaum, A. J. Tsiouris, A. N. Johnson, T. P. Naidich, M. C. DeLano, E. R. Melhem, P. Quarterman, S. X. Parameswaran, A. Shankaranarayanan, M. Goyen, and A. S. Field. Synthetic MRI for Clinical Neuroimaging : Results of the Magnetic Resonance Image Compilation (MAGiC) Prospective, Multicenter, Multireader Trial. *American Journal of Neuroradiology*, 38(6) :1103–1110, 2017. ISSN 0195-6108, 1936-959X. doi : 10.3174/ajnr.A5227.
- H. C. Torrey. Transient Nutations in Nuclear Magnetic Resonance. *Phys. Rev.*, 76(8) : 1059–1068, 1949. doi : 10.1103/PhysRev.76.1059.
- Katherine L. Wright, Jesse I. Hamilton, Mark A. Griswold, Vikas Gulani, and Nicole Seiberlich. Non-Cartesian Parallel Imaging Reconstruction. *J Magn Reson Imaging*, 40(5) :1022–1040, 2014. ISSN 1053-1807. doi : 10.1002/jmri.24521. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4092190/>.
- Wenchuan Wu and Karla L. Miller. Image formation in diffusion MRI : A review of recent technical developments. *J Magn Reson Imaging*, 46(3) :646–662, 2017. ISSN 1053-1807. doi : 10.1002/jmri.25664. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5574024/>.
- Yanchun Zhu, Song Gao, Liuquan Cheng, and Shanglian Bao. Review : K-space trajectory development. In *2013 IEEE International Conference on Medical Imaging Physics and Engineering*, pages 356–360, 2013. doi : 10.1109/ICMIPE.2013.6864568. ISSN : null.

Annexe C

Tests de comportements : Matériels et méthodes

Les expérimentations décrites dans cette section se sont déroulées à l'IRCM (Institut de RadioBiologie Cellulaire et Moléculaire) au Laboratoire de RadioPathologie (LRP) au CEA de Fontenay-aux-Roses.

C.1 Effectifs

Deux tests comportementaux ont été réalisés sur les différentes cohortes de souris pour les études présentées dans les chapitres 5, 6 et 7. Les souris utilisées pour ces deux tests comportementaux sont des souris mâles C57BL6/N âgées de 3 mois environ qui n'ont pas été imagées par IRM. La Table C.1 présente donc les effectifs dédiés spécifiquement aux tests comportementaux. Seules les cohortes irradiées à PN10 n'ont pas encore été testées

Groupes	Open Field	3 Chambers
WT Sham	14	11
WT IRR 1 Gy E14,5	11	10
WT IRR 100 mGy E14,5	18	10
Xlf-/- Sham	16	11
Xlf-/- IRR 100 mGy E14,5	15	10

TABLE C.1 – Effectifs des souris appartenant aux différents groupes dédiés aux tests comportementaux de l'"open field" et du test "3 chambers test for sociability and social recognition".

avec ces tests.

C.2 Test de l'"open field"

L'"open field" (OF) (Holmes et al., 2002) est une arène carrée de dimensions 50 x 50 x 40,5 cm³ dont le sol et les murs sont des plaques de plexiglass opaques grises. Elle est

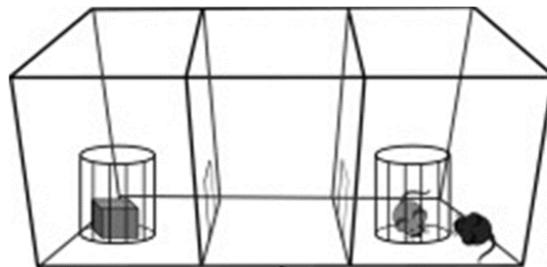
éclairée par une lumière directe de 55 lux située au-dessus de l'arène. Le dispositif est équipé d'un système vidéo relié au logiciel Etho Vision (Noldus) par un ordinateur.

Les souris sont placées individuellement dans un coin de l'arène et sont laissées libres de l'explorer pendant 5 minutes. La distance totale parcourue est enregistrée par le système vidéo et est utilisée comme un indicateur de l'activité locomotrice. Le temps passé dans la partie centrale de l'arène, un carré de 25,5 cm de côté, est également enregistré et mesure de façon indirecte l'anxiété de la souris.

C.3 Test du "Three-chamber test for sociability and social recognition"

Le dispositif utilisé pour ce test est une arène en polycarbonate transparent éclairée par une lumière directe de 10 lux située au-dessus de l'arène. L'arène est divisée par deux cloisons transparentes en trois chambres. Une partie de chaque cloison est mobile de façon à pouvoir passer d'une chambre à l'autre. Les deux chambres latérales contiennent une cage ronde en plexiglass fermée (Figure C.1).

Phase 1 : Discrimination objet/congénère



Phase 2 : Interactions sociales

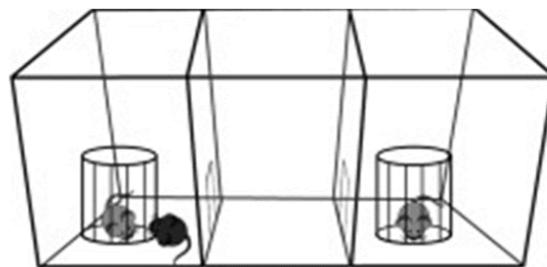


FIGURE C.1 – Schéma du dispositif utilisé pour le "Three-chamber test for sociability and social recognition". Les phases 2 et 3 du test sont schématisées sur la partie haute et basse de la figure respectivement.

Le test est divisé en trois phases de 5 minutes (Silverman et al., 2010) :

- La première phase consiste à positionner la souris dans la chambre centrale et de la laisser explorer la totalité du dispositif, y compris les deux chambres latérales

avec les cages.

- La deuxième phase est un test de sociabilité. Une souris mâle est placée dans la première cage alors qu'un légo est placé dans la deuxième (partie haute de la Figure C.1).
- La dernière phase est un test de nouveauté sociale. Le légo est retiré et remplacé par une nouvelle souris mâle (partie basse de la Figure C.1).

Pendant ces trois phases, le temps passé dans chacune des chambres est enregistré automatiquement à l'aide du système de vidéo Etho Vision.

C.4 Tests statistiques

Toutes les données basées sur les tests comportementaux sont présentées comme la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne (SEM). La significativité des résultats a été testée avec un test de Mann-Whitney à l'aide du logiciel Prism.

Bibliographie

A. Holmes, C. C. Wrenn, A. P. Harris, K. E. Thayer, and J. N. Crawley. Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes, Brain and Behavior*, 1(1) :55–69, 2002. ISSN 1601-183X. doi : 10.1046/j.1601-1848.2001.00005.x. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1601-1848.2001.00005.x>.

Jill L. Silverman, Mu Yang, Catherine Lord, and Jacqueline N. Crawley. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat Rev Neurosci*, 11(7) :490–502, July 2010. ISSN 1471-0048. doi : 10.1038/nrn2851. URL <https://www.nature.com/articles/nrn2851>.

Annexe D

Protocoles d'immuno-histologie

Les expérimentations décrites dans cette section se sont déroulées à l'IRCM (Institut de RadioBiologie Cellulaire et Moléculaire) dans le Laboratoire de RadioPathologie (LRP) au CEA de Fontenay-aux-Roses.

D.1 Apoptose à court-terme chez l'embryon

Effectifs

Le protocole de fixation lié à la quantification de l'apoptose à court terme a été mené chez les souris WT et Xlf^{-/-} Sham et irradiées à 100 mGy et 1 Gy à E14,5, avec N = 4 pour chacun des 6 groupes.

Fixation

Les têtes des embryons sont prélevées après sacrifice par dislocation puis fixées toute la nuit dans du paraformaldehyde (PFA) à 4 % et imprégnée en paraffine avec le système Tissu-tek (VIP, Leica, Wetzlar, Germany). Des coupes coronales d'une épaisseur 5 μ m sont réalisées au microtome (Leica RM2125RT) et montées sur des lames pour des analyses histologiques.

Après avoir retiré la paraffine et démasqué les coupes au tampon citrate pH6, elles sont incubées pendant 2h avec du serum fœtal bovin à 7,5 % et du serum de chèvre à 7,5% dans du PBS ("phosphate buffered saline") à température ambiante. Les lames sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C avec un anticorps primaire anti-caspase 3 clivée (anti-CC3) de lapin (Cell signaling, 9661, 1 :200). Après rinçages au PBS, les lames sont de nouveau incubées avec l'anticorps secondaire approprié pendant 1h (ici un Goat anti-Rabbit IgG (H+L), alexa 594, ref A11012, 1 :1000, Thermo). Après rinçage, le marquage des noyaux est réalisé avec du DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenolindole). Les coupes sont montées sous Fluoromount (Southern Biotechnologies associates, Birmingham, AL, USA).

Quantification

Les images sont acquises à l'aide d'un microscope à fluorescence 50i (50i, Nikon, Japan) avec un objectif $\times 10$ ($NA = 0,3$). Les cellules marquées positivement pour la caspase 3 clivée (CC3) sont comptées sur toute la longueur du télencéphale dorsal (cortex). Les pourcentages d'apoptose sont calculés sur une zone restreinte d'intérêt du télencéphale dorsal (par exemple les zooms numérotés sur la Figure 5.3 du chapitre 5).

D.2 Calcul d'aire et de densité cellulaire à long terme chez la souris adulte

Fixation

Les cerveaux des souris WT irradiées à E14,5 à 1 Gy ($N_{IRR} = 4$) et non irradiées ($N_{Sham} = 6$) âgées de 3 mois sont prélevés après sacrifice (anesthésie puis fixation intracardiaque). Ils sont ensuite fixés toute la nuit à $4^{\circ}C$ avec du PFA à 4%, puis stockés en PBS. Les cerveaux sont imprégnés de paraffine avec le système Tissue-tek. Des coupes sagittales de $10 \mu m$ d'épaisseur sont coupées et montées sur lames pour les analyses histologiques.

Après déparaffinage, les lames sont incubées avec du DAPI (4',6 diamidino-2-phénylindole) pour marquer les noyaux cellulaires.

Imagerie et quantification

Les images sont acquises sur une coupe complète à l'aide d'un microscope à fluorescence 50i (50i, Nikon, Japan) avec un objectif $\times 10$ ($NA = 0,3$).

L'aire de la structure cérébrale ainsi que le nombre de noyaux sont estimés avec ImageJ. L'aire des différentes structures cérébrales (cortex, bulbe olfactif, hippocampe, hypothalamus, thalamus, cervelet, corps calleux et mésencéphale) est définie à l'aide de l'atlas de Brain Allen (Allen Institute for Brain Science <https://mouse.brain-map.org>) que l'on superpose sur les coupes imagées (Figure D.1).

Le nombre de cellules est compté sur 5 régions : cortex 1, cortex 2, hippocampe, corps calleux et thalamus (Figure D.2). Les images dans ces régions sont seuillées afin d'obtenir une image binaire que l'on peut ensuite traiter à l'aide du programme d'analyse de particules. L'analyse de particules donne le nombre et l'aire du pixel marqué, qui peuvent être transposés en nombre de cellules. Le nombre de noyaux marqués est calculé indépendamment pour chaque région. Le nombre de cellules pour le cortex est obtenu en moyennant le nombre de cellules contenues dans les régions cortex 1 et 2.

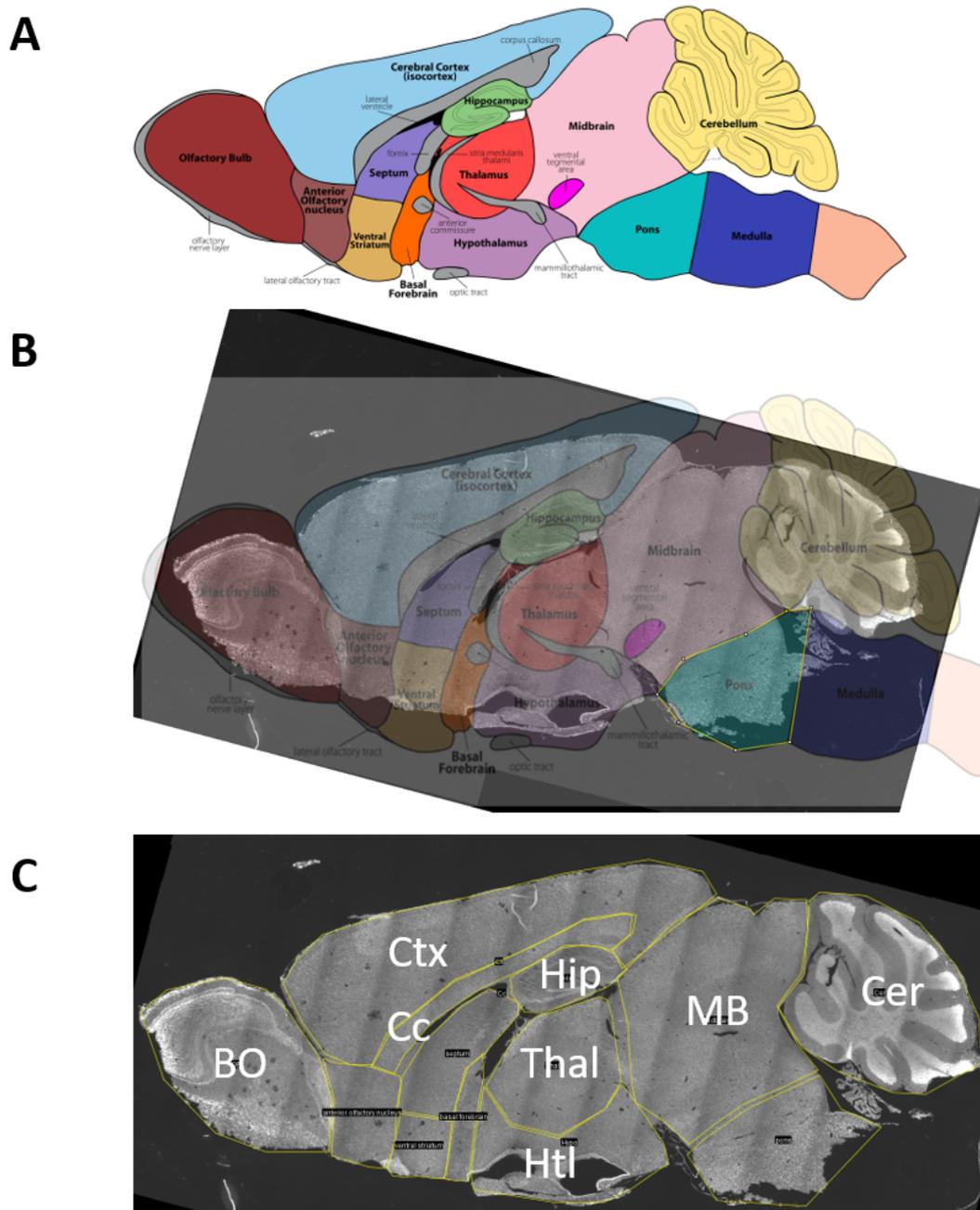


FIGURE D.1 – Définition des régions cérébrales sur les coupes histologiques pour le calcul des surfaces cérébrales. (A) Atlas du Brain Allen. (B) Atlas du Brain Allen superposé à une coupe histologique. (C) Définition des régions d'intérêt (ROI) sur la coupe histologique avec Ctx = cortex ; BO = bulbe olfactif ; Hip = Hippocampe ; Cc = corps calleux ; Thal = thalamus ; Htl = hypothalamus ; MB = mésencéphale et Cer = cervelet.

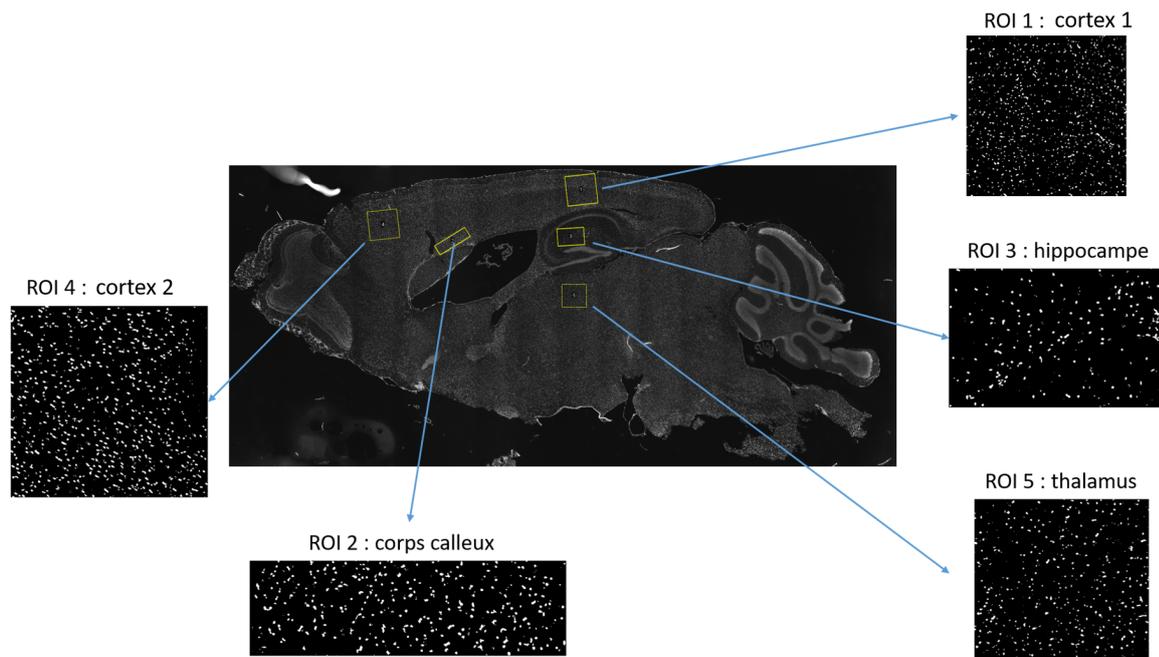


FIGURE D.2 – Représentation des régions cortex 1, cortex 2, hippocampe, corps calleux et thalamus pour le calcul de densité cellulaire à partir des coupes histologiques marquées au DAPI.

D.3 Analyses statistiques

Toutes les données sont représentées par la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne (SEM). La significativité statistique a été obtenue à l'aide d'un test de Mann-Whitney réalisé avec le logiciel Prism.

Annexe E

Article en préparation :

"Non-invasive assessment of whole brain radiosensitivity following *in utero* irradiation in mice : an anatomical and diffusion MRI study"

ARTICLE TITLE

**Noninvasive assessment of neurodevelopmental disorders after *in utero* irradiation in mice:
an *in vivo* anatomical and diffusion MRI study**

AUTHORS' NAMES AND AFFILIATIONS

Mouton L^{1,2,*}, MSc, Etienne O², MSc, Feat-Vetel J², PhD, Barrière DA¹, PhD, Pérès EA³, PhD,
Boumezbeur F¹, PhD, Boussin FD^{2,†}, PhD, Le Bihan D^{1†}, MD, PhD

¹ NeuroSpin, Frederic Joliot Institute, Commissariat à l'Énergie Atomique, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France.

² Laboratoire de RadioPathologie, UMRE008 Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, U1274 Inserm, Université de Paris, Université Paris-Saclay, iRCM/JACOB CEA, 18 route du Panorama 92265 Fontenay-aux Roses, France.

³ Normandie Université, UNICAEN, CEA, CNRS, UMR6030-ISTCT/CERVOxy group, GIP CYCERON, Caen, France.

RUNNING TITLE

Noninvasive assessment of brain irradiation with dMRI

Article to be submitted to *Radiation Research*

* Scholar in Training

† Corresponding authors :

Email: francois.boussin@cea.fr

Tel: +33 1 46 54 97 91

Email: denis.lebihan@gmail.com

Tel: +33 1 69 08 79 80

Mouton, L. and Etienne, O. and Feat-Vetel, J. and Barrière, D. and Pérès, E.A. and Boumezbeur, F. and Boussin, F.D. and Le Bihan D. Noninvasive assessment of neurodevelopmental disorders after *in utero* irradiation in mice: an *in vivo* anatomical and diffusion MRI study. *Radiat. Res.*

In utero exposure to ionizing radiation can lead to long-term cerebral alterations during adulthood. Using anatomical magnetic resonance imaging (MRI), it is possible to assess radiation-induced structural brain damage noninvasively. However, little is currently known about microstructure alterations in brain tissue. Therefore, this study aimed to establish, based on an original and robust pipeline of MRI image analysis, whether the long-term effects of *in utero* radiation exposure on brain tissue microstructure could be detected noninvasively. Pregnant C57BL/6N mice were irradiated with a single dose of 1 Gy on gestation day 14.5. At the age of 3 months, *in vivo* MRI data were acquired from irradiated ($N_{IRR} = 13$) and nonirradiated ($N_{Sham} = 21$) male mice. An MRI protocol was designed to assess the effects of radiation on the parameters of brain volume, non-Gaussian diffusion (ADC_0 , kurtosis, and signature index) and anisotropic diffusion (fractional anisotropy and mean, axial and radial diffusivities) in 10 key cerebral structures defined using an in-house atlas of the mouse brain. Based on the relative amplitude of these anatomical and microstructural changes, maps of the radiosensitivity of the brain to *in utero* irradiation were created. We observed global brain atrophy in irradiated mice with noticeably larger volumes of change in the cortex and the corpus callosum; we also observed signs of decreased cell density with a significantly higher mean diffusivity and a lower signature index (S-Index), which is an original measure of cellular density. Combining anatomical and diffusion MRI is a promising approach to noninvasively investigate the radiosensitivity of local brain areas in adult mice following *in utero* irradiation.

INTRODUCTION

Brain radiotherapy is currently used as a treatment modality for primary and metastatic brain tumors (1). However, ionizing radiation (IR) may lead to severe neurocognitive decline (memory, learning and executive function deficits) or dementia (2), especially when procedures involving IR are performed in children. Radiosensitivity is age- and dose-dependent, and children under 7 years of age are more likely to develop severe neurological impairments (2). The highest sensitivity to IR occurs *in utero* (2-7 weeks postconception in humans and 6-13 days postconception in mice) (3).

Epidemiological studies have reported long-term radiation-induced brain damage following *in utero* exposure either for medical purposes (computed tomography scans (4,5) and radiotherapy (6)) or following nuclear disasters (Hiroshima, Nagasaki (7-9), and Chernobyl (10)). Adverse effects are classified as mutagenic, teratogenic and carcinogenic. Complications, such as growth restriction, microcephaly or mental retardation, are possible teratogenic outcomes (11,12).

However, such epidemiological studies are challenging, especially studies of *in utero* exposure, with little control over the actual dosimetry. Moreover, many confounding factors may interfere with the results. Preclinical models allow those constraints to be partially alleviated and allow early radiation-induced biological processes to be better understood using *in vitro* or *in vivo* approaches. Indeed, several studies have demonstrated a decline in neurogenesis resulting from a decrease in neural stem cell proliferation and an increase in neural progenitor apoptosis, as well as neuronal differentiation alterations (13). This decline in neurogenesis, along with neuroinflammation and vascular abnormalities, constitutes early brain radiation-induced injuries that can cause later neurocognitive deficits (14-16).

In vivo magnetic resonance imaging (MRI) allows preclinical investigations to be carried out noninvasively and longitudinally. In particular, radiation-induced morphological and microstructural alterations in the brain have been shown using anatomical (aMRI) and diffusion MRI (dMRI). While cerebral lesions, such as necrosis and edema, can be tracked with aMRI, dMRI examines the microscopic movement of water molecules within tissues and is exquisitely sensitive to changes in tissue microstructure. For instance, diffusion tensor imaging (DTI), a variant of dMRI, provides information on axonal and myelin damage (axial diffusivity and radial diffusivity), white matter integrity (fractional anisotropy), and cellularity and membrane density (mean diffusivity). In a previous study, we introduced a new dMRI biomarker, the S-Index, short for the “signature index”, which is a distance marker that estimates the abnormality of a dMRI signal profile acquired at key diffusion-weighting values compared to a library of simulated generic signal profiles of normal and injured/pathological brain tissue types (17). In that study, the S-Index was found to be more sensitive for the detection of the neurogenesis decline in the adult mouse brain than the standard diffusion parameters calculated from diffusion weighted images acquired along 3 diffusion directions (apparent diffusion coefficient and kurtosis) (18). To date, most imaging studies have been conducted on animals irradiated during adulthood (19–22). Only a few studies have examined the long-term effects of *in utero* irradiation on the brain, except for volumetric analyses with aMRI (23,24).

