



Intérêt de l'activité physique pour contrer la toxicité induite par une irradiation encéphalique : études longitudinales et multiparamétriques chez le rat

Gwenn Ropars

► To cite this version:

Gwenn Ropars. Intérêt de l'activité physique pour contrer la toxicité induite par une irradiation encéphalique : études longitudinales et multiparamétriques chez le rat. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMC430 . tel-03697501

HAL Id: tel-03697501

<https://theses.hal.science/tel-03697501>

Submitted on 17 Jun 2022

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

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

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat
Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Intérêt de l'activité physique pour contrer la toxicité induite par une irradiation encéphalique : Etudes longitudinales et multiparamétriques chez le rat

Présentée et soutenue par
GWENN ROPARS

Thèse soutenue le 16/12/2021
devant le jury composé de

MME ALEXANDRA BARBELIVIEN	Maître de conférences HDR, Université de Strasbourg	Rapporteur du jury
MME ELODIE PERES	Ingénieur de recherche, Université Caen Normandie	Membre du jury Co-encadrante
M. FRANÇOIS BOUSSIN	Directeur de recherche au CEA, CEA Paris-Saclay	Président du jury
M. OMAR TOUZANI	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par OMAR TOUZANI, Imagerie et Stratégies Thérapeutiques de
Pathologies Cérébrales et Tumorales**

A Tad,

ton poison adoré

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier l'ensemble des financeurs qui ont permis la réalisation de ce projet de thèse : co-financement Région Normandie / Union Européenne-Fonds Européen de Développement Régional (FEDER) / Etat français dans le cadre du Contrat de développement interrégional « Vallée de la Seine » 2015-20 (projet Habionor) / 2018-21 (projet 3R) / 2019-22 (projet Cancer-Cog), le CNRS, l'Université de Caen Normandie, le MESRI et l'Agence Nationale de la Recherche « Investissements d'Avenir » n° ANR-11-LABEX-0018-01 et n°ANR-10 -EQPX1401, Archade, le Cancéropôle Nord-Ouest (projet Emergent 2017) et le GDR Sport et activité physique.

Je souhaite remercier le Dr Myriam Bernaudin et le Dr Samuel Valable, de m'avoir accueillie au sein de l'unité ISTCT.

Aux membres de mon jury et en particulier au Dr Alexandra Barbelivien et au Dr François Boussin qui ont accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse.

Un merci particulier au Pr Omar Touzani de m'avoir supportée pendant 5 ans avec ses hauts et ses bas mais toujours l'envie d'aller de l'avant et de transmettre. Sans oublier Elodie, merci pour ta disponibilité et ton écoute mais également pour cette dernière semaine marathon.

Ces travaux n'auraient pas pu se dérouler sans le soutien de la plateforme BRP (*Behavioral Research Palteform*) qui nous a donné accès à leurs différents équipements de comportement. Merci en particulier à Gérald Née et Stacy Largillière pour leur disponibilité et leurs conseils. Merci également au Pr. Thomas Fréret et Dr. Marianne Léger (UMR-S 1075 – COMETE) pour avoir partagé leur expertise en comportement chez les rongeurs et leur *Template* IRM labellisé chez le rat.

Un grand merci à Romaric Saulnier qui m'a transmis le délicat art du prélèvement sanguin et pour nos nombreuses discussions. Merci aussi à Laurent Chazalviel et Jérôme Toutain pour les coups de main quand je ne pouvais pas me dédoubler.

Je souhaite remercier tous les membres de l'équipe CERVOxy pour l'accueil, votre gentillesse et tous les petits mots d'encouragement.

Je remercie très chaleureusement toutes les personnes qui m'ont permis de voir un peu d'humain dans ma journée : toute l'équipe du CURB (Claudine, Alex, Laurine, Séverine, Céline, Stéphane, Marius... pour ne citer qu'eux) ainsi que le personnel du poste de garde à l'entrée du site.

Enfin je tiens à remercier mes proches, les amis et copains de Cyceron et d'ailleurs, et surtout ma famille qui ont su me soutenir et m'encourager tout au long de la thèse. Sans oublier Maxime qui m'a portée jusqu'au bout et qui a grandement contribué à l'accomplissement de ce travail de thèse. Cette thèse c'est un peu la tienne.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES ABRÉVIATIONS	4
LISTE DES FIGURES	7
AVANT-PROPOS.....	14
INTRODUCTION	16
I - LE CANCER DU CERVEAU	16
<i>I-1 Les tumeurs cérébrales primitives</i>	<i>16</i>
I-1.1 Epidémiologie	16
I-1.2 Etiologie	18
I-1.3 Les différents types de tumeurs cérébrales primitives	20
I-1.3.1 Classification	20
I-1.3.2 Le glioblastome	23
I-1.4 Prise en charge thérapeutique	25
I-1.4.1 Chirurgie	26
I-1.4.2 Radiothérapie	27
I-1.4.3 Chimiothérapie	29
I-1.4.4 Nouvelles thérapies	31
<i>I-2 Les métastases cérébrales</i>	<i>34</i>
I-2.1 Données épidémiologiques	34
I-2.2 Diagnostic	35
I-2.3 Pronostic	36
I-2.4 Prise en charge thérapeutique	37
I-2.4.1 Chirurgie	38
I-2.4.2 Radiothérapie	39
I-2.4.3 Chimiothérapie et Thérapies ciblées	40
II – LA RADIOTHERAPIE.....	41
<i>II-1 Les rayonnements ionisants</i>	<i>42</i>
II-1.1 Généralités.....	42
II-1.2 Origine des rayons X et ses interactions avec la matière.....	44
<i>II-2 Effets biologiques radio-induits.....</i>	<i>46</i>
II-2.1 Les effets ciblés.....	48
II-2.2 Les effets non-ciblés	54
II-2.2.1 L’effet bystander.....	55
II-2.2.2 L’effet abscopal.....	58
II-2.2.3 L’effet inter-individu	61
<i>II-3 Radiothérapie des tumeurs cérébrales</i>	<i>63</i>
II-3.1 Principales modalités de radiothérapie	63
II-3.2 Planification des traitements de radiothérapie externe	65
II-3.3 Les différentes techniques de radiothérapie externe	69
II-3.4 Radiothérapie des tumeurs cérébrales primitives	71
II-3.5 Radiothérapie des métastases cérébrales	74
III - EFFETS DE LA RADIOTHERAPIE SUR LE TISSU CEREBRAL SAIN	76
<i>III – 1 Effets secondaires de la radiothérapie cérébrale.....</i>	<i>76</i>
III-1.1 Fatigue/asthénie	78
III-1.2 Déficits cognitifs.....	80
<i>III-2 Etudes précliniques de la neurotoxicité radio-induite</i>	<i>84</i>
III-2.1 Modèles animaux	85

III-2.2 Déficits comportementaux observés dans les modèles animaux	89
III-2.3.1 Etude des fonctions cognitives	89
III-2.3.2 Etude de la fonction motrice	98
III-2.3.3 Evaluation de l'anxiété/dépression.....	100
III-2.3.4 Evaluation de la fatigue	102
III-2.3 Physiopathologie de la radiotoxicité cérébrale.....	104
III-2.3.1 Cellules endothéliales et perméabilité de la BHE.....	105
III-2.3.2 Cellules souches neurales et neurogenèse	105
III-2.3.3 Neurones	107
III-2.3.4 Oligodendrocytes et substance blanche	109
III-2.3.5 Neuroinflammation	110
III-3 Biomarqueurs de la radiotoxicité cérébrale	112
III-3.1 Biomarqueurs d'imagerie	112
III-3.1.1 Imagerie par résonance magnétique (IRM)	113
III-3.1.2 Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM)	120
III-3.1.3 Tomographie par Emission de Positons (TEP)	122
III-3.2 Biomarqueurs sanguins	124
IV – STRATEGIES THERAPEUTIQUES POUR REDUIRE LES ATTEINTES CEREBRALES RADIO-INDUITES	127
IV-1 Les nouvelles modalités de RT.....	127
IV-1.1 IMRT, SRS et SRT.....	127
IV-1.2 Protonthérapie	129
IV-1.4 Irradiation FLASH	131
IV-2 Thérapies médicamenteuses	135
IV-3 Thérapies non-médicamenteuses	137
IV-3.1 Remédiation cognitive	137
IV-3.2 Activité physique	140
IV-3.2.1 Effet de l'activité physique sur le cerveau	140
IV-3.2.2 Prévention	142
IV-3.2.3 Rééducation.....	144
OBJECTIFS	148
MATÉRIELS ET MÉTHODES	149
I - ANIMAUX	149
II - PROCEDURE D'IRRADIATION CEREBRALE	150
III - ETUDES COMPORTEMENTALES	151
III – 1 Evaluation de l'état général des animaux	151
III – 2 Evaluation de la fatigue	152
Evaluation de l'activité locomotrice spontanée : test de l'Open field	153
III – 3 Evaluation de la mémoire	154
Evaluation de la mémoire à court terme : test de reconnaissance d'objets.....	154
Evaluation de la mémoire à long terme : test de l'évitement passif.....	156
Evaluation de la composante spatiale de la mémoire à court terme : test du labyrinthe en Y	156
III – 4 Evaluation des comportements de type anxieux et dépressif.....	157
Evaluation de l'anxiété : test de l'Open field	158
Evaluation de la dépression : Splash test	158
IV - ACTIVITE PHYSIQUE	158
V - ETUDES PAR IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE (IRM).....	160
V- 1 IRM anatomique	160
V- 2 IRM de diffusion	163
V- 3 IRM vasculaire.....	165
VI - ETUDES IMMUNOHISTOLOGIQUES	167
VII - DOSAGES BIOCHIMIQUES DU STRESS OXYDATIF.....	170
VIII - ANALYSES STATISTIQUES	172
RESULTATS.....	173