The goal of this study was therefore to assess the ability of our multimodal MRI approach, in particular the S-Index, to noninvasively detect long-term cerebral alterations in mice after *in utero* exposure to IR at a dose high enough to induce neurobehavioral impairment but low enough to not significantly impact the viability of the mouse pups. Here, we developed an original image analysis approach based on the semiautomatic delineation of brain structures

by the registration of the anatomical and diffusion MRI data to the Turone Mouse Brain Template and Atlas (TMBTA). This pipeline analysis allowed us to determine in a robust and quantitative manner the long-term local brain damage induced by *in utero* irradiation; in particular, we examined the cerebral volume loss and decreased cell density caused by impaired neural cell proliferation and maturation.

METHODS AND MATERIALS

Animals

The *in vivo* experiments were performed on pregnant female C57BL6/N mice and their male offspring (Charles River Laboratories, L'ARBRESLE 4, France). The animals were maintained with *ad libitum* access to food and water at a constant temperature (19–22°C) and humidity (40–50%) on a 12:12-hour light/dark cycle. The experiments were approved by an ethics committee and government regulatory agency and performed in accordance with rules for the use of live animals for experimental purposes (APAFIS #20441-2019042915561380).

Irradiation

Pregnant mice were irradiated with a ^{137}Cs source (GSR-D1 irradiator, GSM GmbH) at 14.5 days of gestation (E14.5). A single dose of 1 Gy was delivered at a dose rate of 0.75 Gy/min with 100% isodose.

Immunofluorescence staining

Four hours after the single dose of 1 Gy or sham irradiation, pregnant mice at E14.5 were euthanized humanely. Embryonic heads were then collected and fixed overnight at 4°C by immersion in 4% paraformaldehyde (PFA) and embedded in paraffin with a Tissue-Tek processor (VIP, Leica, Wetzlar, Germany). Coronal sections (5 μm) were then obtained using a

microtome (Leica RM2125RT) and mounted onto glass slides for histological analyses. After paraffin removal and citrate treatment, the brain sections were incubated for 1 h with 7.5% fetal bovine serum and 7.5% goat serum in phosphate-buffered saline (PBS). The sections were incubated with a primary antibody (rabbit anti-cleaved-caspase 3 (Cell Signaling, Leiden, the Netherlands, 9661, 1 : 300) overnight at 4°C. After washing, the sections were incubated with a goat anti-rabbit Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibody (Thermo-Fisher Scientific, 1 : 500) for 1 h at room temperature. After washing, nuclei staining and slide mounting were achieved with Fluoromount containing 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Southern Biotechnologies Associates, Birmingham, AL, USA). The slides were stored at 4°C until observation by microscopy. Widefield pictures were acquired using a 50i fluorescence microscope (50i, Nikon, Japan) with a 10X (NA = 0.3) objective. The regions of interest of the brains, as defined in the dorsal telencephalon, were analyzed. For irradiated (IRR) and Sham embryos, the percentages of the nuclei (DAPI stained) positive for cleaved-caspase 3 were determined by using the open platform for scientific image analysis, ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2012).

Histological analyses of the adult mouse brain

Adult mice (3 months old) were perfused with saline solution and, after complete blood removal, with 4% PFA. Once extracted, the brains were fixed overnight at 4°C by immersion in 4% PFA, placed in PBS and embedded in paraffin with a Tissue-Tek processor (VIP, Leica, Wetzlar, Germany). Sagittal sections (10 µm) were obtained using a microtome (Leica RM2125RT) and mounted onto glass slides for histologic analyses. After paraffin removal and citrate treatment, nuclear staining and slide mounting were achieved with Fluoromount containing DAPI (Southern Biotechnologies Associates, Birmingham, AL, USA). Widefield

pictures were acquired using a 50i fluorescence microscope (50i, Nikon, Japan) with a 10X (NA = 0.3) objective. The following brain structures were delimited manually with the Allen Brain Atlas as a reference: The cortex, olfactory bulbs, hippocampus, hypothalamus, thalamus, cerebellum, midbrain and corpus callosum (**Figure 1**). The area of each brain structure was then estimated by multiplying the total pixel number contained in the structure by the image resolution ($0.42 \mu\text{m}^2$). The cell density of the cortex, hippocampus, corpus callosum and thalamus was evaluated in a defined area on two slides (one per hemisphere) for each mouse. To limit the impact of heterogeneity in large structures, such as the cortex or the thalamus, 3 and 2 areas, respectively, with identical surfaces for both slides were considered and then averaged. Finally, the cell density was estimated as the total number of stained particles (identified from the DAPI stained pixels using the particles analysis tool of ImageJ) divided by the considered area.

Behavioral tests

Behavioral tests were performed on the Sham and irradiated mice at 3-4 months of age. The open field was a squared arena (50 x 50 x 40.5 cm) with a gray Plexiglas floor surrounded by gray Plexiglas walls illuminated by direct overhead lighting (55 lux). The apparatus was assembled under a digital camera, which was connected to a computer and controlled by the EthoVision video-tracking system (Noldus, Wageningen, Netherlands). The mice were individually placed in a corner of the open field and left to freely explore the apparatus for 5 min. The total distance traveled in the arena was recorded as a measure of locomotor activity. The time spent in the central part (a square of 25.5 cm side) of the open field was automatically recorded and used to assess anxiety (25).

In the three-chamber test for sociability and social recognition (26), the mice were run individually in a three-chambered arena made of clear polycarbonate, illuminated by direct overhead lighting (10 lux). Retractable doorways built into the two dividing walls controlled access to the side chambers. Each of the two outside chambers had an inverted empty wire cup. The test consisted of three consecutive trials. In the first 5-min trial (habituation), the test mouse was placed in the center chamber and was allowed to freely explore the entire apparatus, and the wire cups were empty. In the next 5-min trial (sociability), an unknown male congener was placed under one of the two wire cups, while a Lego™ brick was introduced under the other wire cup. In the last 5-min trial (social recognition), a second unknown congener was placed under the wire cup where the object was previously located. For randomization purposes, the object/novel mouse sides were switched between subjects. Automatic monitoring recorded and scored the time spent in each chamber using the EthoVision video-tracking system.

MRI acquisitions on adult mouse

MRI acquisitions of 3-month-old mice ($N_{IRR} = 13$ and $N_{Sham} = 21$) were performed using an 11.7 T MRI scanner equipped with a CryoProbe dedicated to mouse brain imaging (Biospec, Bruker BioSpin, Germany). The total acquisition time was approximately 90 min, during which the animals were anesthetized with 1.5-2% isoflurane in an air/O₂ mixture (50:50). The respiration rate was monitored (60–80 breaths/min), and the body temperature was maintained at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ using a heated water circuit incorporated into the cradle. The head was placed in a supine position and restrained stereotaxically by a bite bar and ear pins. For each animal, the protocol consisted of the acquisition of (i) anatomical T_2^* -weighted (T_{2w}^*) images (multigradient-echo sequence, TR = 90 ms, 14 echoes with TE ranging from 2.2 to 28.2 ms, and

resolution = 100x100x100 μm^3) and (ii) diffusion-weighted images (spoiled PGSE-EPI sequence, TE/TR = 25.5/3000 ms, resolution = 125x125x250 μm^3 , 2 segments, $\delta/\Delta = 3/12$ ms, and 19 b-values ranging from 10 to 3000 s/mm^2 along 6 orthogonal directions of diffusion). The dMRI acquisitions were repeated three times and averaged.

MRI data processing

Mouse brain template, probabilistic maps and priors. The anatomical images were segmented and coregistered to the mouse brain TMBTA (https://www.nitrc.org/projects/tmbta_2019). The TMBTA provides probabilistic maps of mouse gray matter (GM), white matter (WM) and cerebrospinal fluid (CSF) generated from 138 T_2 -weighted images acquired in female RjOrl:SWISS mice (8 weeks old, 20-25 g, Janvier Laboratory, Le Genest-Saint-Isle, France). The TMBTA template is provided with a normalized version of the Allen Brain mouse atlas (27), which consists of a mosaic of 1320 labeled regions covering the entire mouse brain. The development of this specific mouse template, priors, atlas building and normalization processing were performed using previously described methodologies (28).

Anatomical MRI (aMRI) processing. First, the 14 echo images for each animal were added to yield individual T_{2w}^* images with an optimal contrast-to-noise ratio between gray and white matter. Those T_{2w}^* images were then processed using a dedicated semiautomatic segmentation pipeline to create the whole brain, GM, WM and CSF masks (**Figure 2**). First, manual alignment and resizing of the T_{2w}^* image onto the mouse brain template was performed (**Figure 2A**). The steps of the pipeline were automated and consisted of the following. (i) A bias-field correction was applied (**Figure 2B**) with a nonparametric nonuniform intensity normalization approach (29) implemented in 3D-slicer (<http://slicer.org/>), which was

aimed at reducing signal inhomogeneities due to the use of a surface antenna (in the top-bottom direction). (ii) The full registration parameters between the bias-field corrected T_{2w}^* image (**Figure 2B**) and the template, as well as the GM and WM tissue classification, were computed using the “Segment” function of the SPMmouse (<https://www.spmmouse.org>) toolbox implemented with MATLAB (MathWorks, Natick, MA) (30). Briefly, the function affinely coregistered the bias-field corrected T_{2w}^* (**Figure 2B**) to the template. Then, for each voxel, we assigned the probability of belonging to a tissue class (GM, WM, CSF or background) by fitting the signal intensity with a mixture of Gaussians (four for each tissue class) and joined the resulting segmentation with the prior information. These two steps (coregistration and segmentation) were iteratively repeated to extract the GM, WM and CSF signal contributions from the total T_{2w}^* signal (**Figure 2C**). (iii) The GM and WM probability maps in the individual aMRI space (**Figure 2D**) were obtained from the application of the inverse transformation calculated in step (ii). (iv) The GM and WM probability maps in the aMRI space resulting from step (iii), for which the values ranged from 0 to 1, were further thresholded to limit the voxel misclassification (threshold value: 0.5). In this way, a voxel was labeled as WM, GM or CSF (**Figure 2D**). Moreover, the voxels marked as CSF were removed from the GM and WM probability maps (**Figure 2E**). (v) The final WM and GM masks (**Figure 2F**) were added to define the whole brain tissue mask (**Figure 2G**). The CSF mask definition was established independently from step (ii) using the 3D semiautomatic active contour segmentation tool from ITK-Snap (31). Spherical seeds were positioned in the 4 ventricles manually (3 by ventricle) on the T_{2w}^* image in the aMRI space (**Figure 2A**), and they were allowed to grow until they crossed the CSF boundaries. The volume occupied by the seeds was thus assigned to the CSF volume. The whole-brain, GM, WM and CSF volumes were computed as the voxel count of their respective masks multiplied by the voxel size (0.001 mm³).

All the brain structures studied (cerebellum (Cer), cortex (Ctx), hippocampus (Hip), hypothalamus (Htl), midbrain (MB), olfactory bulbs (OB), *striatum* (Str), thalamus (Thal), corpus callosum (cc) and white matter excluding the cc (WM*)) were defined based on our in-house atlas (**Figure 3**). This ensemble of ROIs was set as a reference “r-atlas” and was used for the semiautomatic delineation of those brain structures in the individual aMRI space of each mouse. This process was divided into the following steps. First, the extracerebral signal was removed from the previous bias-field corrected T_{2w}^* images (**Figure 2B**). Then, the preprocessed T_{2w}^* image was registered to the mouse brain template by applying the nonlinear transformation computed with FSL (32–34), which allowed the transfer from the individual aMRI space to the mouse brain space (T_a , **Figure 4**). Reversibly, the application of the inverted transformation T_a^{-1} to the ROIs belonging to the r-atlas enabled the definition of different brain structures in the individual aMRI space (**Figure 4**, left part).

Diffusion MRI. Images were first denoised by reducing the background noise (17) and then checked for stability. Stability maps were established by calculating signal variations occurring between repetitions on a voxel-by-voxel basis. The data sets for which signal variations exceeded 12% on any brain region on more than one slice were discarded for further analysis. Ultimately, dMRI data sets from 7/13 irradiated and 14/20 Sham mice were considered in this study. The signal intensity was then averaged over repetitions for each b-value on a voxel-by-voxel basis. Based on the diffusion tensor imaging (DTI) framework (35), the diffusion tensor value was calculated and diagonalized for each voxel, and the following parametric maps were generated: mean diffusivity (MD), fractional anisotropy (FA), and radial and axial diffusivity (RD, AD). To optimize sensitivity to non-Gaussian diffusion (known to be more sensitive to tissue microstructure), the DTI parameters were calculated with relatively high key b-values

($b = 400$ and $b = 2250$ s/mm²) (17,18). To emphasize this “shift” compared to more conventional b-values (e.g., 0 and 1000 s/mm²), an ‘s’ (as in ‘shifted’) was added to the relevant DTI quantities (i.e., sMD, sFA, sRD, sAD) (**Figure 5**). Notably, the sMD, sRD and sAD values are expected to be lower than the values of their conventional counterparts MD, RD and AD, while sFA would be higher than FA. Furthermore, as in a previous study (18), we also investigated tissue diffusion properties through the intravoxel incoherent motion (IVIM)-non-Gaussian model (36,37). The diffusion-weighted signals acquired for all 20 b-values were first averaged over repetitions and directions on a voxel-by-voxel basis and then fitted to the IVIM-non-Gaussian model equation to provide the following non-Gaussian parametric maps: apparent diffusion coefficient (ADC_0) and kurtosis (K). The IVIM parameters (D^* and f_{IVIM}) were mostly considered to increase the fit accuracy. In addition, maps of a direction invariant S-Index (signature index) (17,18) were calculated (**Figure 5**) after geometric averaging the images acquired at our two key b-values (400 and 2250 s/mm²). The S-Index value, which has been shown to be more sensitive for detecting changes in tissue microstructure (18), was obtained by calculating a signal profile relative to the distance between the experimental diffusion-weighted signals and a dedicated library of signature signals representing “reference tissues” (17). Here, the normalized signature signals from 2 tissues, A and B, were used as the key b-values from data acquired in healthy animals, representing “generic brain tissue” ($S_A(400) = 0.784$; $S_A(2250) = 0.323$; $S_B(400) = 0.750$; $S_B(2250) = 0.251$). Tissues exhibiting high SI values would correspond to tissues with a high-diffusion hindrance (as in white matter) and inversely (as in gray matter). A tissue with diffusion properties similar to A will have an SI value = 75, while a tissue similar to B will have an SI value = 25.

The average diffusion parameters (ADC_0 , K, SI, sFA, sMD, sAD, sRD) were also calculated in the brain structures of interest as defined in our r-atlas following an identical process to that used

for the analysis of our aMRI data except for a few additional steps: (i) A similar FSL registration pipeline (32–34) was performed using the average of the 9 nondiffusion-weighted images as input (**Figure 5**, top right panel). (ii) To limit CSF contamination within our ROIs, voxels with an sMD value higher than 7×10^{-4} mm²/s were eliminated. This threshold was equal to $\mu + 3\sigma$, with μ representing the mean and σ representing the standard deviation of the Gaussian fit to the average sMD histogram from the Sham cohort. (iii) Additionally, due to residual signal inhomogeneities particularly close to the radiofrequency coil, 3D “erosion” was applied to further refine our ROIs. Specifically, in the plane, opening and closing operations were applied to remove small clusters of voxels that were not connected and to avoid overlap between the ROIs. In the slice direction, we chose to ignore the slices containing less than 10% of the total number of voxels in the ROI.

Statistical analyses

Group analysis of our ROI-based aMRI and dMRI data was performed for each derived parameter to evaluate the significant changes between the Sham and IRR cohorts. The normalized differences for a given parameter P between the IRR and Sham groups were calculated as: $\Delta P (\%) = 100 \times \frac{P_{IRR} - P_{Sham}}{P_{Sham}}$. The significance level (p -value) was computed with a nonpaired bilateral Student’s t -test. For each group, the MRI-derived parameters are presented as the mean \pm the standard deviation. For both the immunohistological and behavioral data, the results are presented as the mean \pm the standard deviation, and statistical significance was assessed with a Mann-Whitney test performed with GraphPad Prism. The significance level was defined as $p < 0.05$.

RESULTS

Mouse social behavior impairment after 1 Gy *in utero* irradiation at E14.5

We first investigated the behavioral consequences of 1 Gy irradiation at E14.5. This dose was chosen because it did not significantly affect animal viability (**Figure 6A**), despite the considerable level of apoptosis in the brain, as shown in **Figure 6B**. Indeed, a high number of cleaved caspase-3-positive cells were detected around the lateral ventricles, reaching nearly 16% of cells in the dorsal telencephalon 4 h after irradiation (**Figure 6C**); this finding was consistent with previous works showing the high radiation sensitivity of embryonic neural progenitors (38–40).

Compared to Sham mice, irradiated mice did not display any significant motor defects (**Figure 7A-C**) as previously reported (3) nor any difference in the time spent in the anxiogenic center part of the open field (**Figure 7D**). However, a major difference between Sham and irradiated mice was observed in their social behavior as evaluated via the three-chamber sociability test (26). Indeed, Sham mice exhibited a normal preference for social novelty, demonstrated by the fact that they spent significantly more time in the chamber with mouse #1 than with the Lego™ brick or later with the “new” mouse #2 than with mouse #1, with which they were already familiar (**Figure 7E**). In contrast, no such preferences were observed for irradiated mice, confirming the impairment of their social behavior (**Figure 7F**).

Table 1 summarizes changes in area and cellular density, for every brain structure delimited manually on the DAPI-stained brain slides of the Sham and IRR adult mice (**Figure 1**). Reduced areas were observed in IRR mice for 5 out of 8 brain structures, yet this decrease was only found to be significant in the cortex (Ctx) (the largest ROI) (-11%, $p = 0.02$). No significant cellular density variations were observed between Sham and IRR mice.

MRI analysis and quality check

Through our semiautomatic segmentation and ROI-based analysis pipeline, 14 volumes (one for each brain structure, as well as for the GM, WM, CSF and whole brain) were evaluated from our aMRI acquisitions. Likewise, diffusion parameter maps (**Figure 5**) were computed according to the DTI framework (sMD, sFA, sAD, and sRD), IVIM-Kurtosis model (ADCo, K) and S-Index approach (SI), and the averaged diffusion parameters were then calculated across the 10 aforementioned ROIs.

A quality check of the dMRI data was achieved by comparing the signal variation across the three repetitions, and the voxels displaying a signal variation above 12% between all repetitions were not considered further. This voxel exclusion step led to the removal of some animals from our group analysis, since some ROIs (such as the cerebellum) were not properly defined due to their particular sensitivity to breathing movements. Ultimately, 7/13 irradiated and 14/20 Sham mice were evaluated in our group analysis.

Volumetric and microstructural changes assessed using *in vivo* aMRI and dMRI

Table 2 summarizes the estimated volumes and the volume differences between Sham and IRR adult mice normalized to Sham mice (ΔV). As shown in **Figure 8**, *in utero* irradiation resulted in highly significant levels of atrophy in adult mice; the levels of atrophy were 14% volume reduction for the whole brain, 17% in GM and 7% in WM. The CSF volume variations were not significant. All the regions except the cerebellum exhibited significant volume reductions in IRR mice. These significant changes ranged from -3% for the MB to -21%, -22% and -27% for the Str, Ctx and cc, respectively. A 3D rendering of the long-term normalized volumetric changes due to 1 Gy *in utero* irradiation is shown in **Figure 9** (ΔV , left part). Notably,

no anatomical lesions, such as edema or necrosis, were observed on our T_{2w}^* images. In addition, no significant body weight differences were noted between Sham (24.7 ± 2.9 g) and IRR (22.4 ± 1.6 g) adult male mice.

Tables 3 and **4** summarize the estimated non-Gaussian and anisotropic diffusion parameters, respectively, together with their normalized differences between the Sham and IRR groups for the 10 brain structures studied. Compared to Sham mice, IRR mice exhibited significant decreases in the S-Index values in the Thal (-13.3%), Htl (-16.1%) and increases in the ADC_0 in the Hip (+1.7%), Thal (+2.5%) and Htl (+3.6%). No kurtosis variations were found to be significant. White matter alterations were also observed, as shown by the positive and significant increase in the sMD and sRD (1% and 8%, respectively) and by the significant decrease in the sFA and sAD (-11% and -5%, respectively) values of the cc. A 3D rendering of the long-term microstructural alterations, as reflected by S-Index variations, is shown in **Figure 9** (ΔSI , right part).

DISCUSSION

In this study, we managed to noninvasively characterize, at the whole-brain level and for ten cerebral structures of interest, the long-term effects of 1 Gy *in utero* irradiation in mice by combining *in vivo* anatomical and diffusion MRI and using a dedicated semiautomatic analysis pipeline. For the first time in a preclinical model of irradiation, 3D maps of the regional volume reductions and microstructural changes were computed (**Figure 9**) to illustrate the specific radiation sensitivities of different brain structures.

Anatomical MRI highlights long-term radiation-induced brain atrophies

We observed global brain atrophy following *in utero* 1 Gy irradiation (**Table 2**), which is consistent with previous structural preclinical MRI studies that reported whole-brain atrophy in irradiated rodents at different developmental stages, namely, at the prenatal stage (23,24) or the postnatal stage (18,19,41). In particular, similar atrophy levels were reported in the white matter, the hippocampus and the olfactory bulbs (19,41,42). Verreet et al. reported a 15-30% volume reduction for 19 labeled brain structures (23) that were segmented semiautomatically following a registration of a constructed mouse study template to the NUS template and atlas (43). Our aMRI-derived observations are confirmed (particularly for the cortex) by changes in the brain structure areas observed from our histological data (**Table 1**).

These atrophy levels observed in adult mice are likely the direct consequence of the apoptosis observed in the irradiated embryos a few hours after irradiation (**Figure 6B-C**), which is known to compromise the viability of neural progenitors (38–40) and their development into mature neurons.

Our ROI-based analysis revealed atrophy of almost all the brain structures as a long-term consequence of *in utero* irradiation. Interestingly, this decreased volume is more pronounced in the cortex and the *corpus callosum*. Based on the 2D observations, preclinical studies correlated the reduced cortical thickness with the absence of locomotor deficits (23,44), which we could reasonably generalize by a cortex volume reduction in 3D, as shown in our animal model. Indeed, other cerebral structures were also involved in locomotion, mainly the cerebellum (45), which seemed to be less sensitive to irradiation during brain development in our study because we observed no impact on the volume.

Notable deterioration in social behavior was observed in irradiated mice. This deficit might be related to the reduced volumes of the olfactory bulbs, hippocampus, hypothalamus (including

the amygdala) and cortex (including the anterior cingulate cortex), which are all known to have critical roles in social recognition (46–48).

Although we could not achieve quantitative correlations between the brain structure volumes and the behavioral parameters in our study, since these experiments were carried out on different animals, the volumetric observations are consistent with the observed deficit in social recognition and with the absence of locomotor effects in irradiated mice.

Diffusion MRI reveals long-term radiation-induced microstructural changes

To the best of our knowledge, in imaging studies conducted in animal models to date that focused on the long-term cerebral impacts of irradiation, embryonic irradiation has only been shown to lead to the changes in brain structure volume. However, a better understanding of the consequences of *in utero* irradiation on other aspects, such as brain structure, function or connectivity, remains essential, but a better understanding of these consequences requires implementing structural and functional imaging studies. Thus, diffusion MRI offers particularly interesting data that could clarify this radiobiology issue, as it allows us to examine cerebral microstructure modifications. Although several clinical and preclinical studies have demonstrated that diffusion MRI can be used as an imaging biomarker that is sensitive for detecting radiation-induced brain damage at the prenatal (3) or adult (22,49–51) stage, to date, no study has evaluated its relevance for detecting the neuropathological effects resulting from embryonic irradiation. Interestingly, our MRI results are particularly robust due to the data analysis, which was based on a dedicated automatic segmentation of several brain structures, which is different from the results of other preclinical studies using diffusion MRI. Owing to the present distortions visible on diffusion MRI images, it is challenging to segment them accurately. To limit the segmentation errors, we choose to alter the ROIs at the expense

of the voxel number included in an ROI. As we cannot change the orientation of the acquiring diffusion direction, the main point to consider for automatic segmentation is to register the atlas and ROIs to the dMRI. The opposite approach would surely lead to errors in the diffusion parameter estimations.

In the present study, radiation-induced changes in diffusion parameters in the adult brain after embryonic irradiation were highlighted. We observed sFA, sMD or sRD modifications in different brain structures that were consistent with the long-term reduction in FA values (3,20,21,50,52–54) and increased MD or RD values (20,50,53) reported in different irradiation protocols (dose and age at exposure); we also observed tissue alterations in the gray matter and integrity impairment in the white matter. A major result of our study is the demonstration that the S-Index, which characterizes both Gaussian and non-Gaussian diffusion processes in an efficient manner according to a range of supposed cellular densities in the brain parenchyma, is a sensitive biomarker for detecting the long-term microstructural alterations induced by *in utero* 1 Gy irradiation. In particular, decreased SI values, which were associated with an increase in ADC₀ values, were observed in the hypothalamus and thalamus. These observations (on SI and ADC₀ values) are comparable to those reported in our previous study of adult mice following 3x5 Gy irradiation (18). While the effects on the cerebellum were minimal and not significant regarding both volume loss and S-Index decreases, the brain structures for which a large volume loss was measured did not necessarily also present a larger S-Index decrease. Therefore, there was no obvious correlation between the volume and the microstructural radiation-induced alterations in all the brain structures studied. For example, a large decrease in the S-Index values did not necessarily lead to a high loss of volume (like that for the hypothalamus), and in contrast, a large volume reduction did not guarantee a high

S-Index variation (like that for the cortex). Unfortunately, we could not establish a link between the diffusion parameters and the behavioral data because our data for these two methodological approaches were collected with different animals. Despite this caveat, we could still qualitatively correlate the S-Index values and the irradiated mouse behavior. While social behavior deficits could be associated with a large S-Index decrease in the hypothalamus (amygdala included), the absence of locomotor deficits could be connected to an insufficient variation in the S-Index value in the cortical region. To test this hypothesis, resting-state functional MRI (55) could be conducted to better enhance the affected brain structures and connectivity that lead to a social deficit in our irradiated mouse model.

Even if the interpretation of S-Index changes is not straightforward, the correlation between the immunohistological and diffusion MRI results investigated in previous preclinical studies suggests two possible explanations: (i) demyelination in the white matter, especially in the *corpus callosum* (39,62), and (ii) a reduction in cell density, particularly in gray matter, such as that in the hypothalamus, thalamus and olfactory bulbs (53,56).

Advantages and Limitations

In vivo aMRI and dMRI studies constitute a promising approach to investigate radiation-induced brain alterations noninvasively. This study demonstrates that *in vivo* aMRI and dMRI preclinical datasets can be processed in an efficient and robust way using a semiautomatic ROI-based analysis pipeline to detect subtle morphological and microstructural changes. One of the main interests in MRI studies relies on three-dimensional whole-brain explorations that could not be easily achieved with immunohistological methods, especially since they are only

performed on a few *ex vivo* slides. Indeed, while our aMRI approach was able to highlight local brain atrophy levels following *in utero* 1 Gy exposure, our dMRI approach was able to examine tissue microstructure alterations, such as lower cellular density in gray matter or impaired white matter integrity.

Despite the originality of this study, it could be useful to further investigate the cellular correlates to our MRI observations in the future. Additionally, instead of an ROI-based MRI analysis, voxel-based analysis methods, such as (VBM: voxel-based morphometry) (19,57) and FA variations (TBSS: tract-based spatial statistics) could be explored to shed light on the local heterogeneities within each ROI (58,59).

Conclusions

In conclusion, this study characterized the long-term volumetric and microstructural alterations induced in adult mice following *in utero* 1 Gy irradiation. Through the combination of advanced diffusion metrics, such as the S-Index and a dedicated semiautomatic analysis pipeline, whole-brain volume and S-Index variation maps were established and illustrated the regional radiosensitivity of 10 key brain structures. The atrophy levels in irradiated mice were associated with variations in the S-Index, sFA and sMD values, suggesting demyelination in the *corpus callosum* and a loss of anisotropic neural cells in the gray matter. In the future, this approach should be useful for characterizing the deleterious effects of other irradiation models, notably at lower doses and/or at other developmental stages, as well as for studying other environmental stressors *in vivo*.

REFERENCES

1. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol*. 2002 Sep 1;64(3):259–73.
2. Dietrich J, Monje M, Wefel J, Meyers C. Clinical Patterns and Biological Correlates of Cognitive Dysfunction Associated with Cancer Therapy. *The Oncologist*. 2008 Dec 1;13(12):1285–95.
3. Verreet T, Quintens R, Van Dam D, Verslegers M, Tanori M, Casciati A, et al. A multidisciplinary approach unravels early and persistent effects of X-ray exposure at the onset of prenatal neurogenesis. *J Neurodev Disord* [Internet]. 2015;7(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4448911/>
4. Stewart A, Webb J, Giles D, Hewitt D. MALIGNANT DISEASE IN CHILDHOOD AND DIAGNOSTIC IRRADIATION IN UTERO. *The Lancet*. 1956 Sep 1;268(6940):447.
5. Hujoel PP. Antepartum Dental Radiography and Infant Low Birth Weight. *JAMA*. 2004 Apr 28;291(16):1987.
6. International Commission on Radiological Protection. Pregnancy and medical radiation. *Ann ICRP*. 2000;30(1):iii–viii, 1–43.
7. Blot WJ, Miller RW. Mental retardation following in utero exposure to the atomic bombs of Hiroshima and Nagasaki. *Radiology*. 1973;106(3):617–619.
8. Schull WJ, Otake M. Learning disabilities in individuals exposed prenatally to ionizing radiation: The Hiroshima and Nagasaki experiences. *Adv Space Res*. 1986 Jan 1;6(11):223–32.
9. Schull WJ, Otake M. Cognitive function and prenatal exposure to ionizing radiation. *Teratology*. 1999;59(4):222–226.
10. Neta G, Hatch M, Kitahara CM, Ostroumova E, Bolshova EV, Tereschenko VP, et al. In Utero Exposure to Iodine-131 from Chernobyl Fallout and Anthropometric Characteristics in Adolescence. *Radiat Res*. 2014 Mar;181(3):293–301.
11. Williams PM, COL L, FLETCHER S. Health effects of prenatal radiation exposure. *leukemia*. 2010;7(8):10–11.
12. Santis MD, Cesari E, Nobili E, Straface G, Cavaliere AF, Caruso A. Radiation effects on development. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev*. 2007;81(3):177–82.
13. Mizumatsu S, Monje ML, Morhardt DR, Rola R, Palmer TD, Fike JR. Extreme Sensitivity of Adult Neurogenesis to Low Doses of X-Irradiation. *Cancer Res*. 2003 Jul 15;63(14):4021–7.
14. Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, Palmer TD. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat Med*. 2002 Sep;8(9):955–62.
15. Tada E, Parent JM, Lowenstein DH, Fike JR. X-irradiation causes a prolonged reduction in cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats. *Neuroscience*. 2000 Jul 26;99(1):33–41.
16. Peißner W, Kocher M, Treuer H, Gillardon F. Ionizing radiation-induced apoptosis of proliferating stem cells in the dentate gyrus of the adult rat hippocampus. *Mol Brain Res*. 1999 Jul 23;71(1):61–8.

ANNEXE E. ARTICLE EN PRÉPARATION :
"NON-INVASIVE ASSESSMENT OF WHOLE BRAIN RADIOSENSITIVITY
FOLLOWING *IN UTERO* IRRADIATION IN MICE : AN ANATOMICAL AND
DIFFUSION MRI STUDY"

17. Iima M, Le Bihan D. Clinical Intravoxel Incoherent Motion and Diffusion MR Imaging: Past, Present, and Future. *Radiology*. 2015 Dec 21;278(1):13–32.
18. Pérès EA, Etienne O, Grigis A, Boumezbeur F, Boussin FD, Le Bihan D. Longitudinal Study of Irradiation-Induced Brain Microstructural Alterations With S-Index, a Diffusion MRI Biomarker, and MR Spectroscopy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2018 15;102(4):1244–54.
19. Gazdzinski LM, Cormier K, Lu FG, Lerch JP, Wong CS, Nieman BJ. Radiation-induced alterations in mouse brain development characterized by magnetic resonance imaging. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012 Dec 1;84(5):e631-638.
20. Watve A, Gupta M, Khushu S, Rana P. Longitudinal changes in gray matter regions after cranial radiation and comparative analysis with whole body radiation: a DTI study. *Int J Radiat Biol*. 2018;94(6):532–41.
21. Chan KC, Khong P-L, Cheung MM, Wang S, Cai K-X, Wu EX. MRI of late microstructural and metabolic alterations in radiation-induced brain injuries. *J Magn Reson Imaging JMRI*. 2009 May;29(5):1013–20.
22. Gupta M, Mishra SK, Kumar BSH, Khushu S, Rana P. Early detection of whole body radiation induced microstructural and neuroinflammatory changes in hippocampus: A diffusion tensor imaging and gene expression study. *J Neurosci Res*. 2017;95(4):1067–78.
23. Verreet T, Rangarajan JR, Quintens R, Verslegers M, Lo AC, Govaerts K, et al. Persistent Impact of In utero Irradiation on Mouse Brain Structure and Function Characterized by MR Imaging and Behavioral Analysis. *Front Behav Neurosci*. 2016;10:83.
24. Saito S, Sawada K, Mori Y, Yoshioka Y, Murase K. Brain and arterial abnormalities following prenatal X-ray irradiation in mice assessed by magnetic resonance imaging and angiography. *Congenit Anom*. 2015 May;55(2):103–6.
25. Holmes A, Wrenn CC, Harris AP, Thayer KE, Crawley JN. Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes Brain Behav*. 2002;1(1):55–69.
26. Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat Rev Neurosci*. 2010 Jul;11(7):490–502.
27. Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, et al. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*. 2007 Jan 11;445(7124):168–76.
28. Barrière DA, Magalhães R, Novais A, Marques P, Selingue E, Geffroy F. The SIGMA rat brain templates and atlases for multimodal MRI data analysis and visualization. *Nat Com (In press)*.
29. Tustison NJ, Avants BB, Cook PA, Yuanjie Zheng, Egan A, Yushkevich PA, et al. N4ITK: Improved N3 Bias Correction. *IEEE Trans Med Imaging*. 2010 Jun;29(6):1310–20.
30. Ashburner J, Friston KJ. Unified segmentation. *NeuroImage*. 2005 Jul;26(3):839–51.
31. Yushkevich PA, Piven J, Hazlett HC, Smith RG, Ho S, Gee JC, et al. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved efficiency and reliability. *NeuroImage*. 2006 Jul;31(3):1116–28.

-
32. Jenkinson M, Smith S. A global optimisation method for robust affine registration of brain images. *Med Image Anal.* 2001;5(2):143–156.
 33. Jenkinson M, Bannister P, Brady M, Smith S. Improved Optimization for the Robust and Accurate Linear Registration and Motion Correction of Brain Images. *NeuroImage.* 2002 Oct;17(2):825–41.
 34. Greve DN, Fischl B. Accurate and robust brain image alignment using boundary-based registration. *NeuroImage.* 2009 Oct;48(1):63–72.
 35. Le Bihan D, Mangin J-F, Poupon C, Clark CA, Pappata S, Molko N, et al. Diffusion tensor imaging: Concepts and applications. *J Magn Reson Imaging.* 2001;13(4):534–46.
 36. Jensen JH, Helpern JA. MRI Quantification of Non-Gaussian Water Diffusion by Kurtosis Analysis. *NMR Biomed.* 2010 Aug;23(7):698–710.
 37. Jansen JFA, Stambuk HE, Koutcher JA, Shukla-Dave A. Non-Gaussian Analysis of Diffusion-Weighted MR Imaging in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Feasibility Study. *Am J Neuroradiol.* 2010 Apr;31(4):741–8.
 38. Roque T, Haton C, Etienne O, Chicheportiche A, Rousseau L, Martin L, et al. Lack of a p21waf1/cip-Dependent G1/S Checkpoint in Neural Stem and Progenitor Cells After DNA Damage In Vivo. *STEM CELLS.* 2012 Mar 1;30(3):537–47.
 39. Rousseau L, Etienne O, Roque T, Desmaze C, Haton C, Mouthon M-A, et al. In vivo importance of homologous recombination DNA repair for mouse neural stem and progenitor cells. *PLoS One.* 2012;7(5):e37194.
 40. Etienne O, Roque T, Haton C, Boussin FD. Variation of radiation-sensitivity of neural stem and progenitor cell populations within the developing mouse brain. *Int J Radiat Biol.* 2012 Oct;88(10):694–702.
 41. Panagiotakos G, Alshamy G, Chan B, Abrams R, Greenberg E, Saxena A, et al. Long-term impact of radiation on the stem cell and oligodendrocyte precursors in the brain. *PLoS One.* 2007 Jul 11;2(7):e588.
 42. Nieman BJ, de Guzman AE, Gazdzinski LM, Lerch JP, Chakravarty MM, Pipitone J, et al. White and Gray Matter Abnormalities After Cranial Radiation in Children and Mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2015 Nov 15;93(4):882–91.
 43. Bai J, Trinh TLH, Chuang K-H, Qiu A. Atlas-based automatic mouse brain image segmentation revisited: model complexity vs. image registration. *Magn Reson Imaging.* 2012 Jul 1;30(6):789–98.
 44. Berger-Sweeney J. Behavioral consequences of abnormal cortical development: insights into developmental disabilities. *Behav Brain Res.* 1997 Jul;86(2):121–42.
 45. Sakayori N, Kato S, Sugawara M, Setogawa S, Fukushima H, Ishikawa R, et al. Motor skills mediated through cerebellothalamic tracts projecting to the central lateral nucleus. *Mol Brain.* 2019 Feb 8;12(1):13.
 46. Kogan JH, Frankland PW, Silva AJ. Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus.* 2000;10(1):47–56.

ANNEXE E. ARTICLE EN PRÉPARATION :
"NON-INVASIVE ASSESSMENT OF WHOLE BRAIN RADIOSENSITIVITY
FOLLOWING *IN UTERO* IRRADIATION IN MICE : AN ANATOMICAL AND
DIFFUSION MRI STUDY"

47. Hitti FL, Siegelbaum SA. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature*. 2014 Apr;508(7494):88–92.
48. Zinn CG, Clairis N, Cavalcante LES, Furini CRG, Myskiw J de C, Izquierdo I. Major neurotransmitter systems in dorsal hippocampus and basolateral amygdala control social recognition memory. *Proc Natl Acad Sci*. 2016 Aug 16;113(33):E4914–9.
49. Pérès EA, Etienne O, Grigis A, Boumezbeur F, Boussin FD, Bihan DL. Longitudinal Study of Irradiation-Induced Brain Microstructural Alterations With S-Index, a Diffusion MRI Biomarker, and MR Spectroscopy. *Int J Radiat Oncol • Biol • Phys*. 2018 Nov 15;102(4):1244–54.
50. Kumar M, Haridas S, Trivedi R, Khushu S, Manda K. Early cognitive changes due to whole body γ -irradiation: a behavioral and diffusion tensor imaging study in mice. *Exp Neurol*. 2013 Oct;248:360–8.
51. Trivedi R, Khan AR, Rana P, Haridas S, Hemanth Kumar BS, Manda K, et al. Radiation-induced early changes in the brain and behavior: serial diffusion tensor imaging and behavioral evaluation after graded doses of radiation. *J Neurosci Res*. 2012 Oct;90(10):2009–19.
52. Peiffer AM, Shi L, Olson J, Brunso-Bechtold JK. Differential effects of radiation and age on diffusion tensor imaging in rats. *Brain Res*. 2010 Sep;1351:23–31.
53. Constanzo J, Dumont M, Lebel R, Tremblay L, Whittingstall K, Masson-Côté L, et al. Diffusion MRI monitoring of specific structures in the irradiated rat brain. *Magn Reson Med*. 2018;80(4):1614–25.
54. Gupta M, Rana P, Trivedi R, Kumar BSH, Khan AR, Soni R, et al. Comparative evaluation of brain neurometabolites and DTI indices following whole body and cranial irradiation: a magnetic resonance imaging and spectroscopy study. *NMR Biomed*. 2013 Dec;26(12):1733–41.
55. Li Q, Li G, Wu D, Lu H, Hou Z, Ross CA, et al. Resting-state functional MRI reveals altered brain connectivity and its correlation with motor dysfunction in a mouse model of Huntington's disease. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1):1–9.
56. Xie M, Tobin JE, Budde MD, Chen C-I, Trinkaus K, Cross AH, et al. Rostro-Caudal Analysis of Corpus Callosum Demyelination and Axon Damage Across Disease Stages Refines Diffusion Tensor Imaging Correlations with Pathological Features. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010 Jul;69(7):704–16.
57. Ashburner J, Friston KJ. Voxel-Based Morphometry—The Methods. *NeuroImage*. 2000 Jun 1;11(6):805–21.
58. Smith SM, Jenkinson M, Johansen-Berg H, Rueckert D, Nichols TE, Mackay CE, et al. Tract-based spatial statistics: Voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *NeuroImage*. 2006 Jul 15;31(4):1487–505.
59. Mohammadi S, Keller SS, Glauche V, Kugel H, Jansen A, Hutton C, et al. The Influence of Spatial Registration on Detection of Cerebral Asymmetries Using Voxel-Based Statistics of Fractional Anisotropy Images and TBSS. *PLoS ONE* [Internet]. 2012 Jun 5;7(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3367973/>

FIGURES

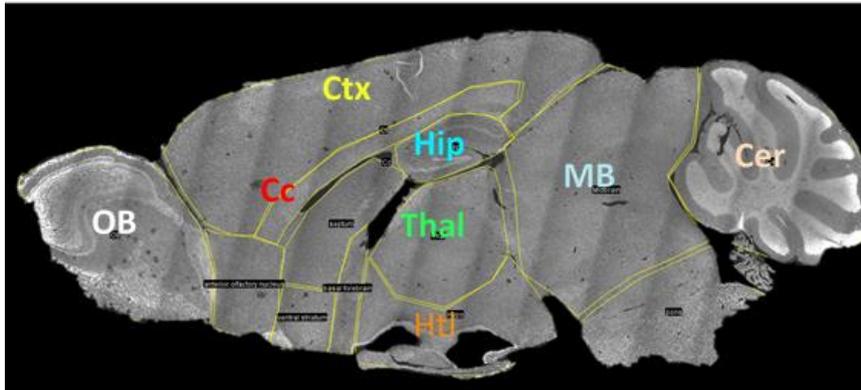


Figure 1: Manual delimitation of different brain structures on histological sagittal slices based on the Allen Brain Atlas. Using nuclear staining with DAPI, the following brain structures were investigated: Ctx = cortex; Cc = *corpus callosum*; OB = olfactory bulbs, Hip = hippocampus; Thal = thalamus; Htl = hypothalamus; MB = midbrain; Cer = cerebellum.

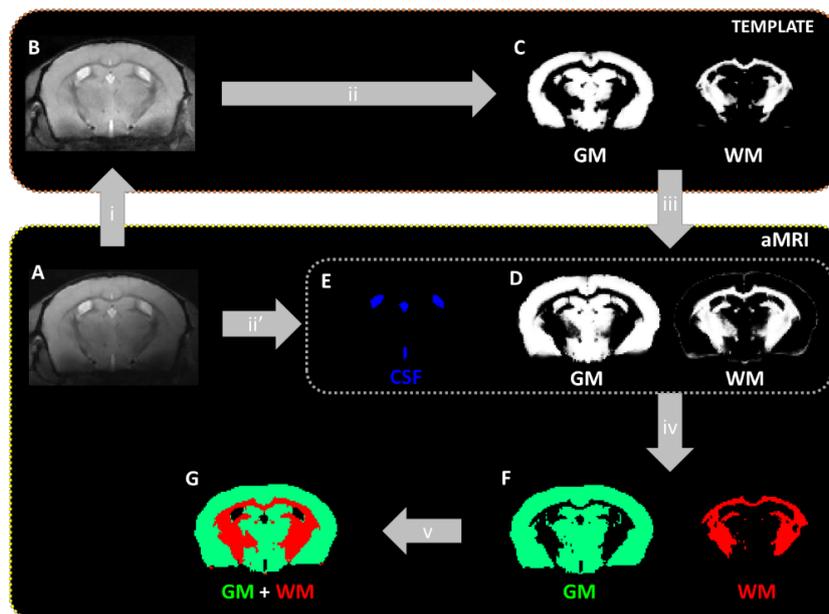


Figure 2: The T_{2w}^* SPM mouse segmentation pipeline. From a T_{2w}^* image (A), the bias-field correction (B) and the GM and WM probability maps (C) were computed in the template space (top). In the aMRI space (bottom), the GM and WM probability maps were computed (D), as well as the GM and WM (F), CSF (E) and whole-brain (G) masks.

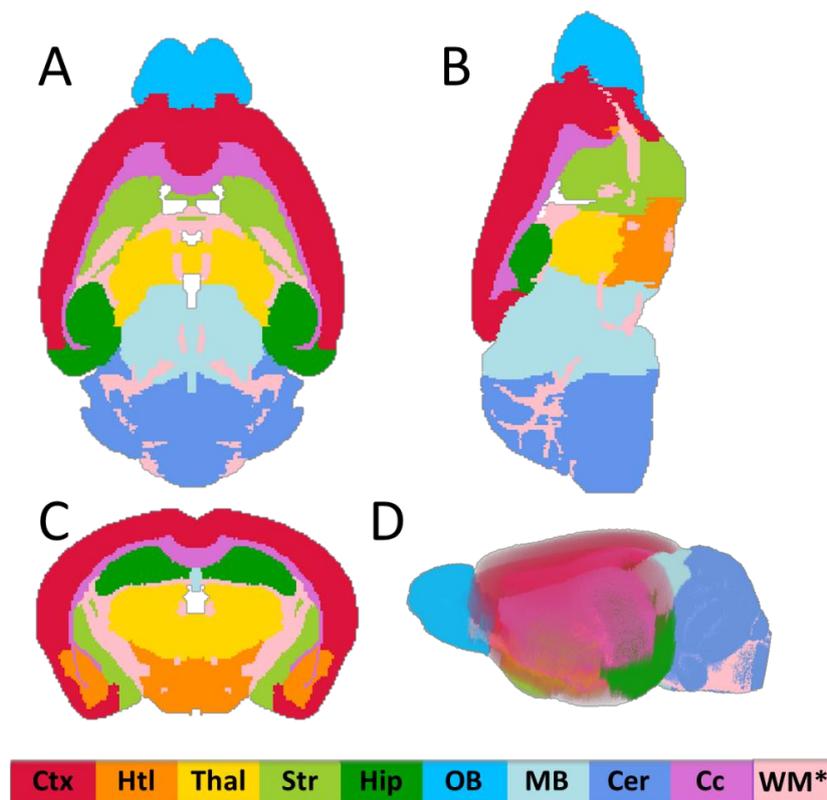


Figure 3: The mouse brain r-atlas and its 10 segmented regions of interest (ROIs). A, B and C are 2D views of the mouse brain r-atlas in the axial, sagittal and coronal orientations, respectively. The 3D rendering is illustrated in image D. In total, 10 ROIs were delineated and color-labeled: Ctx = cortex, Htl = hypothalamus, Thal = thalamus, Str = *striatum*, Hip = hippocampus, OB = olfactory bulbs, MB = midbrain, Cer = cerebellum, Cc = *corpus callosum* and WM* = the WM mask excluding cc. On the 2D views, regions in white correspond to the CSF.

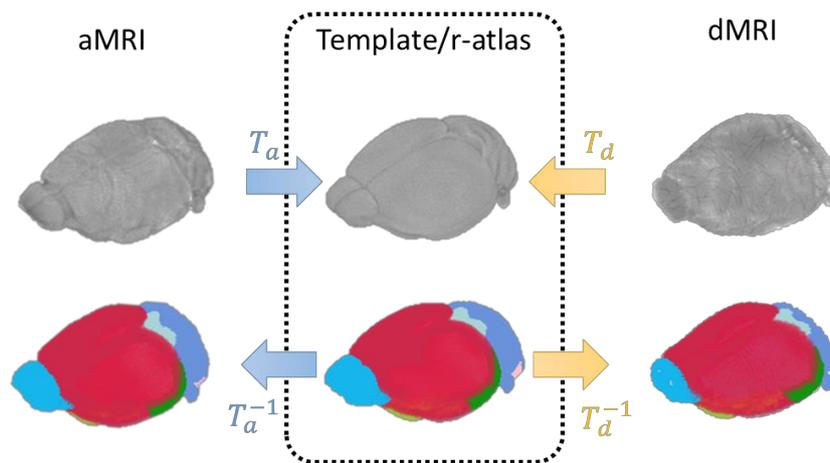


Figure 4: The ROI mask definition in the anatomical MRI (aMRI) and diffusion MRI (dMRI) spaces. The ROI masks were extracted from the r-atlas (bottom middle). T_a and T_d are the nonlinear transformations between the T_{2w}^* images (aMRI, top left) and the template (top middle) and between the A0 images (dMRI, top right) and the template (top middle), respectively. The invert transformations, T_a^{-1} and T_d^{-1} , were applied on the r-atlas to obtain the data in the aMRI (bottom left) and dMRI space (bottom right).