ETUDE 1 : CARACTERISATION MULTIPARAMETRIQUE ET LONGITUDINALE DE LA RADIOTOXICITE CERVEALE CHEZ LE RAT ADULTE	173
I - ANALYSE DOSIMETRIQUE DE L'IRRADIATION CERVEALE CHEZ LE RAT	174
II- EFFET DE L'IRRADIATION CERVEALE SUR LE COMPORTEMENT ANIMAL	176
I – 1 ETAT GENERAL	176
I – 2 FATIGUE ET ACTIVITE LOCOMOTRICE	180
I – 3 COGNITION	182
I – 4 ANXIETE ET ANHEDONIE	187
III - RECHERCHE DE BIOMARQUEURS D'IMAGERIE POUR DETECTER LES LESIONS CERVEALES RADIO-INDUITES.....	190
III – 1 ETUDE DE LA MACROSTRUCTURE CERVEALE PAR IRM ANATOMIQUE.....	190
III – 2 ETUDE DE LA VASCULARISATION CERVEALE PAR IRM VASCULAIRE	193
III – 3 ETUDE DE MICROSTRUCTURE CERVEALE PAR IRM DE DIFFUSION	199
IV – LE STRESS OXYDATIF : UN BIOMARQUEUR DES ATTEINTES NEUROPATHOLOGIQUES INDUITES PAR L'IRRADIATION ?	213
IV – 1 ESPECES REACTIVES DANS LE TISSU CEREAL	214
IV – 2 ESPECES REACTIVES DANS LE COMPARTIMENT PLASMATIQUE.....	216
IV – 3 L'ALBUMINE ET LA 8-HYDROXYDEOXYGUANOSINE (8-OHdG) DANS LE PLASMA : MARQUEURS INDIRECTS DU STRESS OXYDATIF	219
CONCLUSION.....	220
ETUDE 2 : L'ACTIVITE PHYSIQUE PEUT-ELLE ETRE UNE STRATEGIE THERAPEUTIQUE POUR ATTENUER LES LESIONS CERVEALES ET LES DEFICITS COGNITIFS CONSECUTIFS DE L'IRRADIATION ?	222
I – INTERET DE L'ACTIVITE PHYSIQUE POUR AMELIORER LES TROUBLES COMPORTEMENTAUX ASSOCIES A L'IRRADIATION CERVEALE	223
I – 1 ETAT GENERAL	223
I – 2 FATIGUE ET ACTIVITE LOCOMOTRICE	227
I – 3 COGNITION	231
I – 4 ANXIETE ET ANHEDONIE	234
II – EVALUATION PAR IRM DE L'IMPACT DE L'ACTIVITE PHYSIQUE SUR LES ATTEINTES CERVEALES RADIO-INDUITES.....	237
II – 1 IMPACT DE L'ACTIVITE PHYSIQUE SUR LA VASCULARISATION CERVEALE : ETUDE EN IRM VASCULAIRE.....	237
II – 2 IMPACT DE L'ACTIVITE PHYSIQUE SUR LA MICROSTRUCTURE CERVEALE : ETUDE EN IRM DE DIFFUSION.....	238
CONCLUSION.....	242
DISCUSSION	244
CONCLUSION GENERALE.....	258
BIBLIOGRAPHIE	259
ANNEXES.....	278

LISTE des ABRÉVIATIONS

3D-CRT : *three-dimensional conformal radiotherapy*, radiothérapie conformationnelle 3D

8-OHdG : 8-hydroxydésoxyguanosine

AD : *axial diffusivity*, diffusivité axiale ou parallèle

ADC : *apparent diffusion coefficient*, coefficient de diffusion apparent

AP : activité physique

APA : activité physique adaptée

ASL : *arterial spin labeling*, marquage de spins artériels

AVLT : *Auditory Verbal Learning test*, test d'apprentissage auditivo-verbal

AzMC : 7-Azido-4-methylcoumarin

BER : *base excision repair*, système de réparation par excision de base

BHE : barrière hémato-encéphalique

BOLD : *blood-oxygen-level dependent* signal, signal dépendant du niveau d'oxygène sanguin

BSA : *bovine serum albumin*, albumine de sérum bovin

BVMT-R : *Brief Visuospatial Memory Test-Revised*, Bref test de mémoire visuo-spatiale révisé

CBTRUS : *Central Brain Tumor Registry of the United States*, registre central des tumeurs cérébrales des Etats-Unis

CIRC : centre international de recherche sur le cancer

CRF : *Cancer-Related Fatigue*, fatigue liée au cancer

CTV : *Clinical Target Volume*, volume cible anatomoclinique

DBM : *deformation based-morphometry*, morphométrie basée sur la déformation

DCE-MRI : *dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging*, IRM dynamique à contraste amélioré par injection d'agent de contraste

DCFDA : 2',7'-dichlorofluorescein diacetate

DHE : dihydroethidium

DHR123 : dihydrorhodamine 123

DSB : *double-strand breaks*, cassures double brins de l'ADN

DTI : *diffusion tensor imaging*, imagerie du tenseur de diffusion

DWI : *diffusion weighted imaging*, imagerie pondérée en diffusion

EANO : *European Association of Neuro-Oncology*, association européenne de Neuro-Oncologie

ELISA : *enzyme linked immunosorbent assay*, dosage immuno-enzymatique

eV : électron-volt (énergie cinétique acquise par un électron)

FA : *fractional anisotropy*, fraction d'anisotropie

FDG : fluorodésoxyglucose

FLAIR : *Fluid Attenuated Inversion Recovery*

FMISO : F-fluoromisonidazole

FOV : *Field Of View*, champ de vue

GABA : acide gamma-aminobutyrique

GB : glioblastome

GFAP : *glial fibrillary acidic protein*, protéine d'acides fibrillaires gliales

GPA : *Graded Prognostic Assessment*, indice d'évaluation pronostique graduée

Groupe CTL AP : rats contrôles soumis à une activité physique (tapis de course)

Groupe CTL : rats contrôles

Groupe IR AP : rats irradiés (cerveau entier, 30 Gy) soumis à une activité physique (tapis de course)

Groupe IR : rats irradiés (cerveau entier, 30 Gy)

GTV : *Gross Tumor Volume*, volume tumoral macroscopique

Gy : Gray (unité de la dose physique d'irradiation)

HDV : histogramme dose-volume

HR : *homologous repair*, système de réparation par recombinaison homologue

HVLT-R : *Hopkins Verbal Learning Test-Revised*, test d'apprentissage et de mémoire verbale d'Hopkins révisé

IDH : isocitrate déshydrogénase

IGRT : *Image Guided Radiation Therapy*, radiothérapie guidée par l'imagerie

IMRT : *Intensity Modulated Radiation Therapy*, radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité

INCa : Institut National du Cancer

IRM : imagerie par résonance magnétique

IRMf : IRM fonctionnelle

ITK : inhibiteurs de tyrosine kinase

KPS : *Karnofsky Performance Status*, score de performance de Karnofsky

MBP : *myelin basic protein*

MC : métastase(s) cérébrale(s)

MD : *mean diffusivity*, diffusivité moyenne

MDA : malondialdéhyde

MMR : *mismatch repair*, système de réparation des mésappariements de bases

MMSE : *Mini Mental State Examination*

MoCA : *Montreal Cognitive Assessment*

NAA : N-acétylaspartate

NDB-H : 7-hydrazino-4-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazole

NER : *nucleotide excision repair*, système de réparation par excision de nucléotides

NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique

NO : *nitric oxide*, monoxyde d'azote

NSC : *neural stem cells*, cellules souches neurales

NSCP : *neural stem cells and progenitors*, cellules souches neurales et progéniteurs