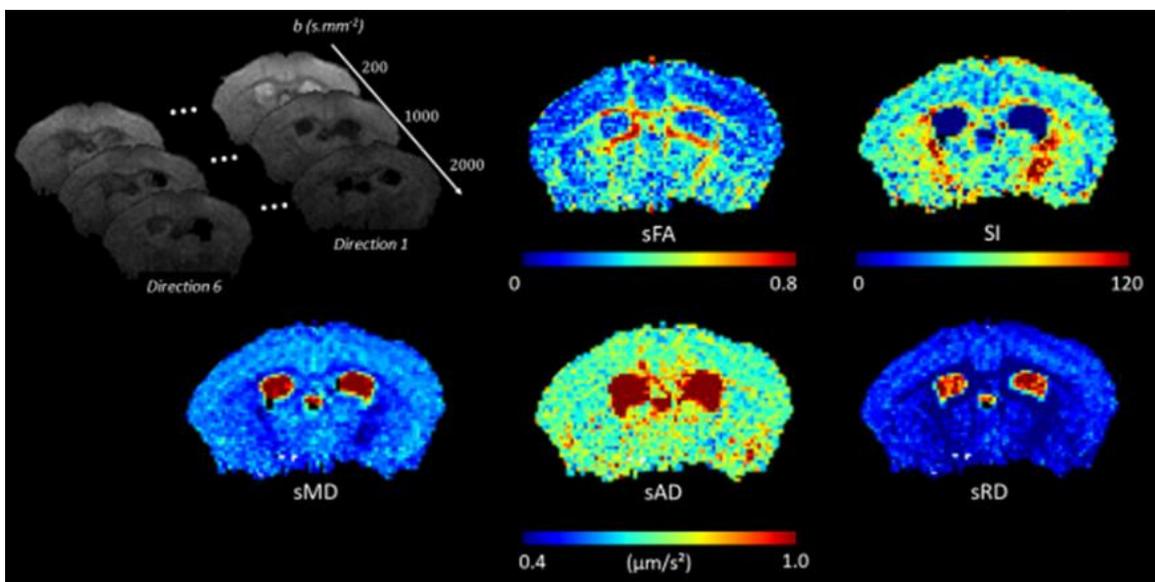


Figure 5: Examples of diffusion MRI images and parametric maps. Set of diffusion-weighted images (different b-values and diffusion encoding directions) and parametric maps for the

shifted fractional anisotropy (sFA), mean diffusivity (sMD), axial diffusivity (sAD), radial diffusivity (sRD) and the S-Index (SI).

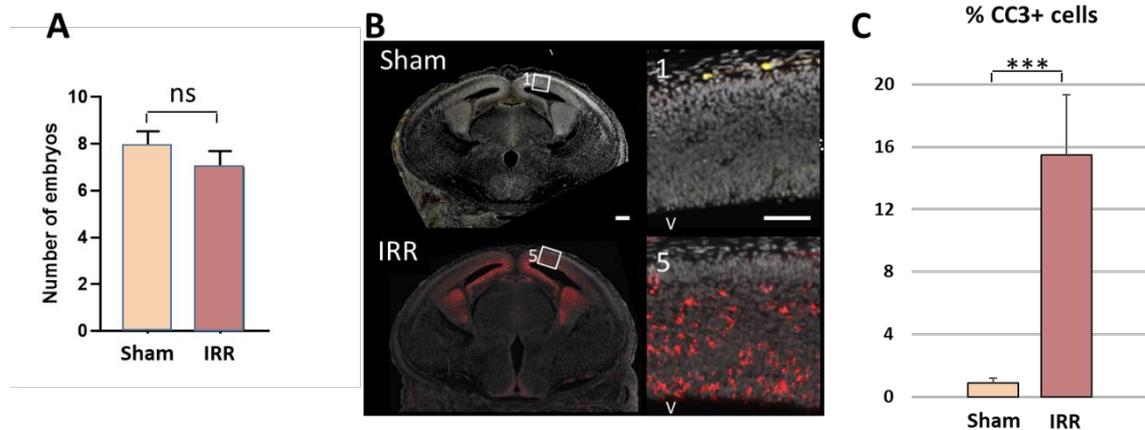


Figure 6: High level of brain cell apoptosis in mouse embryos (E14.5) 4 h postirradiation. (A)

Mean + standard deviation of the number of embryos per litter from Sham ($N_{\text{Sham}} = 11$) and IRR ($N_{\text{IRR}} = 7$) pregnant mice. (B) Double staining with DAPI (nuclear marker, gray) and cleaved caspase-3 (CC3: apoptosis marker, red) in Sham and irradiated embryos. Squares 1 and 5 correspond to the location of the zoom (x10) in the dorsal telencephalon for the Sham and IRR mice, respectively. Scale bar: 100 μm, V: ventricle. (C) Mean + standard deviation of the positive CC3 cell percentage in Sham ($N_{\text{Sham}} = 4$) and IRR ($N_{\text{IRR}} = 4$) mice observed on one slide section represented in the left part of panel B. Statistical significance was assessed via Mann-Whitney's test: *** $p < 0.001$, ns: not significant.

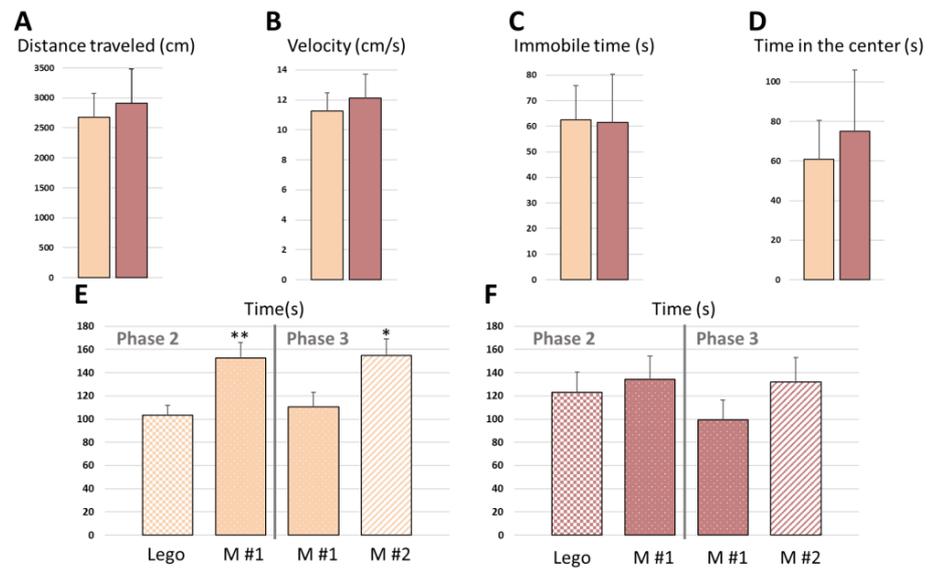


Figure 7: *In utero* irradiation alters social behavior in adult mice. Mean + standard deviation of the distance traveled in the open field test (A), the velocity (B), the immobile time (C) and the time spent in the center of the open field (D) for the Sham (beige, $N_{\text{Sham}} = 14$) and the IRR (brown, $N_{\text{IRR}} = 11$) mice. Mean + standard deviation of the time spent by the Sham (E, $N_{\text{Sham}} = 14$) and IRR mice (F, $N_{\text{IRR}} = 11$) exploring the Lego, mouse 1 (M#1) and 2 (M#2) during the second and third phases of the three-chamber sociability test. Statistical significance was assessed via Mann-Whitney's test: ** $p < 0.005$; * $p < 0.05$.

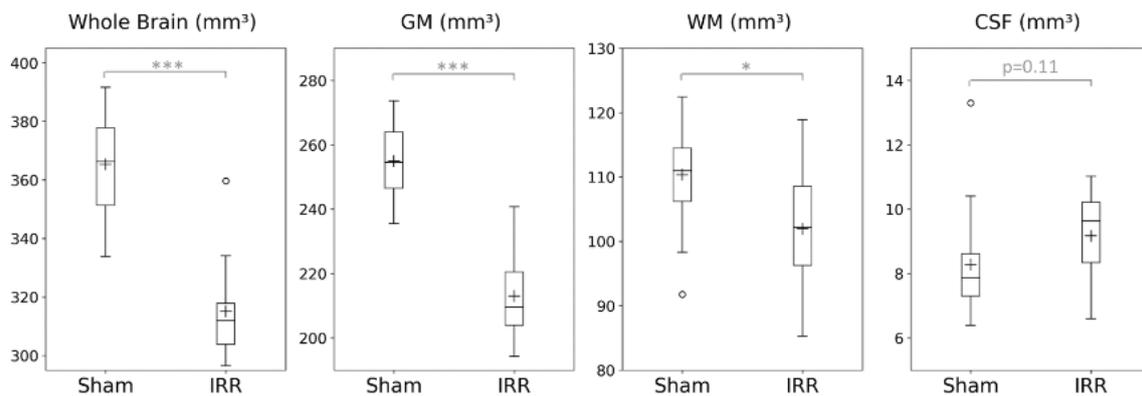


Figure 8: *In utero* irradiation results in global brain atrophy. The whole-brain, gray matter (GM), white matter (WM), and cerebrospinal fluid (CSF) volumes were estimated in irradiated (IRR, $N_{IRR} = 13$) and nonirradiated mice (Sham, $N_{Sham} = 20$) mice. The cross and the line represent the mean and the median, respectively. The box extends from the lower (Q1) to upper (Q3) quartile values. The whiskers extend from $Q1 - 1.5 \times (Q3 - Q1)$ to $Q3 + 1.5 \times (Q3 - Q1)$. Statistical significance was assessed with Student's t-test: *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$.

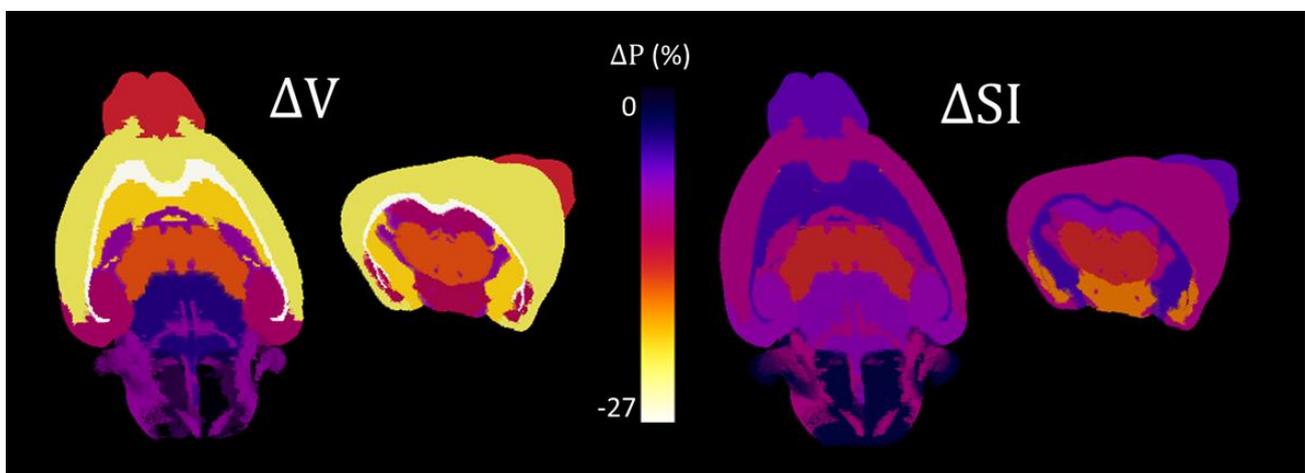


Figure 9: Brain structure radiosensitivity maps of *in utero*-irradiated mice. The 3D renderings of volume variation (ΔV) and S-Index variation (ΔSI) were projected on the r-atlas for the 10 ROIs with coronal and axial clipping plans. ΔV and ΔSI are calculated as $\Delta P = 100 \times (P_{IRR} - P_{Sham})$.

P_{Sham}/P_{Sham} with $P(\text{parameter}) = V$ or group-averaged SI. The color map shows the radiosensitivity level for each brain structure.

	Area				Cell density				
	Mean±SD (mm ²)		Δarea (%)	p	ROI (mm ²)	Mean±SD (number of nuclei/mm ²)		ΔCell density (%)	p
	Sham	IRR				Sham	IRR		
Cer	5.5±0.9	5.0±0.8	-10%	ns (p=0.2)	-	-	-	-	-
Ctx	6.9±0.7	6.2±0.5	-11%	1.9E-02	0.32	2262±255	2072±219	-8%	ns (p=0.2)
Hip	1.3±0.3	1.1±0.2	-19%	ns (p=0.1)	0.17	1157±253	1317±368	+14%	ns (p=0.3)
Htl	2.4±0.5	2.6±0.3	+11%	ns (p=0.7)	-	-	-	-	-
MB	5.7±0.6	5.8±0.8	+3%	ns (p=0.7)	-	-	-	-	-
Thal	2.6±0.5	2.7±0.4	+3%	ns (p=0.8)	0.2	2123±520	2145±183	+1%	ns (p=0.4)
OB	4.9±1.0	4.4±0.6	-11%	ns (p=0.2)	-	-	-	-	-
Cc	1.2±0.2	1.0±0.2	-17%	ns (p=0.1)	0.13	2249±279	2217±260	-1%	ns (p=0.8)

Table 1: *In utero* irradiation seems to reduce the area of brain structures in adult mice. Mean and standard deviation (SD) of the area for 8 brain ROIs and the cell density in 4 brain ROIs, manually delimited as presented in Figure 1. These measurements were estimated on 2 slides (one per hemisphere) in Sham ($N_{Sham} = 6$) and IRR ($N_{IRR} = 4$) mice. The normalized difference (Δ) of the area and the cell density between IRR and Sham mice was reported for different brain structures. Statistical significance (p-value) was determined by Mann-Whitney's test.

Table 2: Summary of the volume measurements for each brain structure and the statistical group comparison. The mean \pm standard deviation (SD), the normalized difference (ΔV) and the p-values (p) of the volume for the 10 ROIs studied, as well as for the whole-brain, gray matter (GM), white matter (WM) and cerebrospinal (CSF) in IRR ($N_{IRR} = 13$) and Sham ($N_{Sham} = 20$) mice.

ANNEXE E. ARTICLE EN PRÉPARATION :
 "NON-INVASIVE ASSESSMENT OF WHOLE BRAIN RADIOSENSITIVITY
 FOLLOWING *IN UTERO* IRRADIATION IN MICE : AN ANATOMICAL AND
 DIFFUSION MRI STUDY"

	Volumes			
	Mean ± SD		ΔV	p
	(mm³)			
<i>Sham</i>	<i>IRR</i>			
Brain	365±15	315±18	-13.7	1.9E-08
GM	255±11	213±13	-17.2	4.0E-09
WM	110±8	102±10	-7.3	1.6E-02
CSF	8±2	9±1	+12.5	n.s
Cer	78±3	78±2	0.8	n.s
Ctx	131±4	104±6	-21.8	1.7E-10
Hip	43±2	38±2	-18.4	3.2E-09
Htl	27±1	24±1	-7.8	1.2E-05
MB	52±2	50±1	-3.4	1.5E-02
Str	44±1	36±2	-21.4	2.7E-12
Thal	18±1	16±1	-16.0	7.9E-08
OB	23±1	20±1	-12.3	8.9E-10
Cc	26±1	20±1	-27.2	1.2E-15
WM*	45±1	41±1	-7.2	1.2E-06

	ADC₀				K				S-Index			
	Mean ± SD		ΔADC_0 (%)	<i>p</i>	Mean ± SD		ΔK (%)	<i>p</i>	Mean ± SD		ΔSI (%)	<i>p</i>
	($\times 10^{-4}$ mm ² /s)				($\times 10^{-1}$)							
<i>Sham</i>	<i>IRR</i>			<i>Sham</i>	<i>IRR</i>			<i>Sham</i>	<i>IRR</i>			
Cer	6.2±0.2	6.2±0.3	-0.4	n.s	7.7±0.3	7.4±0.7	-3.9	n.s	83±5	82±9	-1.8	n.s
Ctx	6.9±0.1	7.0±0.1	1.5	n.s	5.3±0.1	5.3±0.1	-1.3	n.s	36±4	32±4	-9.4	n.s
Hip	7.0±0.1	7.1±0.1	1.7	3.0E-02	5.8±0.3	5.9±0.3	2.4	n.s	38±3	35±6	-7.7	n.s
Htl	7.1±0.1	7.3±0.1	3.6	2.9E-03	6.8±0.3	6.8±0.4	-0.1	n.s	50±4	42±4	-16.1	5.7E-04
MB	7.2±0.1	7.4±0.3	2.6	n.s	7.1±0.2	7.2±0.3	1.1	n.s	46±4	42±4	-7.3	n.s
Str	6.8±0.1	6.8±0.1	0.9	n.s	6.1±0.2	5.9±0.2	-2.6	n.s	47±3	45±3	-5.0	n.s
Thal	7.1±0.1	7.3±0.1	2.5	5.2E-03	6.6±0.3	6.6±0.3	-0.2	n.s	42±4	37±3	-13.3	5.4E-03
OB	7.0±0.1	7.1±0.2	1.3	n.s	7.0±0.1	7.0±0.1	-0.4	n.s	53±4	49±5	-6.0	n.s
Cc	7.3±0.1	7.3±0.1	0.1	n.s	7.7±0.2	7.5±0.2	-2.1	n.s	54±3	51±3	-5.1	n.s
WM*	6.0±0.2	6.3±0.3	3.6	n.s	9.2±0.5	8.7±0.6	-4.9	n.s	101±5	91±7	-9.5	1.1E-02

Table 3: Summary of the ROI-based analyses and the statistical group comparison for diffusion parameters estimated with the IVIM-Kurtosis model and S-Index approach. The mean ± standard deviation (SD); the normalized difference (Δ); and the p-values (*p*) of the apparent diffusion coefficient (ADC₀), the kurtosis (K) and the S-Index (SI) for the 10 brain structures studied in IRR (N_{IRR} = 7) and Sham (N_{Sham} = 14) mice.

ANNEXE E. ARTICLE EN PRÉPARATION :
"NON-INVASIVE ASSESSMENT OF WHOLE BRAIN RADIOSENSITIVITY
FOLLOWING *IN UTERO* IRRADIATION IN MICE : AN ANATOMICAL AND
DIFFUSION MRI STUDY"

	sFA				sMD				sAD				sRD			
	Mean ± SD		ΔsFA	p	Mean ± SD		ΔsMD	p	Mean ± SD		ΔsAD	p	Mean ± SD		ΔsRD	p
	($\times 10^{-1}$)	(%)			($\times 10^{-4}$ mm ² /s)	(%)			($\times 10^{-4}$ mm ² /s)	(%)			($\times 10^{-4}$ mm ² /s)	(%)		
Sham	IRR	Sham	IRR	Sham	IRR	Sham	IRR	Sham	IRR	Sham	IRR	Sham	IRR			
Cer	3.1±0.1	3.1±0.2	-1.3	n.s	4.9±0.1	4.9±0.1	0.6	n.s	6.6±0.1	6.6±0.1	0.1	n.s	4.1±0.1	4.1±0.1	1.1	n.s
Ctx	2.4±0.1	2.4±0.2	-2.0	n.s	5.7±0.1	5.8±0.1	1.2	n.s	7.2±0.1	7.2±0.1	0.9	n.s	5.0±0.1	5.1±0.1	1.5	n.s
Hip	2.7±0.1	2.9±0.3	5.8	n.s	5.7±0.1	5.7±0.2	-0.1	n.s	7.3±0.1	7.4±0.1	1.5	n.s	4.9±0.1	4.8±0.2	-1.3	n.s
Htl	4.2±0.1	3.8±0.3	-9.6	2.0E-02	5.5±0.1	5.7±0.1	3.8	5.8E-04	8.0±0.1	8.0±0.2	0.4	n.s	4.2±0.1	4.5±0.2	7.1	4.5E-03
MB	3.2±0.1	3.2±0.3	1.6	n.s	5.5±0.1	5.6±0.1	1.3	n.s	7.4±0.1	7.5±0.3	1.7	n.s	4.6±0.1	4.7±0.1	1.0	n.s
Str	2.8±0.1	2.6±0.2	-5.4	n.s	5.5±0.1	5.6±0.1	1.3	n.s	7.1±0.1	7.1±0.1	0.0	n.s	4.7±0.1	4.8±0.1	2.3	n.s
Thal	3.3±0.1	3.2±0.1	-4.3	5.2E-03	5.6±0.1	5.7±0.1	1.8	2.3E-02	7.6±0.1	7.6±0.2	0.4	n.s	4.6±0.1	4.8±0.1	3.0	2.8E-04
OB	3.4±0.1	3.3±0.1	-1.9	n.s	4.4±0.1	4.5±0.1	2.1	3.3E-02	7.4±0.1	7.5±0.2	1.6	n.s	4.4±0.1	4.5±0.1	2.5	2.0E-02
Cc	5.0±0.2	4.4±0.6	-11.3	3.4E-02	3.7±0.1	4.0±0.3	1.3	4.0E-02	8.7±0.1	8.3±0.4	-4.6	3.5E-02	3.7±0.1	4.0±0.3	8.3	1.5E-02
WM*	3.9±0.2	3.9±0.2	0.0	n.s	3.5±0.1	4.9±0.1	2.8	2.4E-02	6.7±0.2	6.8±0.1	2.4	2.8E-02	3.5±0.1	3.6±0.1	3.2	n.s

Table 4: Summary of the ROI-based analyses and the statistical group comparison for diffusion tensor metrics. The mean ± standard deviation (SD); the normalized difference (Δ) and the p-values (p) of the fractional anisotropy (sFA); and the mean, axial and radial diffusivities (sMD, sAD, sRD) for the different brain structures in IRR ($N_{IRR} = 7$) and Sham ($N_{Sham} = 14$) mice.

Annexe F

Article en préparation :

" Impaired brain development and behavior of Xlf null mice linked to chromosome instability-induced premature neurogenesis"

Impaired brain development and behavior of *Xlf* null mice linked to chromosome instability-induced premature neurogenesis

Amandine Bery¹, Olivier Etienne¹, Laura Mouton^{1,2}, Elodie A. Pérès^{1,2}, Antony Laugeray³, Chantal Desmaze¹, Laurent R Gauthier¹, Marion Martin³, Fawzi Boumezbeur², Vincent Abramovski⁵, Stéphane Mortaud^{3,4}, Jean-Pierre de Villartay⁵, Denis Le Bihan², Arnaud Menuet^{3,4}, François D. Boussin¹

1 LRP, iRCM, UMR967, DRF, CEA, INSERM, Université Paris Diderot, Université Paris-Sud, Fontenay-aux-Roses, France

2 Neurospin, I2BM, DRF, CEA, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France

3 Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires – UMR7355 CNRS - 3b, Orléans, France

4 Université d'Orléans – France.

5 Genome Dynamics in the Immune System Laboratory, INSERM, UMR 1163, Institut Imagine, Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris-Cité, France

Correspondance to François Boussin, email: boussin@cea.fr; Tel: 33 1 46 54 97 91

Abstract

XRCC4-like factor (XLF also known as Cernunnos or NHEJ1) is a component of the ligation complex used in classical non-homologous end joining (NHEJ), a major DNA double strand break (DSB) repair pathway. *Xlf*^{-/-} mouse embryos exhibit a low deficiency in DNA repair capacity increasing chromosome instability in expanding neural progenitors at early brain developmental stage. Strikingly, chromosome instability does not cause a massive neuronal apoptosis, but induces a premature neurogenesis that decreases neural progenitor expansion and impairs brain development. Consistently, adult *Xlf*^{-/-} mice exhibit structural brain alterations and impaired social behaviors and exploratory activity. Thus, a low DNA repair deficiency inducing premature neurogenesis may be a major cause of neurobehavioral disorders such as autism spectrum disorders (ASD).