OAR : organes à risque

OMS : organisation mondiale de la santé

PBRT : *partial-brain radiotherapy*, radiothérapie cérébrale partielle

PBS : *phosphate buffered saline*, tempon phosphate salin

PNNS : programme national nutrition santé

PRV : *Planning organ at Risk Volume*, planification du volume à risque

PTV : *Planning Target Volume*, planification du volume cible

RANO : *Response Assessment in Neuro-Oncology*, Evaluation de la réponse en neuro-oncologie (groupe de travail)

RCS : *reactive carbonyl species*, espèces réactives du carbone

RD : *radial diffusivity*, diffusivité radiale ou perpendiculaire

RI : rayonnements ionisants

RILA : *radiation-induced lymphocyte apoptosis assay*, test de l'apoptose lymphocytaire radio-induite

RNS : *reactive nitrogen species*, espèces réactives de l'azote

ROS : *reactive oxygen species*, espèces réactives de l'oxygène

ROI : *region of interest*, région d'intérêt

RSI : *reactives species interactome*, interactome des espèces réactives

RSS : *reactive sulfur species*, espèces réactives du soufre

RT : radiothérapie

SB : substance blanche

SG : substance grise

SGZ : *subgranular zone*, zone sous-granulaire

SNC : système nerveux central

SRM : spectroscopie par résonance magnétique

SRS : *Stereotactic radiation surgery*, radiochirurgie ou radiothérapie en condition stéréotaxique

SRT : *Stereotactic radiation therapy*, radiothérapie conformationnelle en condition stéréotaxique

SSB : *single-strand breaks*, cassures simple brin de l'ADN

SSP4 : Sulfane Sulfur Probe 4

SVZ : *subventricular zone*, zone sous-ventriculaire

T2w : imagerie pondérée en T2

Template : cerveau standardisé

TEP : tomographie par émission de positons

TMZ : témozolomide

TPS : *Treatment Planning System*, (système de planification du traitement

TTF : *Tumor Treating Fields*, thérapie par champs de traitement des tumeurs

USPIO : *Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide*, nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer

VBM : *voxel based-morphometry*, morphométrie basée sur les voxels

VSC : volume sanguin cérébral

WBRT : *whole-brain radiotherapy*, radiothérapie sur cerveau entier

LISTE des FIGURES

Figure 1 : Taux d'incidence et de mortalité des tumeurs cérébrales primitives en fonction de l'âge et du sexe. .	17
Figure 2 : Les différents grades des gliomes et leurs cellules d'origine selon la définition de l'OMS.	22
Figure 3 : Distribution des tumeurs cérébrales primitives en fonction de leur caractère bénin ou malin.	23
Figure 4 : Distribution des tumeurs cérébrales primitives malignes et bénignes.	24
Figure 5 : Diagnostic par imagerie d'un glioblastome.	25
Figure 6 : Traitement standard des glioblastomes : protocole Stupp.	30
Figure 7 : Schéma des principales nouvelles thérapies en cours d'essais cliniques pour le traitement des glioblastomes.	31
Figure 8 : Carte de probabilité des métastases cérébrales	34
Figure 9 : Observation par imagerie d'une métastase cérébrale.	35
Figure 10 : Survie des patients atteints de métastase cérébrale (MC) en fonction de l'indice GPA (Graded Prognostic Assessment) et du type de tumeur primitive diagnostiqué.	37
Figure 11 : Arbre décisionnel pour le traitement des métastases cérébrales.	38
Figure 12 : Pouvoir de pénétration des différents types de rayonnements ionisants.	43
Figure 13 : Caractéristiques d'une onde électromagnétique.	43
Figure 14 : Tube de Coolidge ou tube à rayons X.	45
Figure 15 : Schéma des effets photoélectriques et Compton	46
Figure 16 : Effets biologiques cellulaires radio-induits.....	47
Figure 17 : Voies de signalisation des dommages à l'ADN radio-induits et conséquences sur la cellule.	49
Figure 18 : Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la régulation de la prolifération cellulaire.	50
Figure 19 : Les différents mécanismes de réparation des lésions à l'ADN.	51
Figure 20 : Représentation schématique des principaux types de mort cellulaire observés après exposition aux rayonnements ionisants.....	52
Figure 21 : Aperçu schématique des effets locaux (effet bystander) et distaux (effets abscopal) induits par l'irradiation tumorale.....	54
Figure 22 : Schéma des voies de signalisation impliquées dans les effets bystander après irradiation de cellules tumorales du cerveau.....	57
Figure 23 : Evaluation de l'apoptose dans le cervelet chez des souris juvéniles (2 jours post-natal) irradiées corps entier (WB) ou avec protection de la tête (SH).....	58
Figure 24 : Schéma de l'effet abscopal.	60
Figure 25 : L'irradiation du membre postérieur chez la souris entraîne des effets non-ciblés sur le cerveau.....	61
Figure 26 : Effets des lysats tissulaires (hémisphères cérébraux droit et gauche et de la vessie) de rats irradiés ou non-irradiés mais hébergés dans la même cage pendant 48 heures sur la survie cellulaire des cellules HPV-G..	62
Figure 27 : Les deux principaux types de radiothérapie : RT externe et RT interne	64
Figure 28 : Planification des volumes d'irradiation chez un patient atteint d'un glioblastome.....	66