Introduction

Neural progenitor proliferation, migration and differentiation are strictly regulated spatially and temporally during brain development. During early corticogenesis, the apical progenitors, namely the radial glial cells (RGC), expand in the ventricular zone (VZ) by symmetric divisions¹⁻⁶. Then, they predominantly perform asymmetric neurogenic divisions: they generate a RGC to maintain the proliferative pool, and either a neuron or an intermediate progenitor cell (IPC). The IPC migrate to an overlying proliferating layer, the subventricular zone (SVZ), and ultimately generate a pair of neurons that migrate through the intermediate zone (IZ) to reach the cortical plate (CP)⁷.

Development and function of the nervous system depend on maintenance of genome stability. Numerous human neurologic disorders result from defective DNA damage signaling and repair⁸. Consistently, knockout mouse models have confirmed the importance of multiple DNA repair pathways for brain development.

Classical non-homologous end joining (cNHEJ) is a DNA double strand break (DSB) repair pathway performing the direct religation of broken DNA ends. DSBs may arise spontaneously in the brain from various endogenous sources, including replicative or oxidative stress, or associated with transcriptional activity⁹⁻¹¹. NHEJ involves the Ku70/80 heterodimer (Ku) that binds to DNA ends and recruits the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) generating the DNA-PK holoenzyme. DNA-PK promotes synapsis of DNA ends, enhances appropriate end processing through activation of the Artemis endo/exo-nuclease and recruits the ligation complex made of X-ray cross-complementing protein 4 (XRCC4), DNA ligase IV (LigIV) and XLF^{12, 13}. NHEJ is an integral part of the V(D)J recombination machinery, which generates a diverse antigenic repertoire during T and B cells development¹⁴. Human mutations in Artemis, DNA-PKcs, LIGIV, and XLF cause increased cellular radiosensitivity consistently with the DNA repair defect, various extents of severe combined immunodeficiency (SCID) due to defective V(D)J recombination, and microcephaly in the case of LigIV and XLF deficiencies. Generally, these patients do not have profound neurodevelopmental problems and the neurological disease is not progressive postnatally¹⁵. Patients with hypomorphic XRCC4 mutations do not harbor any immunological manifestations but are characterized by major developmental anomalies including the central nervous system leading to microcephalic primordial dwarfism (MPD) syndrome¹⁶. Confirming the importance of NHEJ for brain development, complete deficiency in LIGIV and XRCC4 is lethal *in utero* in mice because of an aberrant neuronal cell death^{12, 13, 17-20}.

Contrary to *Xrcc4*^{-/-} or *Lig4*^{-/-} mice, XLF knock-out (*Xlf*^{-/-}) mice are viable with a slightly affected immune system^{21, 22} and no obvious impairment of brain development has been reported to date^{21, 23}. As expected from an NHEJ defect, *Xlf*^{-/-} murine embryonic fibroblasts show spontaneous cytogenetic abnormalities, and are highly sensitive to ionizing radiation²¹ and to the radiomimetic drug phleomycin²². The mild phenotype of *Xlf*^{-/-} mice has been shown to rely on compensating pathways from the ATM-dependent DNA damage response²⁴⁻²⁷ and on overlapping functions between the V(D)J recombinase protein RAG2 and XLF in V(D)J recombination, lymphocyte development and the maintenance of genome stability²⁸. Furthermore, it has been recently revealed that XLF shares one or more redundant functions with PAXX, a recently identified NHEJ repair factor, as, unlike *Paxx*^{-/-} or *Xlf*^{-/-} single mutants, mice lacking both proteins died *in utero* with an extensive cell death in the central nervous system, similarly to *Xrcc4*^{-/-} or *Lig4*^{-/-} mice^{23, 29}.

Nevertheless, the consequences of XLF deficiency on mouse brain development have not been fully investigated. Here we show that the low deficit in NHEJ of *Xlf*^{-/-} mice impairs brain development and function by dysregulating the balance between expansion of neural progenitors and neurogenesis, highlighting thus the importance of NHEJ for neural progenitors at early developmental stages.

Results and Discussion

Low apoptosis and DNA repair deficiency of Xlf^{-/-} neural progenitors

We quantified spontaneous apoptosis in the developing brain of *Xlf*^{-/-} mice by immunostaining of cleaved-caspase 3³⁰ (CC3 positive cells). In accordance with previous reports^{21, 23}, we did not find a massive apoptosis at any developmental stages contrary to that described in LigIV or XRCC4 embryos^{17, 31, 32}. However, we observed a low but significant increase of apoptosis in different regions of the *Xlf*^{-/-} embryonic and post-natal brain (Fig. 1a,b and Supplementary Fig. 1a,b).

Spontaneous apoptosis peaked at E12.5 in the dorsal telencephalon of *Xlf*^{-/-} mice (Fig. 1a). Apoptotic cells were detected in the proliferative zones (VZ and SVZ) at early time points of corticogenesis (E11.5 and E12.5) and in the IZ and CP at later developmental stages (Fig. 1a), suggesting that apoptosis concerns cycling neural progenitors first, then a small fraction of postmitotic neurons. This strikingly differs from *Xrcc4*^{-/-} or *Lig4*^{-/-} embryos, as well as *Lig4Y288C* mouse carrying a homozygous, hypomorphic mutation (Y288C) in LIGIV, in which

most apoptosis occurs in post-mitotic neurons within the IZ and the CP at the peak of neurogenesis^{17,31-33}.

In order to more specifically detect the apoptotic cycling cells, pregnant mice at E11.5 were intraperitoneally injected with 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) and 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), respectively 2.5 h and 1 h before sacrifice as previously described^{34,35}. Co-staining of EdU and BrdU with cleaved-caspase 3 confirmed that more than 60 % of apoptotic cells were stained by EdU and/or BrdU and therefore correspond to neural progenitors that entered apoptosis during S/G2/M phases (Fig. 1c and Supplementary Fig. 1c), including 29 % cells in early S phase (EdU(-)BrdU(+) cells). Cycling neural progenitors are known to exploit homologous recombination (HR), the other main mechanism of DSB, as demonstrated by the massive apoptosis of neural progenitors at early developmental stages in various HR-deficient murine models³¹. Our data evidence that NHEJ is also required to prevent apoptosis of a subset of neural progenitors during early cortical development albeit in a much lesser extent.

We and others have shown that the embryonic mouse brain is highly radiation-sensitive^{30,34-38}. In order to assess the DNA repair activity of *Xlf*^{-/-} neural cells, we exposed mouse E14.5 embryos *in utero* to low doses of gamma radiation (10 mGy, 50 mGy or 100 mGy; Fig. 1d). We found a dose-dependent increase of apoptosis in the embryonic brains 4 hours after irradiation. As expected from their NHEJ defect, we found a higher number of apoptotic cells in the cortex of irradiated *Xlf*^{-/-} embryos when compared to irradiated *wt* controls at each dose tested (Fig. 1d). Interestingly, apoptosis was already increased in *Xlf*^{-/-} embryos even after exposure to the very low dose of 10 mGy (Fig. 1d) supposed to introduce 0.2 to 0.3 DSBs per cell according to the current estimation^{39,40}. These data suggest that *Xlf*^{-/-} neural cells i) are partially deficient for NHEJ, ii) that residual NHEJ allows *Xlf*^{-/-} neural cells to face most DSBs that occur spontaneously during brain development contrary to mice deficient for other core NHEJ factors, but, iii) that a low increase in the number of DSBs arising spontaneously or after irradiation is sufficient to reach the threshold of apoptosis induction in a dose-dependent number of *Xlf*^{-/-} neural cells.

Increased chromosome instability in *Xlf*^{-/-} neural progenitors during early developmental stages.

To evaluate the consequences of XLF deficiency on genome stability of neural progenitors, we performed Telo-FISH on metaphases collected without any culture step from the cortex of *Xlf*^{-/-} and *wt* embryos at different developmental stages (Fig. 1e). This method has

the advantage of directly reflecting the *in vivo* situation without introducing the bias of DNA damage induced during cell cycle progression *in vitro*.

Interestingly, we found an unexpected high level of chromosome aberrations in *wt* metaphases at early cortical development stages affecting approximately 15% of metaphases at E12.5 and E13.5, whereas it concerned only around 5 % of metaphases at E14.5 and E15.5. Chromosome instability was significantly increased in *Xlf*^{-/-} metaphases at E13.5 and E14.5 as compared to *wt* controls, reaching around 30 % of *Xlf*^{-/-} metaphases at E13.5. The chromosome aberrations found both in *wt* and *Xlf*^{-/-} metaphases were essentially chromatid-type aberrations (*ie.* chromatid breaks), which are the consequences of unrepaired DNA breaks occurring during or after replication in S or G2 phases. These data are consistent with a recent report by Wei and colleagues⁴¹ showing a high rate of recurrent DNA breaks within large and late replicating genes in neural stem and progenitor cells. Altogether these data suggest that a higher level of DNA damage occurs in late S phase of neural progenitors at early developmental stages and that NHEJ is required to repair a subset of these DNA breaks.

Premature neurogenesis in Xlf^{-/-} mice

Arai and colleagues⁴² have shown that expanding progenitors have a three-fold longer S phase compared to neural progenitors involved in neurogenic divisions. Having found that XLF deficiency increased chromosome aberrations generated in late S phase during early corticogenesis when RGC expand, we investigated next whether XLF deficiency affects RGC expansion. It has been previously reported that adult *Xlf*^{-/-} mice are smaller than *wt* controls²². Consistently, we found that the cortex thickness and the ventricular width of *Xlf*^{-/-} mice embryos remained smaller than that of *wt* embryos throughout fetal development (Supplementary Fig. 2a and b). In line with the reduced cortex size, we found a lower number of phospho-H3-positive apical mitotic figures in *Xlf*^{-/-} embryos from E12.5 to E14.5 in comparison to *wt* embryos (Figure 2a and Supplementary Fig. 2c), showing a reduced number of mitotic RGC.

Symmetrical versus asymmetrical division of neural progenitors not only specifies the fate of daughter cells but also controls progenitor expansion and differentiation and eventually cortical size⁴³. The orientation of the cleavage plane of mitotic RGC along the ventricular surface influences the degree of asymmetry in cell division: a vertical plane is associated with a symmetric division of RGC and a horizontal plane with an asymmetric neurogenic division^{44, 45}. Interestingly, we found that the angles formed by the segregation line of daughter chromosomes and the ventricular surface, which characterized the orientation of the mitotic

cleavage planes of RGC^{35, 46}, were significantly decreased in *Xlf*^{-/-} embryos as compared to *wt* embryos at E12.5 and E13.5 (Fig. 2b). Therefore, our data suggest an earlier switch of RGC from expansion toward neurogenic divisions in *Xlf*^{-/-} deficient embryos.

This was further sustained by immunostainings of Pax6, Tbr2 and Tbr1, that we performed on coronal slices of embryos at different developmental stages. These nuclear markers allow the identification of RGC (Pax6⁺/Tbr2⁻), newborn IPC (Pax6⁺/Tbr2⁺), mature IPC (Pax6⁻/Tbr2⁺) and newborn neurons (Tbr1⁺) in the dorsal telencephalon (Supplementary Fig. 2d, e)⁴⁷. As shown in Fig. 2c, we found a lower number of RGC at E13.5 and E14.5 in *Xlf*^{-/-} embryos as compared to *wt* embryos. Moreover, we also found lower numbers of newborn IPC and newborn neurons at E15.5 in *Xlf*^{-/-} embryos (Fig. 2c and Supplementary Fig. 2e). These results show that an early decrease in RGC expansion results in a decreased production of mature neurons at later developmental stages.

In order to further demonstrate the impact of *Xlf* deficiency on neurogenesis, we electroporated the GFP expression vector (pEBVCAGeGFP-Bsd) into neural progenitors present in the VZ-SVZ of E13.5 embryos to follow their fate in the developing brain⁴⁸. Twenty-four hours after *in utero* electroporation, the GFP⁺ cells migrated farther from the ventricle (Fig. 2d) and GFP intensity was higher in superficial layers (IZ, Supplementary Fig. 3) in *Xlf*^{-/-} embryos than in *wt* embryos, confirming an increased trend of *Xlf*^{-/-} neural progenitors for neurogenic division rather than proliferative maintenance. Interestingly, we showed that a 0.5 Gy *in utero* irradiation has similar effects on *wt* embryos (Fig. 2d), consistent with previous reports showing that ionizing radiation induces differentiation of neural stem cells⁴⁹. Altogether, these data indicate that the increase of chromosome instability in neural progenitors reduced the expansion of neural progenitors in *Xlf*^{-/-} mice in favor of premature neurogenesis.

Gogendeau and colleagues⁵⁰ have proposed that premature differentiation is an alternative response of *Drosophila* neural stem cells to prevent aneuploid cells from cycling. Premature differentiation of NSC has also been observed in a mouse model of centrosome amplification causing highly aneuploid cells when apoptosis was inhibited⁵¹. Here we show that premature differentiation is also the response to an increase in chromosome aberrations in mouse neural progenitors at early developmental stages.

***Xlf*^{-/-} mice exhibit structural brain alterations**

We have shown that premature neuronal differentiation in embryos decreased the expansion of *Xlf*^{-/-} RGC at early developmental stages and eventually reduced the amount of mature neurons produced and the cortex size. We therefore investigated the consequences of

premature neurogenesis for cortex topographic organization in the *Xlf*^{-/-} postnatal brain. Radial migration of projection neurons occurs in an age-dependent inside-out manner with early-born neurons occupying deeper layers, whereas late-born neurons migrate past early-born neurons to occupy superficial layers⁵²⁻⁵⁴. We found a significant decrease in the percentages of cells expressing *Tbr1* (Supplementary Fig. 4a) in the deeper cortical layer (Layer VI) and of cells expressing *Cux1* (Supplementary Fig. 4b), a marker of cortical layer II-IV, at post-natal day (PND) 0 in *Xlf*^{-/-} pups as compared to *wt* controls. However, the percentage of cells expressing *Tbr1* or *Cux1* was similar in the two genotypes at PND7, when cortex topographic organization is achieved. In contrast, we found a persistent decrease in the percentage of cells expressing *Satb2* (Special AT-rich sequence binding protein2), a marker of the upper layers in *Xlf*^{-/-} pups (Fig. 2e, f, g).

We next investigated the brains of *Xlf*^{-/-} and *wt* adult mice using anatomical T₂-weighted MRI, which confirmed that the brain volume of *Xlf*^{-/-} was decreased by 13% compared to *wt* animals ($p < 0.0001$) (Supplementary Fig. 5a). Interestingly, we found that *Xlf* deficiency affects the corpus callosum, as shown by the significant decrease of its volume related to the whole brain ($p < 0.01$) (Fig. 3a). Water diffusion MRI was then used to probe brain microstructure through changes in the Brownian motion of water in tissues⁵⁵. The signal attenuation, S/S_0 , was fitted using a kurtosis diffusion model to estimate the apparent diffusion coefficient - ADC_0 and the Kurtosis, the fourth moment of the water diffusion probability distribution function⁵⁶. ADC_0 is considered to reflect more diffusion in the extracellular space, which also reflects the amount of cell filling (shape and size) in tissues. The Kurtosis characterizes the degree of deviation of the signal behavior from free (Gaussian) diffusion ($K=0$ for free diffusion when the diffusion driven molecular displacements obey a Gaussian law), a marker of the heterogeneity of the diffusion environment. Results showed an increase of ADC_0 value (Fig. 3b) and a drop of Kurtosis value (Fig 3c) in the corpus callosum, and conversely a significant decrease in ADC_0 (Fig. 3b) associated with a reduction of Kurtosis value (Fig. 3c) in the cortex of *Xlf*^{-/-} mice. These modifications were further confirmed by the synthetic ADC (sADC), which provides an optimized balance of Gaussian and non-Gaussian diffusion, maximizing sensitivity to tissue microstructure (Supplementary Fig. 5b, c)⁵⁷.

Therefore, we conclude that *Xlf* null mice exhibit *i*) structural changes in the cortex probably reflecting a decrease in dendritic arborization of cortical neurons and *ii*) functional alterations of the corpus callosum, which are likely related to a reduction of fibers of white matter or to disruptions of fiber bundles. *Satb2* has been shown to be required for the specification of callosal projection neurons^{38, 58-60} and for the control of dendritic arborization

of cortical upper-layer neurons. We suggest that *Xlf*^{-/-} brain alterations originate from the decrease of *Satb2* expression we observed in the *Xlf*^{-/-} post-natal brains. Altogether, our study clearly shows that premature neurogenesis leads to significant brain alteration in *Xlf*^{-/-} mice, particularly consisting in a reduced size of the corpus callosum and structural changes in the cortex.

Behavioral impairment of Xlf^{-/-} mice

Neurodevelopmental disorders such as autism have been related to a reduced size of the corpus callosum^{61, 62}. Therefore, in order to assess the consequences of the functional brain alterations detected in *Xlf* null mice, we compared their behaviors to that of *wt* mice by confronting them to several tasks.

We first tested the novel environment exploration and general locomotor activity of our mice in the open-field exploration test⁶³⁻⁶⁵. *Xlf*^{-/-} mice did not display any difference in the time spent in the anxiogenic center part of the open-field compared to their *wt* counterparts ($p=0.35$; Supplementary Fig. 6a). However, *Xlf*^{-/-} mice showed a significant reduction of ambulatory exploration, as indicated by the decrease of total distance they travelled during the five-minutes trial as compared to *wt* mice ($p<0.001$, Fig. 4a), and a downward trend in time spent rearing ($p=0.06$; Supplementary Fig. 6b), another exploratory behavior. Importantly, *Xlf*^{-/-} and *wt* mice performed similarly in horizontal bars⁶⁶ and grip strength tests⁶⁷ showing that the decreased exploratory activity of *Xlf*^{-/-} mice was not due to altered motor skills (Supplementary Fig. 6c, d).

With the aim of investigating the social dimension of behavior of *Xlf*^{-/-} mice, we exposed them to an unknown peer and measured several behavioral endpoints indicative of social abilities⁶⁸. *Xlf*^{-/-} mice showed a significant decrease in time spent rearing (non-affiliative behavior) during this social interaction task ($p<0.01$; Fig. 4b). As compared with the time spent rearing in the open-field (Supplementary Fig. 6b), these data suggest that the presence of the stranger further reduced their exploratory activity. Moreover, we found that *Xlf*^{-/-} mice spent more time interacting with the stranger (affiliative behavior) in comparison to *wt* mice (Fig. 4b). This was related to an increase of the time spent sniffing body parts of the peer (Supplementary Fig. 6e), whereas the times spent in nose and anogenital sniffing remained similar to that of *wt* mice (Supplementary Fig. 6f, g)^{68, 69}. However, interestingly, minute-by-minute analysis revealed abnormal anogenital sniffing behavior during the ethologically relevant first minute of the test (Supplementary Fig. 6g). Altogether these data show that *Xlf*^{-/-}

mice behave inadequately in the context of social encounters showing social anxiety-related behaviors during social interaction⁷⁰.

To further document the impairment social skills associated with *Xlf* deficiency, we then investigated their voluntary initiation of social interaction and their ability to discriminate social novelty in the three chamber sociability test⁷¹. During the first 5 min trial of this test, mice were first free to explore the entire 3 chamber apparatus. As previously observed with the open field test, the *Xlf*^{-/-} mice travelled a shorter total distance than *wt* mice ($p < 0.001$; Fig. 4c), confirming their decreased exploratory activity. In the second trial, an unfamiliar mouse was put under a wire cup in one side chamber (mouse 1) and an object also put under an identical wire cup was placed in the other side chamber. Mice were left free to explore and initiate social contacts for 5 minutes. Both *Xlf*^{-/-} and *wt* mice spent more time in the chamber containing mouse 1 than in the chamber containing the object (Fig. 4d), showing their preference for social interactions. Then, in the last 5 min trial, we assessed the social novelty of our mice by introducing a novel mouse (mouse 2) in place of the object. *Wt* mice spent more time in the chamber with mouse 2 than in the chamber containing the known familiar mouse 1 ($p < 0.01$; Fig. 4c), indicating their preference for social novelty. By contrast, *Xlf*^{-/-} mice did not display any preference for the novel mouse (Fig. 4c), showing a clear deficiency for preference of social novelty.

We have thus shown here that *Xlf*^{-/-} mice, which are characterized by a low deficiency in NHEJ, exhibit significant alterations of exploratory activity and social interactions. These mice represent therefore a new model of neurobehavioral disorders related to DNA repair deficiency. The very low level of apoptosis observed during brain development in these mice could not account for the effects observed. Rather the key determinant is the induction of premature differentiation of neural progenitors, which is related to an increase of chromosome instability at the onset of brain development.

It is now accepted that there are large polymorphisms in DNA repair genes in humans that could influence individual DNA repair capacity and could be involved in cancer development. Furthermore, humans can be exposed to numerous DNA damaging agents (pollutants, ionizing radiation related to nuclear accidents, clinical diagnostic— CT-scan —, or treatments —radiotherapy—). Our study clearly identified premature differentiation as a major mechanism causing neurobehavioral disorders and suggests that a low DNA repair deficiency, as well as chronic exposure to agents inducing a low genotoxic stress during pregnancy, may

represent important risk factors for neurobehavioral disorders such as autism spectrum disorders (ASD).

Materiel and methods

Animal experiments

Xlf^{-/-} mice (Vera et al 2013) in a C57Bl/6 background and *wt* controls were used in this study. Animal experiments were carried out in strict accordance with the European Communities Council Directive (2010/63/EU). Protocols were approved by our institutional ethic committee in charge of animal experimentation (CETEA N°44) and were authorized by French Research Ministry.

Irradiation

In utero irradiation were realized either with a ¹³⁷Cs source (IBL 637, CIS BIO International) at 0.5Gy (dose rate: 0.8 Gy/min) or with a ⁶⁰Co source (Alcyon) for low doses (<0.5Gy, each dose has been delivered in 2 min).

Antibodies

Rabbit anti-Pax6 (Abcam, ab5790, 1:200), rabbit anti-Tbr2 (Millipore, AB23345, 1:300), rabbit anti-Tbr1 (Abcam, ab31940, 1:100), rabbit anti-cleaved-caspase 3 (Cell signaling, 9661, 1:200), rabbit anti-Satb2 (Abcam, ab34735, 1:1000), rabbit anti- Cux1 (Santa-Cruz, sc-13024, 1:200), mouse anti-phospho H3 (Cell Signalling, 9606S, 1:300), mouse anti-BrdU (GE Healthcare, RPN20AB, 1:300), goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 or 594 conjugated secondary antibody (ThermoFischer, 1:400) or goat anti-rat Alexa Fluor 594 conjugated secondary antibody (ThermoFischer; 1:400), and goat anti-mouse Alexa Fluor 594 (ThermoFischer, A11005, 1:400).

Immunofluorescent staining

Mice were sacrificed humanely. Embryonic heads were fixed overnight at 4°C by immersion in 4% paraformaldehyde (PFA) and embedded in paraffin with a Tissu-tek processor (VIP, Leica, Wetzlar, Germany). Five µm coronal sections were then obtained using a microtome (Leica RM2125RT) and mounted onto glass slides for histologic analyses. Pups' brains were extracted and processed similarly. After paraffin removal and citrate treatment, the brain sections were permeabilized with 0.5% TritonX-100 in phosphate buffer saline (PBS) for

ANNEXE F. ARTICLE EN PRÉPARATION :
" IMPAIRED BRAIN DEVELOPMENT AND BEHAVIOR OF XLF NULL MICE
LINKED TO CHROMOSOME INSTABILITY-INDUCED PREMATURE
NEUROGENESIS"

15 min and incubated for 2 h with 7.5% fetal bovine serum, 7.5% goat serum in PBS. The sections were incubated with primary antibodies overnight at 4°C. After washing, the sections were incubated with appropriate secondary antibodies for 1h. After washes, nuclear staining was achieved by incubation with 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) to quantify apoptosis by the detection of pyknotic nuclei³⁰. In. Slides were mounted under Fluoromount (Southern Biotechnologies associates, Birmingham, AL, USA).

Tissues were examined under a fluorescence microscope (Pathfinder, Nikon) with a 10X or 20X objective in three channels (appearing red, green and blue in all figures) as separate files. These images were then stacked with Photoshop software (Adobe, San Jose, CA, USA).

Embryonic brains were analyzed in a standard sector of 100 µm wide from the dorsomedial telencephalon wall, as previously described³⁴.

Pups brains were analyzed in regions of interest defined in the somatosensoriel (S) and medial (M) regions of the dorsal telencephalon. The percentages of nuclei (DAPI) stained with the antibodies directed against *Satb2*, *Cux1* and *Tbr1* were determined from using the open platform for scientific image analysis, ImageJ.

All statistical analyses were performed on Prism (GraphPad, La Jolla, CA, USA, Version 7.00).

EdU/ BrdU incorporation

Pregnant mice at E11.5 were intraperitoneally injected with 0.1 mg 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) (ThermoFisher, Waltham, MA USA) and, 1.5 h later, with 1 mg of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (Sigma, St. Louis, MO). Cortical slices were obtained as described above. EdU/BrdU detection was performed as previously described³⁴.

Determination of mitotic spindle orientation of RGC

The spindle orientation of mitotic RGC was defined as the angle formed by the virtual line passing through spindle poles and the ventricular edge using an especially developed macro as previously described^{72,73}.

In utero electroporation

In utero electroporation was performed as described by Shimogori and Ogawa⁴⁸ including few modifications. A time-pregnant mouse was anesthetized with isoflurane gas (Temsega). The uterine horns containing E13.5 embryos were exposed. One to 1.5 µl of GFP-expression vector pEBVCAGeGFP-Bsd kindly provided by Dr Denis Biard (CEA, iMETI,

SEPIA, 750 ng/ μ l) mixed with Fast green was manually microinjected through the uterine wall into the lateral ventricle, using a calibrated glass micropipette. The dorsal telencephalon was electroporated across the uterus using two 3 mm electrodes paddles positioned on either side of the head and controlled by an electroporator (NEPA21, Sonidel). The electroporator delivered 4 pulses of 50ms at 30mV with a 950ms interval. Throughout the surgical procedure, the uterus was bathed with phosphate buffer saline (PBS) (pH 7.4). After the procedure the uterus was placed back in the abdominal cavity and the wound was surgically sutured. Twenty-four hours after electroporation the embryonic brains were dissected and fixed for subsequent analyses. Brains were embedded in 2% agarose solution (made in H₂O) for sectioning using a vibratome (Leica VT 1200S) at a thickness of 70 μ m. GFP-positive sections were first selected under epifluorescent microscope, then stained with DAPI for nuclei labelling. Image stacks of GFP+ sections were then acquired with NIKON A1R confocal laser scanning microscope system attached to an invert ECLIPSE Ti microscope (Nikon Corp. Tokyo, Japan). The best focused plane for fluorescence is chosen automatically with NIS-Element software from image stacks. The mean distances between the edge of the ventricle and GFP-positive cell migration front were measured from 3 sites per cortical slices. Student's t test for independent samples was performed with StatView SE (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) to compare between both genotypes.

Chromosome instability

Pregnant mice were intraperitoneally injected with colchicine (0.6 mg/kg in PBS) and sacrificed 2 hours later. Embryonic cortices were mechanically dissociated. Cells were resuspended in a hypotonic solution (37.5 mM KCl, 8.33% fetal calf serum), then incubated for 15 min at 37°C and finally fixed by a mix of acetic acid/ethanol (1V/3V). Metaphases were spread on wet cold slides. In order to faithfully detect non repaired or non-fused extremities as well as chromosome and chromatid aberrations, telomeres were stained by Telo-FISH using a telomeric fluorescent PNA probe [Cy3-(CCCTAA)₃; Applied Biosystems] as previously described⁷⁴. Hybridized metaphases were then detected and captured under a Zeiss Axioplan2 microscope coupled with the metafer software (Metasystems). Images were exported and analyzed with Photoshop (Adobe).

Magnetic Resonance Imaging (MRI) acquisitions

Magnetic resonance imaging was performed on a 11.7 T MRI scanner equipped with a CryoProbe (Biospec, Bruker BioSpin, Germany). *Wt* and *Xlf*^{-/-} mice (5-months old male, n = 8

for each group) were anesthetized using isoflurane (1-2%). Body temperature was monitored and maintained at $37^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. The MRI protocol included an axial multi-slice Turbo spin-echo T_2 -weighted scan for whole-brain anatomic imaging (TE/TR=30/2500ms, rare factor=8, resolution=0.05x0.05 x0.45mm, matrix size=320x320 pixels, FOV=16x16mm, 16 non-contiguous slices, slice gap=0.15mm). Diffusion-weighted imaging (DWI) were acquired using a multi-slice and single-shot pulsed-gradient spin-echo EPI sequence (PGSE-EPI) with the following parameters: TE/TR=24/2500ms, resolution=0.125x0.125x0.45, matrix size=96x96 pixels, FOV=12x12mm, 16 non-contiguous slices, slice gap=0.15mm, $\delta/\Delta=4/11.5\text{ms}$, 34 b-values from 10 to 3500 s/mm^2 , 3 orthogonal directions).

Anatomical MRI images were used to compute the volume of the whole brain and of our regions-of-interest (cortex, hippocampus, corpus callosum and lateral ventricles) by manual segmentation. The DWI data were processed using a home-made software implemented with MATLAB (Mathworks, Naticks, MA). Gaussian and non-Gaussian diffusion parameters, ADC_0 (Apparent Diffusion Coefficient) and K (Kurtosis) were estimated in selected region-of-interest (ROI) by fitting the signal obtained at all b values according to the Kurtosis diffusion model⁵⁶. Exploiting the DWI datasets acquired along three orthogonal directions, a synthetic ADC (sADC), comparable to the pseudo-Trace of the diffusion tensor, was calculated from two key b values (eg. 200 and 1500 s/mm^2) as described previously⁵⁷, to optimize the balance between Gaussian and non-Gaussian diffusion effects and sensitivity to tissue microstructure. For the Kurtosis model and the sADC calculation data were averaged over the 3 acquired directions to increase signal noise ratio and remove residual differences in gradient hardware (diffusion anisotropy effects were ignored in the ROIs used for analysis at our spatial resolution).

Behavioral assays

Behavioral assays were performed in adult mice (at the age of 3 months) using the MIRcen facilities (CEA, Fontenay-aux-Roses) in the following order:

- *Horizontal bars*⁶⁶: The ability of mice to grip two round wooden bars (2 and 4 mm diameters respectively) was scored as followed: Falling between 1-5 sec = 1; Falling between 6-10 sec = 2; Falling between 11-20 sec = 3; Falling between 21-30 sec = 4; Falling after 30 sec = 5. Scores obtained at each bar were then summed to get a final score for each individual.
- *Grip strength*⁶⁷: The mouse is placed on a grid, which is then turned upside down. The time the mice remained attached to the grid before falling was then recorded.

*Open field*⁶⁴: The open field was a squared arena (50 x 50 x 40.5 cm) with grey plexiglas floor surrounded by grey plexiglas walls, illuminated by a direct overhead lighting (55 lux). The apparatus was set up under a digital camera, which was connected to a computer under the control of the EthoVision video-tracking system (Noldus). Mice were individually placed in a corner of the open field and left to freely explore the apparatus for 5 min. The total distance travelled in the arena was recorded as a measure of locomotor activity. Time spent in the central part (a square of 25.5cm side) of the open field was automatically recorded and used as a measure of anxiety. Time spent rearing, indicative of environment-based exploration, was also computed.

Social interaction: Social interaction was tested in a cage (33.2 x 15 x 13 cm) with clean sawdust, illuminated by a direct overhead lighting (10 lux). *wt* and *Xlf*^{-/-} mice were individually reared and left undisturbed for 30 min until the beginning of the test. During this habituation period, all the mice had *ad libitum* access to food and tap water. Each mouse was then paired with an unfamiliar age-matched NMRI female. Social interaction between the two was recorded using a digital camera (Ikegami with objective Computar 4.5-12.5mm) mounted above the cage at ceiling level. The videos were analyzed with the Observer XT software (version 10, Noldus Technology, The Netherlands) by an independent observer blind to the study protocol. Social investigation was scored as nose, body and anogenital sniffing time of the conspecific by the test mouse. The total time spent interacting was computed as the total time spent by the test mouse carrying out all sniffing behaviors. Time spent rearing was also computed as an index of nonsocial exploration. In addition, we performed a temporal analysis of social interactions by considering relevant behavioral parameters minute-by-minute. Two-way repeated measures ANOVA were used to determine whether any change in interaction time is the result of the interaction between the genotype and time min by min.

Three-chamber test for sociability and social recognition: Mice were run individually in a three-chambered arena made of clear polycarbonate, illuminated by a direct overhead lighting (10 lux). Retractable doorways built into the two dividing walls controlled access to the side chambers. Each of the two outside chambers had an inverted empty wire cup. The test consisted of three consecutive trials. In the first 5 min trial (habituation), the test mouse was placed in the center chamber, and was allowed to freely explore the entire apparatus, with the wire cups empty. In the next 5 min trial (sociability), an unknown male (C57BL/6), was placed in one of the two wire cups, while a Lego™ brick was introduced in the other wire cup. In the last 5 min trial (social recognition), a second unknown male (C57BL/6) was placed in the wire cup where the object previously was. The object/novel mouse sides were alternated left and right between

subjects. Automatic monitoring recorded and scored the time spent in contact with each wire cup (within a 3 cm radius proximal to each wire cage (using the EthoVision video-tracking system).

All data are presented as mean \pm SD. All statistical analyses were obtained using Student t-test with StatView SE (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

Acknowledgments

We are indebted to V. Neuville, V. Barroca, J. Tilliet and C. Joubert, for animal care. Christelle Martin from SEAT, Orléans, and Karine Cambon from MIRcen, CEA for her help with the neurobehavioral assays, Denis Biard for providing his pEBV-EGFP vector, T. Kortulewski for microscopy expertise and Carl Mann for valuable comments on the manuscript. This study was supported by grants of Electricité de France (EDF) and has received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 323267 (RISK-IR). This work was performed on a MRI platform of the "France Life Imaging" network partly funded by the grant "ANR-11-INBS-0006".

A.B. obtained the data of Fig. 2c, d, and 4, and Supplementary Fig. 1b, 2d,e, and 6 and participated to manuscript writing. O.E. obtained the data of Fig. 1a, b, c, d, and 2a, b, e, f, Supplementary Fig. 1, 2a,b,c,d, 3 and 4 and participated to manuscript writing. C.D. obtained the data of Figure 1e and participated to manuscript writing. L.R.G analyzed the data obtained in Fig. 2d and Supplementary Fig. 3). A.L., M.M. and A.M. analyzed the data of Fig 4 and participated to manuscript writing (Fig. 4, Supplementary Fig. 6), V.A. and J.P.V. have generated the *Xlf*^{-/-} mice and participated to manuscript writing. E.A.P., F.B. and D.L.B. performed and analyzed MRI experiments and participated to manuscript writing (Fig. 3; Supplementary Fig. 5), F.D.B. directed the study and wrote the manuscript.

References

1. Anthony, T.E., Klein, C., Fishell, G. & Heintz, N. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* **41**, 881-890 (2004).
2. Malatesta, P., Hartfuss, E. & Gotz, M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* **127**, 5253-5263 (2000).
3. Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H. & Ogawa, M. Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* **31**, 727-741 (2001).

-
4. Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L. & Kriegstein, A.R. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature neuroscience* **7**, 136-144 (2004).
 5. Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V. & Kriegstein, A.R. Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *The Journal of comparative neurology* **508**, 28-44 (2008).
 6. Taverna, E. & Huttner, W.B. Neural Progenitor Nuclei IN Motion. *Neuron* **67**, 906-914 (2010).
 7. Gotz, M. & Huttner, W.B. The cell biology of neurogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 777-788 (2005).
 8. McKinnon, P.J. Maintaining genome stability in the nervous system. *Nature neuroscience* **16**, 1523-1529 (2013).
 9. Aguilera, A. & Garcia-Muse, T. Causes of genome instability. *Annual review of genetics* **47**, 1-32 (2013).
 10. Erwin, J.A., Marchetto, M.C. & Gage, F.H. Mobile DNA elements in the generation of diversity and complexity in the brain. *Nature reviews. Neuroscience* **15**, 497-506 (2014).
 11. Madabhushi, R., *et al.* Activity-Induced DNA Breaks Govern the Expression of Neuronal Early-Response Genes. *Cell* **161**, 1592-1605 (2015).
 12. Ahnesorg, P., Smith, P. & Jackson, S.P. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* **124**, 301-313 (2006).
 13. Buck, D., *et al.* Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* **124**, 287-299 (2006).
 14. Malu, S., Malshetty, V., Francis, D. & Cortes, P. Role of non-homologous end joining in V(D)J recombination. *Immunol Res* **54**, 233-246 (2012).
 15. Woodbine, L., *et al.* PRKDC mutations in a SCID patient with profound neurological abnormalities. *Journal of Clinical Investigation* **123**, 2969-2980 (2013).
 16. de Villartay, J.P. When natural mutants do not fit our expectations: the intriguing case of patients with XRCC4 mutations revealed by whole-exome sequencing. *EMBO molecular medicine* **7**, 862-864 (2015).
 17. Gao, Y., *et al.* A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell* **95**, 891-902 (1998).
 18. Barnes, D.E., Stamp, G., Rosewell, I., Denzel, A. & Lindahl, T. Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice. *Current biology : CB* **8**, 1395-1398 (1998).
 19. Frank, K.M., *et al.* Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature* **396**, 173-177 (1998).
 20. Dai, Y., *et al.* Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 2462-2467 (2003).
 21. Li, G., *et al.* Lymphocyte-specific compensation for XLF/cernunnos end-joining functions in V(D)J recombination. *Molecular cell* **31**, 631-640 (2008).
 22. Vera, G., *et al.* Cernunnos deficiency reduces thymocyte life span and alters the T cell repertoire in mice and humans. *Molecular and cellular biology* **33**, 701-711 (2013).
 23. Balmus, G., *et al.* Synthetic lethality between PAXX and XLF in mammalian development. *Genes & development* **30**, 2152-2157 (2016).
 24. Zha, S., *et al.* ATM damage response and XLF repair factor are functionally redundant in joining DNA breaks. *Nature* **469**, 250-254 (2011).
 25. Liu, J.P., *et al.* Structural mechanism of the phosphorylation-dependent dimerization of the MDC1 forkhead-associated domain. *Nucleic acids research* **40**, 3898-3912 (2012).
 26. Oksenyshyn, V., *et al.* Functional redundancy between the XLF and DNA-PKcs DNA repair factors in V(D)J recombination and nonhomologous DNA end joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 2234-2239 (2013).
 27. Lescale, C., *et al.* Specific Roles of XRCC4 Paralogs PAXX and XLF during V(D)J Recombination. *Cell Rep* **16**, 2967-2979 (2016).

ANNEXE F. ARTICLE EN PRÉPARATION :
" IMPAIRED BRAIN DEVELOPMENT AND BEHAVIOR OF XLF NULL MICE
LINKED TO CHROMOSOME INSTABILITY-INDUCED PREMATURE
NEUROGENESIS"

28. Lescale, C., *et al.* RAG2 and XLF/Cernunnos interplay reveals a novel role for the RAG complex in DNA repair. *Nat Commun* **7** (2016).
29. Liu, X., Shao, Z., Jiang, W., Lee, B. & Zha, S. PAXX promotes KU accumulation at DNA breaks and is essential for end-joining in XLF-deficient mice. *Nat Commun* **8** (2017).
30. Nowak, E., *et al.* Radiation-induced H2AX phosphorylation and neural precursor apoptosis in the developing brain of mice. *Radiat Res* **165**, 155-164 (2006).
31. Orii, K.E., Lee, Y., Kondo, N. & McKinnon, P.J. Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 10017-10022 (2006).
32. Shull, E.R., *et al.* Differential DNA damage signaling accounts for distinct neural apoptotic responses in ATLD and NBS. *Genes & development* **23**, 171-180 (2009).
33. Gatz, S.A., *et al.* Requirement for DNA ligase IV during embryonic neuronal development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**, 10088-10100 (2011).
34. Roque, T., *et al.* Lack of a p21waf1/Cip-Dependent G1/S Checkpoint in Neural Stem and Progenitor Cells After DNA Damage In Vivo. *Stem cells* **30**, 537-547 (2012).
35. Etienne, O., Roque, T., Haton, C. & Boussin, F.D. Variation of radiation-sensitivity of neural stem and progenitor cell populations within the developing mouse brain. *Int J Radiat Biol* **88**, 694-702 (2012).
36. Hoshino, K. & Kameyama, Y. Developmental-stage-dependent radiosensitivity of neural cells in the ventricular zone of telencephalon in mouse and rat fetuses. *Teratology* **37**, 257-262 (1988).
37. Hoshino, K., Kameyama, Y. & Inouye, M. Split-dose effect of X-irradiation on the induction of cell death in the fetal mouse brain. *Journal of radiation research* **32**, 23-27 (1991).
38. Alcamo, E.A., *et al.* Satb2 regulates callosal projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Neuron* **57**, 364-377 (2008).
39. Rydberg, B. Radiation-induced heat-labile sites that convert into DNA double-strand breaks. *Radiat Res* **153**, 805-812 (2000).
40. Loblrich, M., *et al.* gamma H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair Strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* **9**, 662-669 (2010).
41. Wei, P.C., *et al.* Long Neural Genes Harbor Recurrent DNA Break Clusters in Neural Stem/Progenitor Cells. *Cell* **164**, 644-655 (2016).
42. Arai, Y., *et al.* Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat Commun* **2**, 154 (2011).
43. Sun, T. & Hevner, R.F. Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. *Nature reviews. Neuroscience* **15**, 217-232 (2014).
44. Gauthier-Fisher, A., *et al.* Lfc and Tctex-1 regulate the genesis of neurons from cortical precursor cells. *Nature neuroscience* **12**, 735-U734 (2009).
45. Marzesco, A.M., Mora-Bermudez, F. & Huttner, W.B. Neurogenesis in G minor. *Nature neuroscience* **12**, 669-671 (2009).
46. Konno, D., *et al.* Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat Cell Biol* **10**, 93-U78 (2008).
47. Englund, C., *et al.* Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *Journal of Neuroscience* **25**, 247-251 (2005).
48. Shimogori, T. & Ogawa, M. Gene application with in utero electroporation in mouse embryonic brain. *Dev Growth Differ* **50**, 499-506 (2008).
49. Hladik, D. & Tapio, S. Effects of ionizing radiation on the mammalian brain. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **770**, 219-230 (2016).
50. Gogendeau, D., *et al.* Aneuploidy causes premature differentiation of neural and intestinal stem cells. *Nat Commun* **6** (2015).
51. Marthiens, V., *et al.* Centrosome amplification causes microcephaly. *Nat Cell Biol* **15**, 731-+ (2013).

-
52. Angevine, J.B. & Sidman, R.L. Autoradiographic Study of Cell Migration during Histogenesis of Cerebral Cortex in Mouse. *Nature* **192**, 766-& (1961).
 53. Rakic, P. Neurons in Rhesus-Monkey Visual-Cortex - Systematic Relation between Time of Origin and Eventual Disposition. *Science* **183**, 425-427 (1974).
 54. Greig, L.C., Woodworth, M.B., Galazo, M.J., Padmanabhan, H. & Macklis, J.D. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nature reviews. Neuroscience* **14**, 755-769 (2013).
 55. Le Bihan, D. & Iima, M. Diffusion Magnetic Resonance Imaging: What Water Tells Us about Biological Tissues. *Plos Biol* **13** (2015).
 56. Iima, M., *et al.* Quantitative Non-Gaussian Diffusion and Intravoxel Incoherent Motion Magnetic Resonance Imaging Differentiation of Malignant and Benign Breast Lesions. *Invest Radiol* **50**, 205-211 (2015).
 57. Iima, M. & Le Bihan, D. Clinical Intravoxel Incoherent Motion and Diffusion MR Imaging: Past, Present, and Future. *Radiology* **278**, 13-32 (2016).
 58. Dobrova, I., Waeber, G., James, R.W. & Widmann, C. Interleukin-8 secretion by fibroblasts induced by low density lipoproteins is p38 MAPK-dependent and leads to cell spreading and wound closure. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 199-205 (2006).
 59. Britanova, O., *et al.* *Satb2* is a postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex. *Neuron* **57**, 378-392 (2008).
 60. Zhang, L., *et al.* *Satb2* Is Required for Dendritic Arborization and Soma Spacing in Mouse Cerebral Cortex. *Cerebral cortex* **22**, 1510-1519 (2012).
 61. Egaas, B., Courchesne, E. & Saitoh, O. Reduced size of corpus callosum in autism. *Archives of neurology* **52**, 794-801 (1995).
 62. Frazier, T.W. & Hardan, A.Y. A meta-analysis of the corpus callosum in autism. *Biological psychiatry* **66**, 935-941 (2009).
 63. Christmas, A.J. & Maxwell, D.R. A Comparison of Effects of Some Benzodiazepines and Other Drugs on Aggressive and Exploratory Behaviour in Mice and Rats. *Neuropharmacology* **9**, 17-+ (1970).
 64. Holmes, A. Targeted gene mutation approaches to the study of anxiety-like behavior in mice. *Neurosci Biobehav R* **25**, 261-273 (2001).
 65. Prut, L. & Belzung, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology* **463**, 3-33 (2003).
 66. Daecon, M. Measuring motor coordination in mice. *J Vis Exp* **e2609** (2013).
 67. Meyer, O., Hugh, A., Tislon, A., Weldon, C. & Riley, M. A Method for the Routine Assessment of Fore and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehavioral Toxicology* **1**, 233-236 (1979).
 68. Scattoni, M.L., Ricceri, L. & Crawley, J.N. Unusual repertoire of vocalizations in adult BTBR T+tf/J mice during three types of social encounters. *Genes Brain Behav* **10**, 44-56 (2011).
 69. Winslow, J.T. Mouse social recognition and preference. *Current protocols in neuroscience Chapter 8*, Unit 8 16 (2003).
 70. Mines, M.A., Yuskaitis, C.J., King, M.K., Beurel, E. & Jope, R.S. GSK3 influences social preference and anxiety-related behaviors during social interaction in a mouse model of fragile X syndrome and autism. *PloS one* **5**, e9706 (2010).
 71. Silverman, J.L., Yang, M., Lord, C. & Crawley, J.N. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nature Reviews Neuroscience* **11**, 490-502 (2010).
 72. Godin, J., *et al.* Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* **27**, 392-406 (2010).
 73. Rousseau, L., *et al.* In vivo importance of homologous recombination DNA repair for mouse neural stem and progenitor cells. *PloS one* **7**, e37194 (2012).
 74. Gauthier, L.R., *et al.* Rad51 and DNA-PKcs are involved in the generation of specific telomere aberrations induced by the quadruplex ligand 360A that impair mitotic cell progression and lead to cell death. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **69**, 629-640 (2012).

Legends to Figure

Figure 1: Apoptosis and chromosome instability in *Xlf*^{-/-} mouse brain.

a/ Spontaneous apoptosis in the embryonic dorsal telencephalon of *Xlf*^{-/-} mice

The bar graph shows the mean number of cleaved caspase 3-positive cells \pm s.e.m detected per cortical slice in the different layers of the dorsal telencephalon of *Xlf*^{-/-} and *wt* mouse embryos from E11.5 to E15.5 (See supplementary Fig1). VZ: ventricular zone (red); SVZ: subventricular zone (white), IZ: intermediate zone (blue); CP: cortical plate (grey); n: number of embryos that were obtained from at least two different litters. Stars inside the bars indicate the statistical significance between the mean number of apoptotic cells found in a *Xlf*^{-/-} cortical layer and in the *wt* control. Stars just above the bars indicate the statistical significance between the total number of apoptotic cells found in *Xlf*^{-/-} dorsal telencephalon and that found in the *wt* controls. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, Mann-Whitney Test.

b/ Spontaneous apoptosis in *Xlf*^{-/-} postnatal mouse brains

Scatter plots show the mean numbers per coronal slice of cleaved caspase 3-positive cells + s.e.m. found in different regions of the *wt* and *Xlf*^{-/-} brain at postnatal day 0. Subventricular zone (SVZ), corpus callosum (CC), cortex (C) and striatum (Str). n: number animals (left and right hemispheres analyzed separately except for CC). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, Mann-Whitney Test.

c/ Spontaneous apoptosis of proliferating cells in *Xlf*^{-/-} E11.5 brains

Up: Experimental scheme: pregnant mice (E11.5) were intraperitoneally injected with EdU and with BrdU 1.5 hour later. They were then sacrificed after one last hour. EdU and/or BrdU staining of apoptotic cells (cleaved caspase3-positive cells) was then analyzed in cortical slices as previously described^{34, 35} (see Supplementary figure 1). Down: The donut chart shows the percentages \pm s.d. of cleaved-caspase 3-positive cells with a EdU(-)BrdU(-) nucleus (cells in G1 or G0, in blue), with a EdU(-)BrdU(+) nucleus (cells in early S, in red), with a EdU(+)BrdU(+) nucleus (cells in late S, in orange) or with a EdU(+)BrdU(-) nucleus (cells in G2, in green) found in the dorsal telecephalon. Data were obtained from 4 embryos from 2 different litters.

d/ High radiosensitivity of neural cells in the dorsal telencephalon of *Xlf*^{-/-} embryos at E14.5

The mean number + s.e.m. of apoptotic cells (cleaved-caspase 3 staining) per coronal slice were quantified in the dorsal telencephalon *wt* and *Xlf*^{-/-} embryos 4 hours after *in utero* exposure to low dose of ionizing radiation (0Gy, 10mGy, 50mGy or 100mGy). n: number of embryos from at least two different litters. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Mann-Whitney Test.

e/ Chromosome instability in neural progenitors NSPC in the developing *wt* and *Xlf*^{-/-} embryonic brains

Pregnant mice were intraperitoneally injected with colchicine at different days of gestation. 2 hours later, metaphases spreads were then collected from the dorsal telencephalons of the embryos and analyzed for chromosome aberrations by Dapi and telomere staining by TeloFISH. Bar graph shows the number of chromatid-type (*ie.* Chromatid breaks) aberrations in grey and chromosome-type (*ie.* chromosome breaks,) aberrations in white per 100 metaphases from *wt* (left) and *Xlf*^{-/-} (right) embryonic brains. On the left, example of chromosome aberrations (Dapi in grey level and telomeres in red): a chromosome break (up, CSB: the centomeric (black arrow) and terminal parts are separated) and a chromatid break (down, CTB, red arrow). Ninety-seven to 379 metaphases from at least 6 embryos of two different litters were analyzed. **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001, Student t test.