Figure 29 : Distribution de dose pour les quatre modalités de traitement par radiothérapie (RT).....	70
Figure 30 : Distribution de dose axiale représentative de la planification de différentes modalités de RT..	73
Figure 31 : Diagramme d'adaptation des traitements de radiothérapie des métastases cérébrales en fonction du score DS-GPA ou de celui du RPA	74
Figure 32 : Représentation des différentes phases des atteintes cérébrales et des troubles comportementaux induits par l'irradiation cérébrale	77
Figure 33 : Facteurs démographiques, médicaux, psychosociaux et biologiques pouvant influencer la genèse d'une fatigue liée au cancer chez les patients porteurs de tumeurs cérébrales.....	79
Figure 34 : Irradiateurs précliniques dédiés aux petits animaux.....	84
Figure 35 : Méta-analyse d'études précliniques évaluant les déficits neurocognitifs à l'aide de divers tests comportementaux chez la souris et le rat..	86
Figure 36 : Impact de l'irradiation lors du développement cérébral chez des souris : effets de l'âge et de la dose d'irradiation.	87
Figure 37 : Représentation schématique des principales réponses cérébrales physiopathologiques induites par l'irradiation.	88
Figure 38 : Schéma du processus de mémorisation se mettant en place suite à différents stimuli (visuels, olfactifs, auditifs...)	90
Figure 39 : Schématisation des différents types de mémoire retrouvés chez le rongeur et les tests comportementaux associés pour les évaluer.	91
Figure 40 : Evaluation de la mémoire implicite chez la souris par le test de conditionnement de peur réalisé avant et deux semaines après irradiation focalisée de l'hippocampe (80 Gy).	92
Figure 41 : Déficits mnésiques implicites transitoires dans l'apprentissage contextuel induits par l'irradiation cérébrale..	93
Figure 42 : Impact de l'irradiation cérébrale sur la mémoire de rétention évaluée à l'aide du test de l'évitement passif.	94
Figure 43 : Schéma du dispositif du labyrinthe aquatique de Morris.....	95
Figure 44 : L'irradiation du cerveau entier (WBI : whole brain irradiation) entraîne une altération des performances dans le labyrinthe aquatique radial chez la souris..	96
Figure 45 : Evaluation de l'activité locomotrice à l'aide de l'open field.	99
Figure 46 : Diminution des mesures de l'anxiété chez les souris recevant un traitement combiné (RT + immunothérapie) dans deux modèles de souris porteuses de tumeur.....	100
Figure 47 : Evaluation des niveaux d'anxiété et d'activité dans le labyrinthe en zéro surélevé.....	102
Figure 48 : Suivi du développement du comportement de fatigue après une irradiation pelvienne et abdominale (800 cGy x 3 fractions quotidiennes) via la course dans une roue d'exercice.....	103
Figure 49 : La vasculopathie et l'épuisement des oligodendrocytes sous-tendent les dommages de la substance blanche induits par l'irradiation.	104
Figure 50 : L'irradiation diminue la prolifération des cellules souches et précurseurs neuronaux.	106
Figure 51 : Impact de l'irradiation sur les épines dendritiques des neurones hippocampiques.	108