Figure 2: Premature neurogenesis in the *Xlf*^{-/-} embryonic brain

a/ Reduced number of mitotic RGC in *Xlf*^{-/-} embryos

Up: Phospho-Histone H3 immunostaining of apical mitoses (RGC) at the ventricular surface of the dorsal telencephalon of *wt* and *Xlf*^{-/-} embryos at E13.5. Down: numbers of apical mitoses in the dorsal telencephalon of *wt* and *Xlf*^{-/-} embryos from E11.5 to E15.5. The number of embryos analyzed are given inside the bars. **p*<0.05, ***p*<0.01, Mann-Whitney Test.

b/ Decrease of spindle angles in *Xlf*^{-/-} RGC

On the left, method of measurement of spindle angles in RGC. Cleavage plane (white line) is deduced from the orientation of the sister chromatids (white lines) and the ventricle edge (dashed red line). The smallest angle between the cleavage plane and the ventricle edge is then calculated. Scale bar, 5µm. V: ventricle.

On the right, quantification of mitotic spindles angles in *wt* and *Xlf*^{-/-} RGC at different developmental stages. The number of mitoses analyzed (*n*) are indicated inside the bars. They were obtained from at least 3 to 5 embryos. **p*<0.05; ***p*<0.01, Mann-Whitney test.

c/ Early decrease in RGC expansion results in a decreased production of neurons.

Mean number ± s.e.m. of RGC (Pax6⁺/Tbr2⁻), newborn IPC (Pax6⁺/Tbr2⁺), mature IPC (Pax6⁻/Tbr2⁺) and newborn neurons (Tbr1⁺) in the dorsal telencephalon of *wt* and *Xlf*^{-/-} embryos per coronal slice at different developmental stages. The numbers of embryos analyzed (identical for Pax6 and Tbr2 co-immunostainings) are indicated in the figure **p*<0.05; ***p*<0.01, Mann-Whitney test.

d/ Electroporation of GFP vector in the dorsal telencephalon of *wt* and *Xlf*^{-/-} embryos

On the top left, experimental scheme showing the injection of early decrease in RGC expansion results in the end in a decreased production of neurons at later developmental stage. vector (green arrows and green needle) into the ventricle of embryonic mice at E13.5 and the orientation of the electrodes (-: anode; +: cathode) during electroporation.

On the bottom left, detection of GFP-expressing cells (green) in the dorsal telencephalon of *Xlf*^{-/-} and unirradiated or irradiated (WT-IR) *wt* embryos 24h after the electroporation. Scale bar, 100µm. V: ventricle. The dash line delineates the ventricular edge of the dorsal telencephalon.

On the right, the bar graph presents the mean maximum distance of migration from the ventricle edge (µm) of GFP+ cells in *wt* (white), *Xlf*^{-/-} (red) and *wt*-IR (blue) embryos. n=6 embryos/group. *p<0.05, ***p<0.001, Mann-Whitney test.

e/ Immunodetection of Satb2 (green) and CTIP2(red) in the dorsal telencephalon of *Xlf*^{-/-} and *wt* brain at PND 0.

Nuclei are labelled with DAPI (grey level). The figure shows the regions of interest in the somatosensoriel (S) and medial (M) regions.

f/ Decreased percentage of Satb2-expressing cells in the dorsal telencephalon of *Xlf*^{-/-} mice at PND 0.

Data have been obtained in the somatosensoriel (S) and medial (M) from 7 *wt* mice and 6 *Xlf*^{-/-} mice. *p<0.05, Mann-Whitney test.

g/ Decreased percentage of Satb2-expressing cells in the dorsal telencephalon of *Xlf*^{-/-} mice at PND 7.

Data have been obtained in the somatosensoriel (S) and medial (M) from 6 mice per group. *p<0.05, Mann-Whitney test.

Figure 3: Structural alterations of the *Xlf*^{-/-} adult brain revealed by MRI (5 months old)

a/ Reduction of the size corpus callosum in *Xlf*^{-/-} adult mice

On the left, different regions of interest defined on anatomical T₂-weighted MRI: cortex (1), the corpus callosum (2) and the lateral ventricles (3). On the right, the volume of the cortex, the lateral ventricle and the corpus callosum are expressed as a percentage of the volume of the whole brain. n = 8 mice/group. Mean ± s.d. **p<0.01, Student t test.

b/ Alteration of the ADC₀ in the cortex and the corpus callosum in *Xlf*^{-/-} adult mice

On the left, representative anatomical MRI based of T₂-weighted imaging and color-coded ADC₀ maps obtained from diffusion-weighted MRI analyses in *wt* and *Xlf*^{-/-} mice.

On the right, the quantification of non-diffusion gaussian parameter ADC_0 in several brain structures of *wt* and *Xlf*^{-/-} mice. n=8 mice/group. Mean \pm s.d, * p <0.05, *** p <0.001, Student t test.

c/ Alteration of the ADC_0 in the cortex and the corpus callosum in *Xlf*^{-/-} adult mice

On the left, representative anatomical MRI based to T2-weighted imaging and color-coded Kurtosis maps obtained from diffusion-weighted MRI (DWI) analyses in *wt* and *Xlf*^{-/-} mice.

On the right, the quantification of non-diffusion gaussian parameter Kurtosis in the different regions of interest. n=8 mice/group. Mean \pm s.d, * p <0.05; ** p <0.01, Student t test.

Figure 4: Behavioral impairment of *Xlf*^{-/-} mice

a/ Exploration abnormalities of *Xlf*^{-/-} mice in the Open-field (4 months old)

Mean distance travelled \pm s.d. (on the left) and velocity \pm s.d.(on the right) by *Xlf*^{-/-} mice and *wt* controls during the five-minute trial in the open-field were used as an index of ambulatory exploration. See Results and MM. n=29 mice/group. *** p <0.001, Student t test.

b/ *Xlf*^{-/-} mice behave inadequately in the context of social encounters

Mean time \pm s.d. spent by *Xlf*^{-/-} mice and *wt* controls in affiliative and non-affiliative interactions were measured in the social interaction test. Affiliative explorations were defined as sniffing the stimulus mice (nose + body + anogenital) of the non-affiliative explorations corresponded to rearing. n=29 mice/group. * p <0.05, ** p <0.01, Student t test.

c/ The preference for social novelty is altered in *Xlf*^{-/-} mice

Exploration activity, sociability and preference for social novelty of *wt* and *Xlf*^{-/-} mice were challenged in the three chamber sociability test (see text and MM). The bar graph on the left shows the distance travelled \pm s.d. during the habituation phase. The bar graph in the middle shows the times \pm s.d. the mice spent in contact with the wire cup containing the mouse1 (grey) or the one containing the object (white) during the sociability phase. Both *wt* and *Xlf*^{-/-} mice showed a preference for mouse 1. The bar graph on the right shows the times \pm s.d. the mice spent with the wire cup containing the mouse 1 (grey) or the one containing mouse 2 (green) during the social novelty phase. Contrary to *wt* mice, *Xlf*^{-/-} mice show no preference for social novelty. n=29 mice/group. *** p <0.001, ** p <0.01, Student t test.

Supplementary Figure 1:

a/ Spontaneous apoptosis in the developing brain of *Xlf*^{-/-} mice.

Up: Coronal sections of cerebral hemisphere of E14.5 *wt* and *Xlf*^{-/-} embryos stained with DAPI (gray) and cleaved-caspase-3 (red). Dash lines delineate the different cortical zones. VZ/SVZ: ventricular zone / subventricular zone; IZ: intermediate zone; CP: cortical plate. white arrows: cleaved-caspase 3-positive cells. Bottom: Enlargements of the white box areas. V, ventricle. Blood vessels are colored in orange.

b/ Increased apoptosis in the SVZ of *Xlf*^{-/-} mice at post-natal day 0

White arrows indicate cleaved-caspase-3-positive cells (red) in coronal slices from *wt* and *Xlf*^{-/-} mice. V, ventricle. Blood vessels are colored in orange.

c/ Spontaneous apoptosis of proliferating cells.

See text and Figure 1c. up: Coronal section of the cerebral hemisphere of an E11.5 *Xlf*^{-/-} embryo stained with DAPI (gray), cleaved-caspase-3 (red), EdU (purple) and BrdU (green). Bottom: examples of the different types of co-stainings of apoptotic cells. V, ventricle.

Supplementary Fig. 2: The cortex thickness and the ventricular width of *Xlf*^{-/-} mice embryos remained smaller than that of *wt* embryos throughout the fetal development

a/ Mean thickness of the dorsal telencephalon \pm s.e.m. of developing *wt* (white) and *Xlf*^{-/-} (red) embryos at different developmental stages

Cortex thickness \pm s.e.m. has been measured in the medial parts of the dorsal telencephalons. 3 slices have been analyzed per embryos. The number of embryos analyzed are indicated under the histogram. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, Mann-Whitney test.

b/ Mean ventricular width \pm s.e.m of *wt* (white) and *Xlf*^{-/-} (red) embryos at different developmental stages

On the top left, the schema shows the ventricular width that has been measured (green). Measures have been performed on 2 different coronal slices per embryos. The number of embryos analyzed are indicated under the histogram. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

c/ Phospho-Histone H3 immunostaining (red) of mitotic RGC at the ventricular surface (white dot-line) in coronal slices of *wt* and *Xlf*^{-/-} embryos at E12.5. V, ventricle.

d/ Co-immunostaining of Pax6/Tbr2 in the dorsal telencephalon of *wt* and *Xlf*^{-/-} mice at E13.5

e/ Immunostaining of Tbr1 in the dorsal telencephalon of *wt* and *Xlf*^{-/-} mice at E15.5.

White stars: blood vessels.

Supplementary Fig. 3: Electroporation of GFP vector in the dorsal telencephalon of *wt* and *Xlf*^{-/-} embryos

The GFP-expression vector pEBVCAGeGFP-Bsd has been electroporated into the ventricles of *wt* and *Xlf*^{-/-} embryos at E14.5. Twelve hours after electroporation, *wt* embryos have been irradiated *in utero* (0.5 Gy, 0.8 Gy/min; *wt-IR*). The animals were sacrificed at 24 hours after electroporation. On the left, detection of GFP-positive cells in coronal slices of the dorsal telencephalon of *wt* and *Xlf*^{-/-} embryos and *wt-IR* embryos.

Fluorescence intensity of GFP⁺ cells (green) was measured in two regions of interest with a width of 186 μm that were defined in coronal slices of the dorsal telencephalon: ROI-1 containing the VZ and SVZ (white boxes: areas within 100 μm from the ventricles with a width of 186 μm) and ROI-2 (yellow boxes: 100 μm from the ventricles edge to 300 μm) containing the IZ and CP. Scale bar: 100 μm .

The histogram shows the mean ratio \pm s.e.m. of the GFP intensity measured in the SVZ-IZ versus that measured in the VZ and SVZ. Data have been obtained from 6 embryos from different litters per group. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Mann-Whitney test.

Supplementary Fig. 4

a/ Decreased percentage of cells expressing Tbr1 in the deeper cortical layer (Layer VI) at PND 0 but not at PND7 in *Xlf*^{-/-} mice

Left: Immunostaining of Tbr1 (red) in *wt* and *Xlf*^{-/-} mice at PND0. Nuclei are labelled with DAPI (white). S and M indicates the somatosensoriel (S) and medial (M) region of the dorsal telencephalon in which Tbr1⁺ cells were quantified.

Right, Scatter plots showing the mean percentages of Tbr1-positive/DAPI nuclei \pm Ss.d. at PND0 and PND7 in *wt* and *Xlf*^{-/-} mice. Numbers of embryos analyzed are indicated. * $p < 0.05$, Mann-Whitney test.

b/ Decreased percentage of cells expressing Cux1 at PND 0, but not at PND7 in *Xlf*^{-/-} mice

Left: Immunostaining of Cux1 (red) in *wt* and *Xlf*^{-/-} mice at PND0. Nuclei are labelled with DAPI (white). S and M indicates the somatosensoriel (S) and medial (M) region of the dorsal telencephalon in which Tbr1⁺ cells were quantified.

Right, scatter plots showing the mean percentages of Cux1-positive DAPI nuclei \pm s.d. at PND0 and PND7 in *wt* and *Xlf*^{-/-} mice. Numbers of embryos analyzed are indicated. * $p < 0.05$, Mann-Whitney test.

Supplementary Fig. 5: *Xlf* deficiency induces a microcephaly in adult mice (5 months old)

a/ Reduction of the whole brain volume in *Xlf*^{-/-} adult mice.

Quantitative analysis of whole brain volume from manual segmentation in *wt* and *Xlf*^{-/-} mice by anatomical MRI based on T2-weighted imaging. n=8 mice/group. Mean ± s.d., ***p<0.001, Student t test

b/ Representative anatomical MRI based to T2-weighted imaging (left) and color-coded sADC maps (right) obtained from diffusion-weighted MRI (DWI) analyses in *wt* and *Xlf*^{-/-} mice.

c/ Alteration of sADC in the cortex and the corpus callosum in *Xlf*^{-/-} adult mice

Measurement of sADC in the cortex and the corpus callosum of *wt* and *Xlf*^{-/-} mice (8 per group). Mean ± s.d., *p<0.05; ***p<0.001, Student t test

Supplementary Fig. 6: Behavioral tests in *wt* and *Xlf*^{-/-} adult mice (4 months old)

a/ Anxiety levels of *wt* and *Xlf*^{-/-} mice are similar in the Open-field

Time ± s.d. spent in the center of the Open-field during a five-minute trial was used as an index of anxiety. n=29 mice/group. *p<0.05, **p<0.01, Student t test.

b/ Reduced exploration activity of *Xlf*^{-/-} mice in the Open-field

Time ± s.d. spent rearing was measured during the five-minute trial in the Open-field. n=29 mice/group. *p<0.05; **p<0.01, Student t test.

c/ Normal motor skills of *Xlf*^{-/-} adult mice in the horizontal bars test

The test was performed as previously described⁶⁶. The ability of mice to grip two round wooden bars (2 and 4 mm diameters respectively) was scored as followed: Falling between 1-5 sec = 1; Falling between 6-10 sec = 2; Falling between 11-20 sec = 3; Falling between 21-30 sec = 4; Falling after 30 sec = 5. Scores obtained at each bar were then summed to get a final score for each individual. Mean score ± s.d. *wt* and *Xlf*^{-/-} adult mice are shown in the histogram (20 mice/group).

d/ Normal motor skills of *Xlf*^{-/-} mice in the grip strength test

The test was performed as previously described⁶⁷. The mice were placed on a grid, which was then turned upside down. The time the mice remained attached to the grid before falling was then recorded. Mean latency (s) ± s.d. to fall down of *wt* and *Xlf*^{-/-} adult mice (20 mice/group) are shown in the histogram.

e/ *Xlf*^{-/-} mice spent more time in body sniffing during the social interaction test

Left, mean time ± s.d. spent in body sniffing during the five-minute trial.

Right, minute-by-minute analyses of the time spent in body sniffing by *Xlf*^{-/-} (red) and *wt* (black) mice. n=29 mice/group. ** p<0.01; *** p<0.001, Student t test.

f/ Similar times spent in nose sniffing by *wt* and *Xlf*^{-/-} mice during the social interaction test

Left, mean time ± s.d. spent in nose sniffing during the five-minute trial.

Right, minute-by-minute analyses of the time spent in nose sniffing by *Xlf*^{-/-} (red) and *wt* (black) mice. n=29 mice/group. ** p<0.01; *** p<0.001, Student t test.

h/ Decreased time spent in anogenital sniffing by *Xlf*^{-/-} mice during the first minute of the social interaction test

Left, mean time ± s.d. spent in anogenital sniffing during the five-minute trial.

Right, minute-by-minute analyses of the time spent in anogenital by *Xlf*^{-/-} (red) and *wt* (black) mice. n=29 mice/group. ** p<0.01; *** p<0.001, Student t test.

ANNEXE F. ARTICLE EN PRÉPARATION :
 " IMPAIRED BRAIN DEVELOPMENT AND BEHAVIOR OF XLF NULL MICE
 LINKED TO CHROMOSOME INSTABILITY-INDUCED PREMATURE
 NEUROGENESIS"