Figure 52 : Preuve de la neuroinflammation induite après irradiation cérébrale et médiée par les macrophages/microglie chez le primate non-humain (macaque)	111
Figure 53 : Planification de traitement de radiothérapie utilisant l'IRM pondérée en T1 à contraste amélioré et trois arcs non coplanaires pour délivrer 20 Gy au volume tumoral cible chez le rat.	113
Figure 54 : Comparaison des atteintes volumiques de la substance grise après RT crânienne chez l'Homme et chez la souris.	115
Figure 55 : Cartes paramétriques obtenues par l'imagerie du tenseur de diffusion (DTI) dans le cerveau.	117
Figure 56 : Carte de corrélation de Heat Spearman entre les changements absolus observés dans les tests neurocognitifs et les changements relatifs dans les concentrations métaboliques mesurées par spectroscopie par résonance magnétique.	121
Figure 57 : Intérêt de la TEP-[¹⁸ F] FDG pour évaluer les effets de la radiothérapie sur le métabolisme glucidique au niveau du cerveau.	123
Figure 58 : Planification dosimétrique de l'épargne hippocampique réalisée par radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (IMRT).	128
Figure 59 : Représentation graphique de la distribution de la dose relative de différents types de faisceaux d'irradiation	129
Figure 60 : Distribution de dose par protonthérapie.	130
Figure 61 : Evaluation par histologie éosine/hématoxyline (HE) des effets de la protonthérapie ciblée sur l'hippocampe chez la souris.	131
Figure 62 : La RT FLASH minimise les altérations mnésiques radio-induites ainsi que les comportements de type anxieux.	133
Figure 63 : Effets distincts de la RT FLASH de la RT conventionnelle (CONV).	134
Figure 64 : Effet neuroprotecteur de la mémantine dans un modèle de radiotoxicité cérébrale chez la souris.	136
Figure 65 : Programmes de remédiation cognitive par utilisation de la réalité virtuelle à partir du système IREX (Vivid Group, Toronto, Canada).	139
Figure 66 : Effets de l'exercice physique réalisé à l'aide d'un tapis roulant sur la neurogenèse dans le gyrus denté de l'hippocampe chez la souris.	141
Figure 67 : Evaluation des effets de l'activité physique sur l'irradiation du muscle squelettique (quadriceps) chez la souris.	143
Figure 68 : La course volontaire améliore les altérations de la neurogenèse hippocampique induite par l'irradiation cérébrale (6 Gy).	145
Figure 69 : Frise temporelle des différentes analyses effectuées au cours de cette thèse.	149
Figure 70 : Images des instruments utilisés pour réaliser l'irradiation cerveau entier chez les rats adultes.	151
Figure 71 : Schéma du dispositif expérimental Fatest permettant d'évaluer l'état de fatigue des rats.	153
Figure 72 : Test de l'Open field.	154
Figure 73 : Test de reconnaissance du nouvel objet permettant d'évaluer la mémoire à court terme des animaux.	154

Figure 74 : Schéma du protocole expérimental du test de reconnaissance du nouvel objet pour évaluer la mémoire de travail (mémoire à court-terme) des rats.	155
Figure 75 : Schéma du protocole utilisé pour le test de l'évitement passif.	156
Figure 76 : Tapis de course pour rongeur en configuration rat.	158
Figure 77 : Représentation schématique simplifiée de l'approche DBM (deformation based-morphometry) et son interprétation.	162
Figure 78 : Schéma des différentes étapes de l'analyse DBM (deformation based-morphometry) des images T2w.	163
Figure 79 : Schéma simplifié des différentes étapes de l'analyse des images DTI et des cartes paramétriques FA (fractional anisotropy), MD (mean diffusivity), AD (axial diffusivity), RD (radial diffusivity).	165
Figure 80 : Schéma simplifié des différentes étapes de l'analyse des images obtenues en IRM vasculaire et des cartes de volume sanguin cérébral (VSC).	167
Figure 81 : Schéma des différentes structures cérébrales analysées.	169
Figure 82 : Capture d'écran des étapes de traitement des images avec le logiciel ImageJ.	170
Figure 83 : Observations d'une carte de dépôt de dose obtenue à l'issue d'une planification de traitement (TPS) et recalée sur une image IRM anatomique.	174
Figure 84 : Estimation du volume irradié en fonction de la dose reçue (courbes HDV) dans les structures cérébrales d'intérêt et les organes à risque pour une simulation TPS d'une dose de 10 Gy déposée sur le cerveau entier.	175
Figure 85 : Comparaison des marquages des cassures double brin de l'ADN (anticorps anti- γ H2A, en rouge) et des noyaux cellulaires (agent intercalant Hoechst 33342, en bleu) dans le cerveau d'un rat contrôle (CTL) et d'un rat irradié sur cerveau entier (IR).	176
Figure 86 : Suivi du poids corporel des animaux contrôles (CTL) et irradiés (IR) jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale.	177
Figure 87 : Score d'état général des animaux contrôles (CTL) et irradiés (IR) au cours du protocole.	178
Figure 88 : Courbes de Kaplan-Meier illustrant la survie des animaux contrôles (CTL) et irradiés (IR) réalisée jusqu'à 6 mois après irradiation encéphalique.	179
Figure 89 : Evaluation de l'état de fatigue des animaux contrôles (CTL) et irradiés (IR) jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale avec le Fatest.	180
Figure 90 : Evaluation de l'activité locomotrice des animaux contrôles (CTL) et irradiés (IR) jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale avec le test de l'Open field.	182
Figure 91 : Evaluation de la mémoire à court terme des animaux contrôles (CTL) et irradiés (IR) jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale avec le test de reconnaissance du nouvel objet.	184
Figure 92 : Evaluation de la mémoire à long terme des animaux contrôles (CTL) et irradiés (IR) jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale avec le test de l'évitement passif.	185
Figure 93 : Evaluation de la mémoire spatiale à court terme à l'aide du labyrinthe en Y chez les rats contrôles (CTL) et irradiés (IR).	186
Figure 94 : Evaluation du comportement de type anxiété chez les rats contrôles (CTL) et irradiés (IR) avec le test de l'Open field..	188