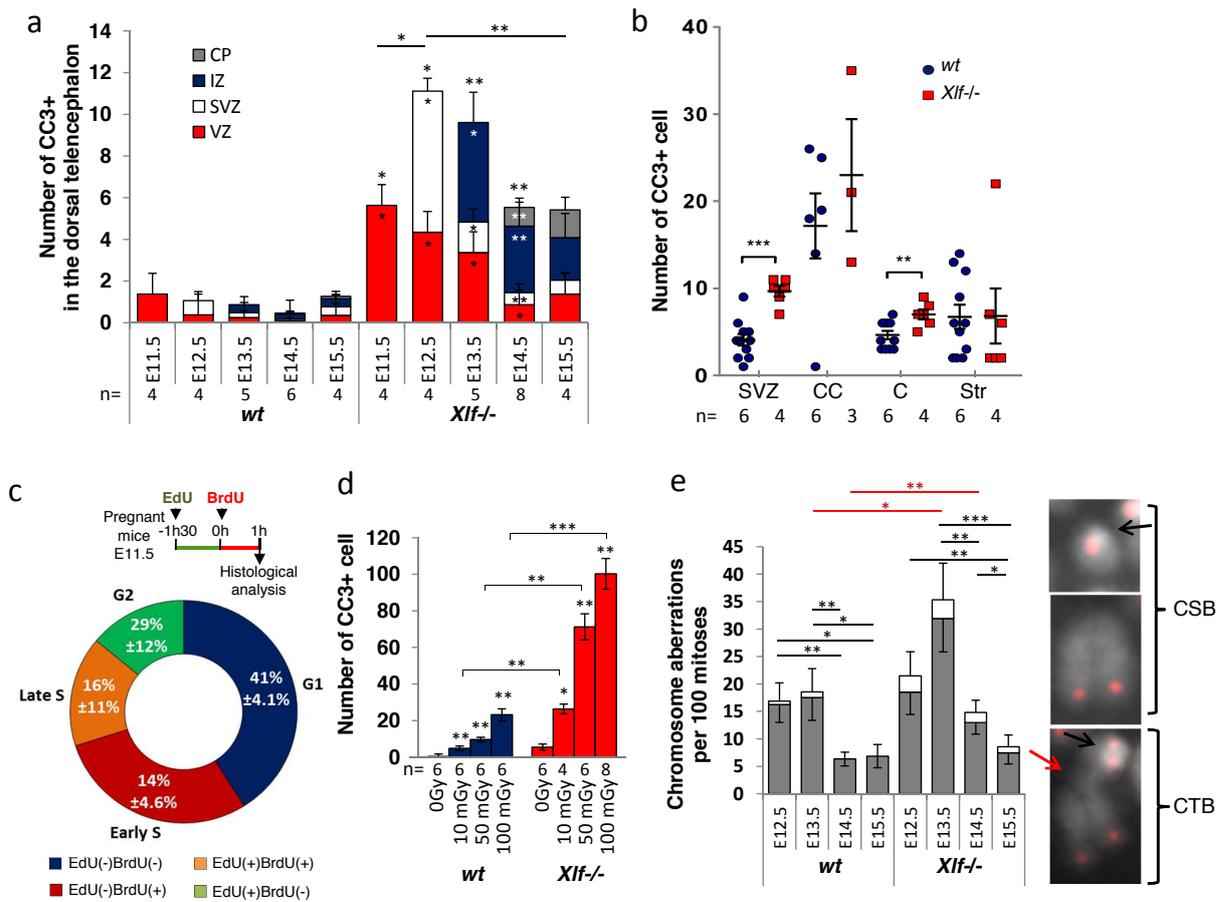


Fig. 1

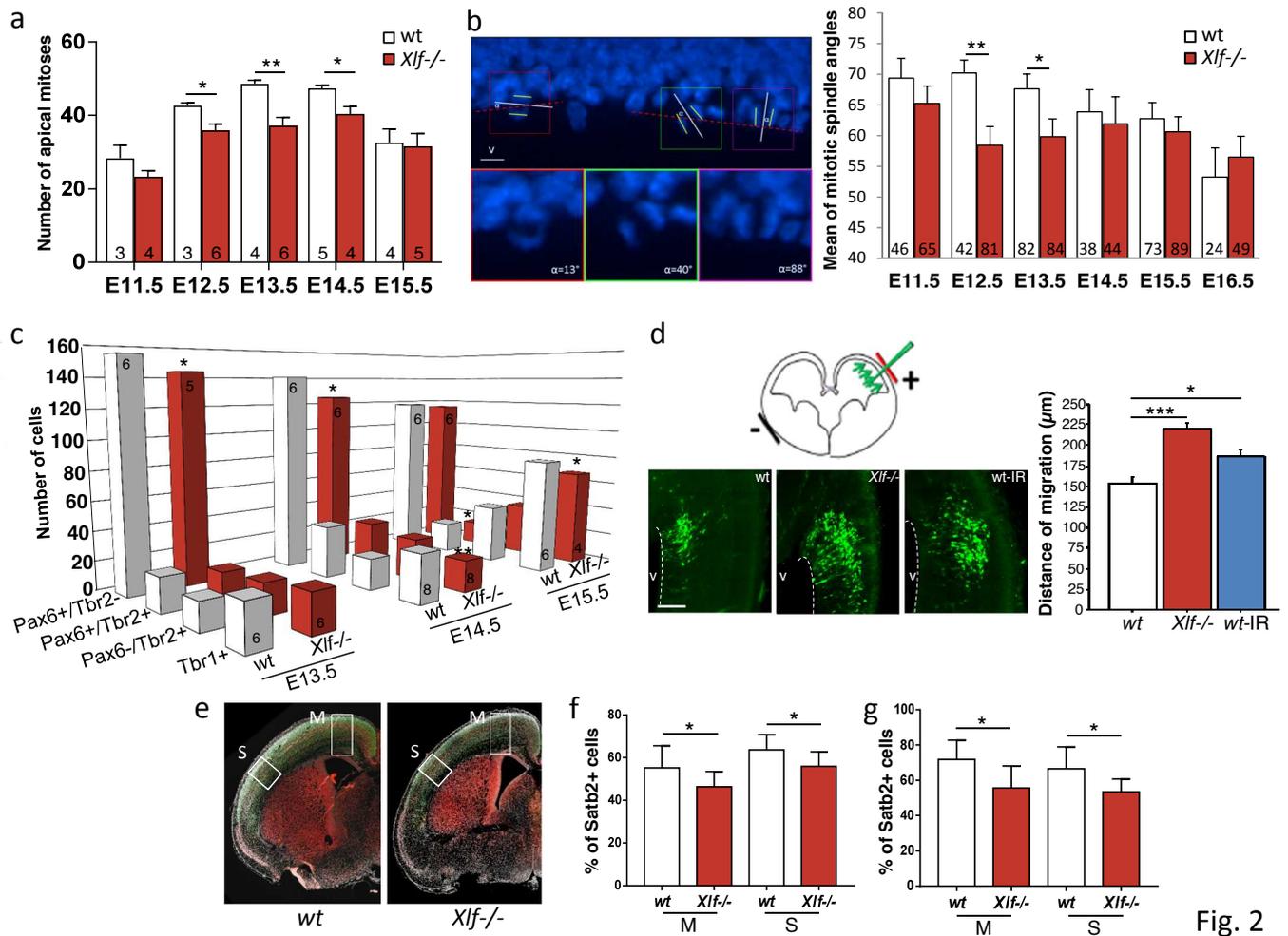


Fig. 2

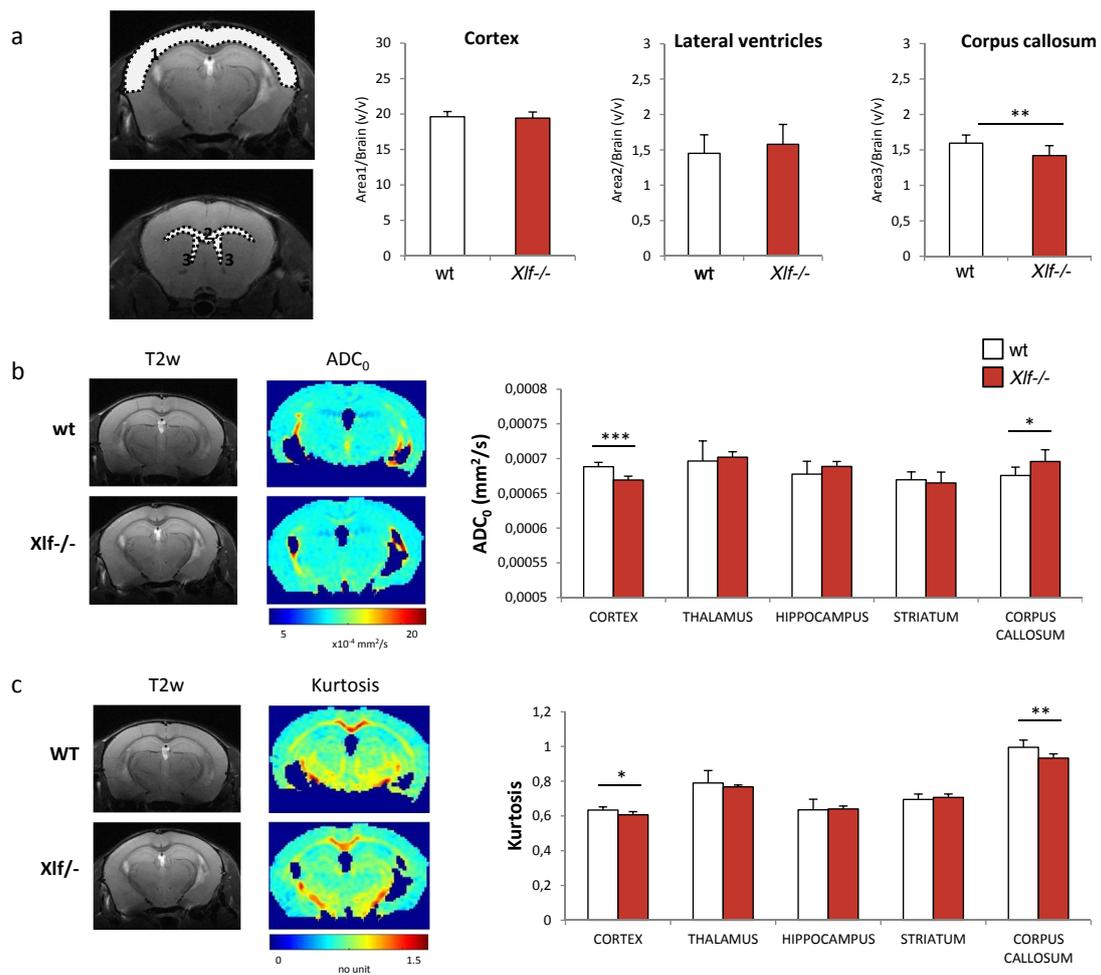


Fig. 3

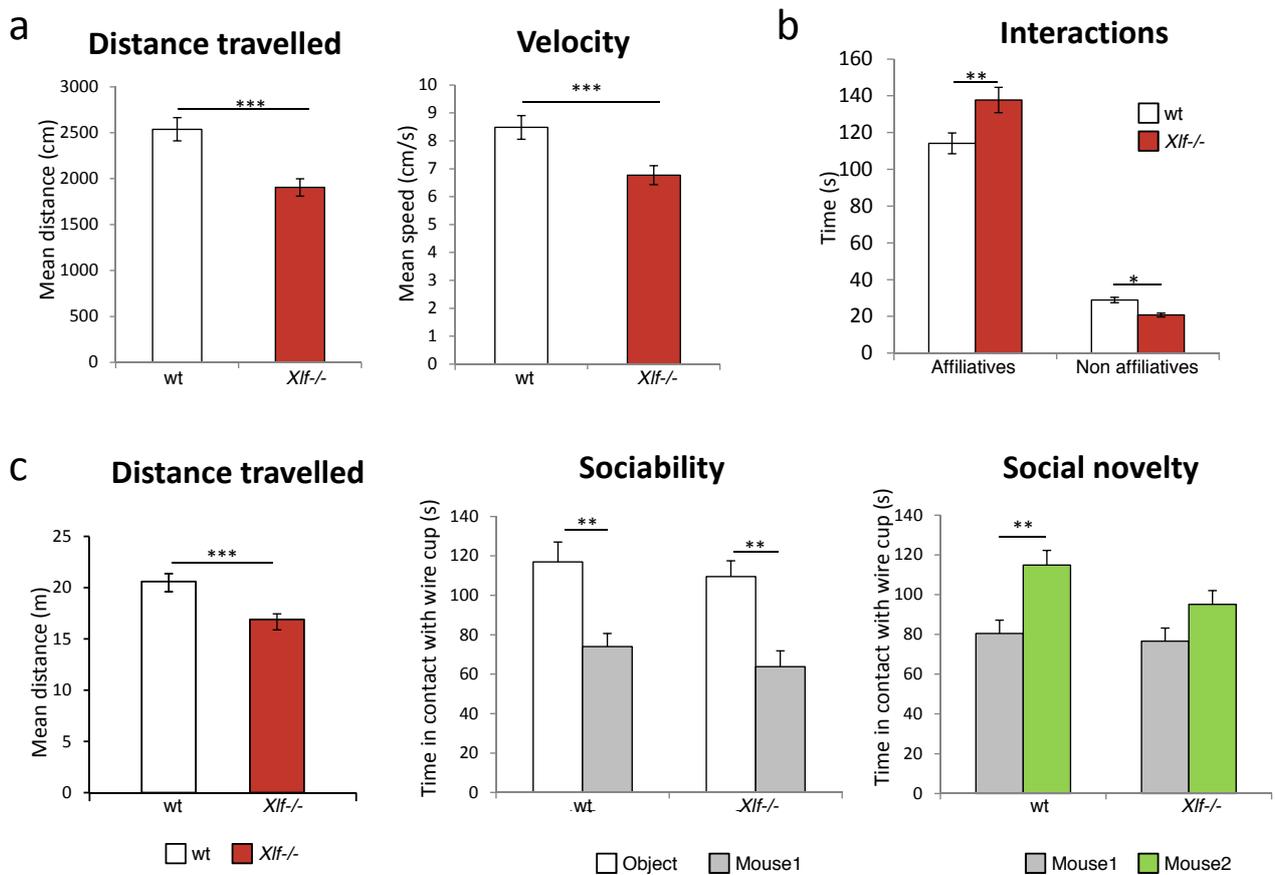
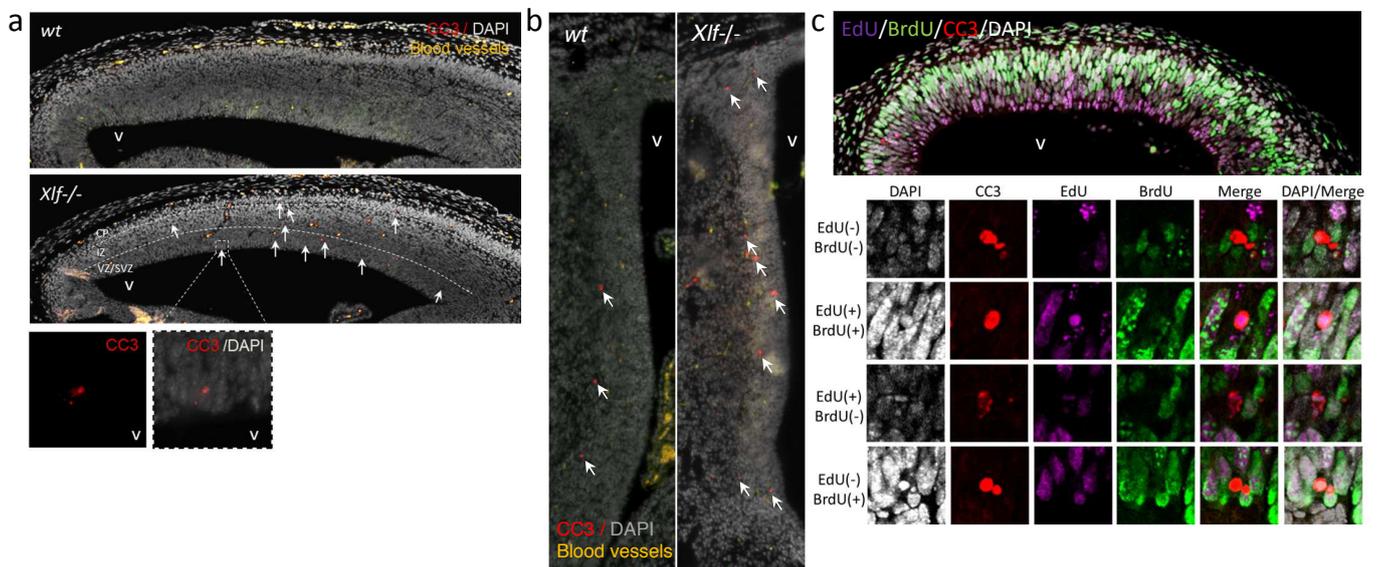
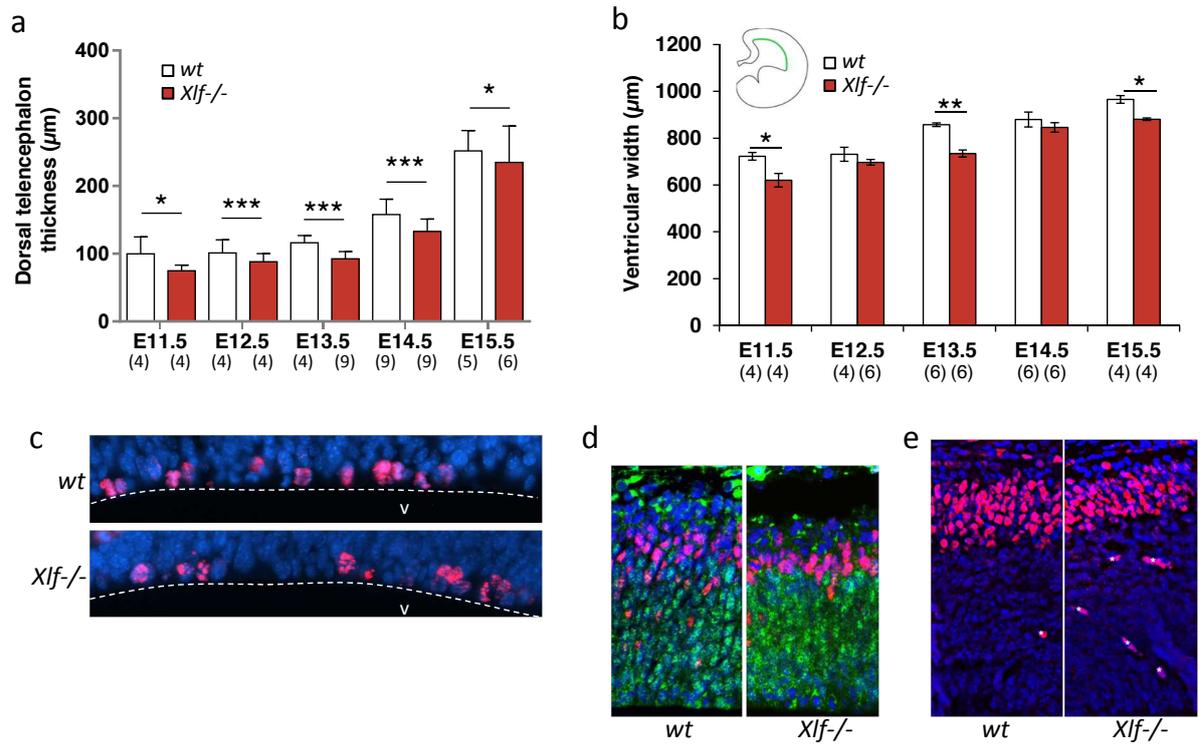


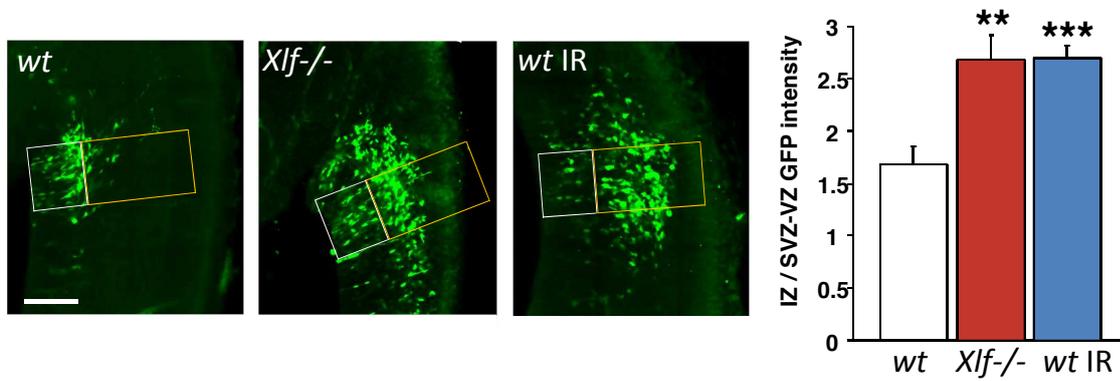
Fig. 4



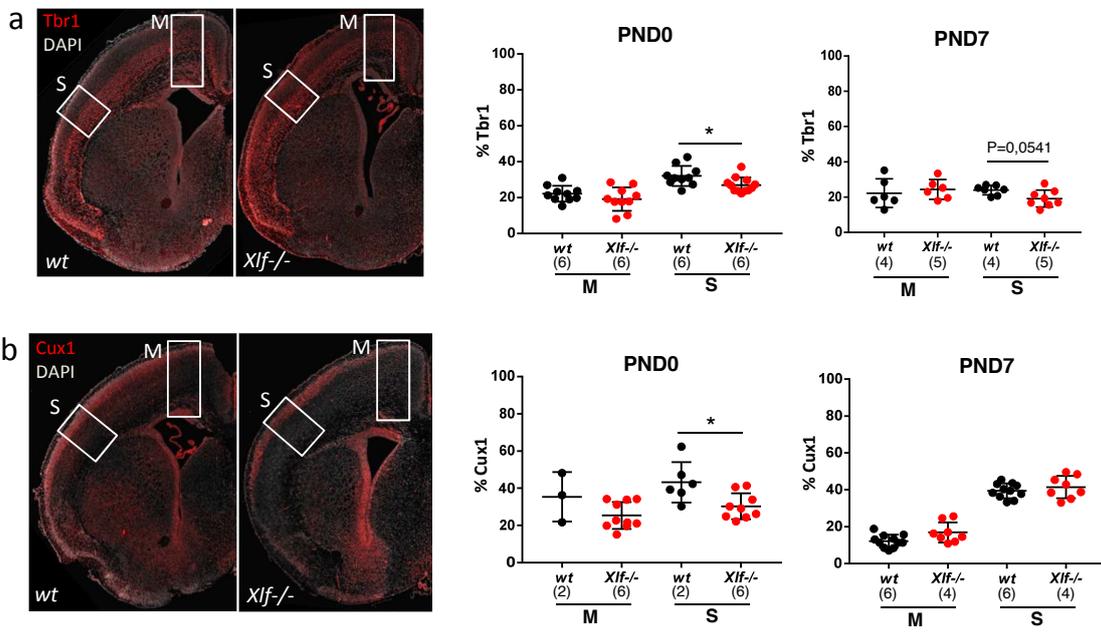
Supplementary Fig. 1



Supplementary Fig. 2

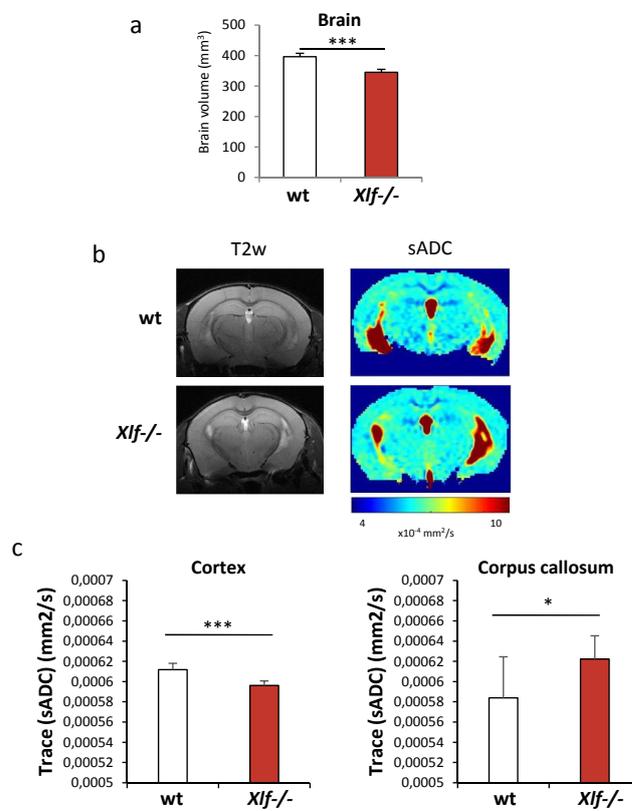


Supplementary Fig. 3

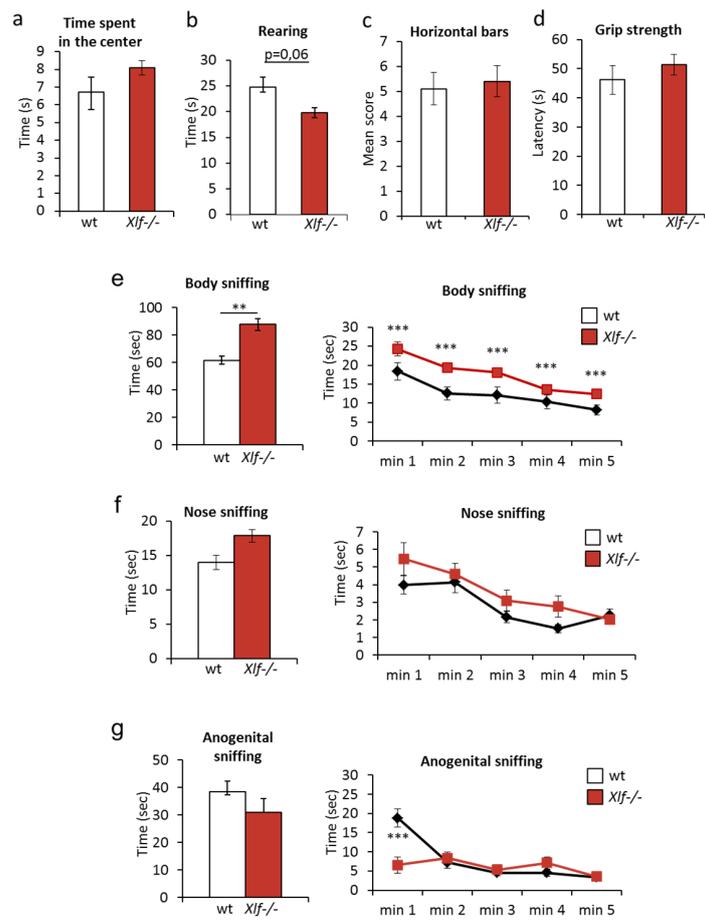


Supplementary Fig. 4

ANNEXE F. ARTICLE EN PRÉPARATION :
" IMPAIRED BRAIN DEVELOPMENT AND BEHAVIOR OF XLF NULL MICE
LINKED TO CHROMOSOME INSTABILITY-INDUCED PREMATURE
NEUROGENESIS"



Supplementary Fig. 5



Supplementary Fig. 6

Titre : Développement de l'imagerie IRM de diffusion pour la caractérisation des atteintes neuropathologiques induites par les radiations ionisantes chez un modèle murin

Mots clés : IRM de diffusion, radiations ionisantes, faibles doses, modèle souris, cerveau

Résumé : Le diagnostic ou le traitement d'une pathologie par l'emploi de rayonnements ionisants peut causer l'apparition de conséquences néfastes et irréversibles pour le cerveau notamment au cours de son développement. D'autant plus, si on considère certains facteurs génétiques modulant la radiosensibilité des individus exposés. Il devient alors nécessaire de développer des marqueurs d'imagerie sensibles aux atteintes cérébrales de l'irradiation à la fois aux fortes et aux faibles doses. Cette thèse a permis de développer une approche non-invasive, par IRM anatomique et de diffusion, pour la détection et la caractérisation des atteintes neuropathologiques radio-induites chez différents modèles de souris irradiées. Une première étude chez des souris exposées à forte dose (1 Gy) *in utero* a permis d'observer, à l'âge adulte, une atrophie cérébrale globale associée à des altérations microstructurelles qui, en lien avec les données histologiques reflètent une diminution de la densité cellulaire.

À l'aide de cette approche, nous avons pu investiguer un modèle de souris radiosensibles (mutation Xlf^{-/-}) irradiées au stade embryonnaire et juvénile à faible dose (100 mGy). Les altérations volumétriques (atrophies) et microstructurelles (variations de densité cellulaire) se sont avérées plus élevées chez les souris irradiées au stade embryonnaire qu'au stade juvénile. De la même façon, nous avons identifié que la déficience du gène Xlf, impliqué dans la voie de réparation NHEJ des cassures double-brins de l'ADN, augmentait la radiosensibilité d'un ordre de grandeur dans notre modèle de souris irradiée *in utero*. Bien que des améliorations méthodologiques soient envisageables, notre approche pourrait à terme être transposée chez l'Homme, en particulier dans le cadre d'une optimisation des protocoles de radiothérapie ou pour l'étude des conséquences sur le développement cérébral d'autres facteurs délétères qu'ils soient de nature génétique ou environnementale.

Title : Development of diffusion-weighted MRI for the characterization of radio-induced neuropathological injuries in mouse model exposed to ionizing radiations

Keywords : diffusion-weighted MRI, ionizing radiations, low doses, transgenic mice model, brain

Abstract : Whether for diagnostic or treatment purposes, the use of ionizing radiations can lead to detrimental and irreversible consequences especially for the developing brain. Furthermore, genetic factors are known to modulate the sensitivity and resilience of individuals to ionizing radiations. It is therefore necessary to develop and validate imaging biomarkers sensitive to the neuroanatomic and microstructural alterations induced by low to high doses of ionizing radiations. During this PhD thesis, I developed an integrated image acquisition and semi-automatic analysis approach based on anatomic and diffusion-weighted MRI, using in particular the S-Index, a novel signature of cellular density and applied it for the non-invasive characterization of radio-induced neuropathological injuries on the developing mice brain following various irradiation protocols. A first study was dedicated to the investigation of adult C57Bl/6 mice exposed *in utero* to a large (1Gy) dose. A widespread

brain atrophy was observed in association with changes in our diffusion parameters consistent with reductions in cellular density. We then investigated a model of radiosensitive mice (knock-out Xlf^{-/-}) irradiated at low dose (100mGy) at the embryonic (E14.5) or juvenile (PN10) stages. Larger volumetric and microstructural alterations were observed in the mice exposed at E14.5 compared to those exposed at PN10. Additionally, the deficiency in the Xlf gene (which is involved in the NHEJ pathway that repairs double-strand DNA breaks) could be associated with a ten-fold increase of the ionizing radiation's impact following *in utero* exposition. While few methodological improvements could be implemented in the near future, our approach could be of interest for translational research, in particular for the optimization of radiotherapy protocols or the study of other deleterious environmental or genetic factors on the developing brain.