Figure 95 : Evaluation du comportement de type dépression à l'aide du Splash test chez les rats contrôles (CTL) et irradiés (IR).	189
Figure 96 : Effets de l'irradiation sur la macrostructure cérébrale étudiés par IRM anatomique.	190
Figure 97 : Etude des modifications structurales locales induites par l'irradiation cérébrale par analyse DBM (deformation based-morphometry).	192
Figure 98 : Recalage des pixels significatifs bleus ou rouges obtenus sur les cartes de t, issues des données des déterminants jacobiens (analyse DBM), sur un atlas labellisé spécifique du rat Wistar.	193
Figure 99 : Cartes du volume sanguin cérébral obtenues par IRM vasculaire avec injection d'un agent de contraste (P904) chez les groupes de rats contrôles (CTL) et irradiés (IR) à 6 mois après irradiation du cerveau entier....	194
Figure 100 : Analyse statistique pixel-à-pixel sur l'ensemble du cerveau des variations de volume sanguin cérébral (VSC) après irradiation cérébrale.	195
Figure 101 : Analyse par régions d'intérêt des effets de l'irradiation sur le volume sanguin cérébral (VSC) mesuré par IRM vasculaire.	196
Figure 102 : Analyse immunohistologique des vaisseaux sanguins dans l'hippocampe des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR).	197
Figure 103 : Analyse immunohistologique des vaisseaux sanguins dans le cortex des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR).	198
Figure 104 : Analyse immunohistologique des vaisseaux sanguins dans le striatum des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR).	200
Figure 106 : Analyse statistique pixel-à-pixel sur l'ensemble du cerveau des variations de diffusivité moyenne (MD) après irradiation cérébrale.	201
Figure 107 : Analyse par régions d'intérêt des effets de l'irradiation sur la diffusivité moyenne (MD) mesurée par IRM de diffusion.	202
Figure 108 : Analyse immunohistologique de la réponse astrocytaire dans le cortex des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR).	203
Figure 109 : Analyse immunohistologique de la réponse astrocytaire dans l'hippocampe des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR).	204
Figure 110 : Analyse immunohistologique de la réponse astrocytaire dans le striatum des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR).	204
Figure 111 : Analyse statistique pixel-à-pixel sur l'ensemble du cerveau des variations de diffusivité axiale (AD) après irradiation cérébrale.	206
Figure 112 : Analyse par régions d'intérêt des effets de l'irradiation sur la diffusivité axiale (AD) mesurée par IRM de diffusion.	207
Figure 113 : Analyse statistique pixel-à-pixel sur l'ensemble du cerveau des variations de diffusivité radiale (RD) après irradiation cérébrale.	208
Figure 114 : Analyse par régions d'intérêt des effets de l'irradiation sur la diffusivité radiale (RD) mesurée par IRM de diffusion.	209

Figure 115 : Analyse immunohistologique de la myéline dans le striatum des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR).	210
Figure 116 : Analyse statistique pixel-à-pixel sur l'ensemble du cerveau des variations de la fraction d'anisotropie (FA) après irradiation cérébrale.	211
Figure 117 : Analyse par régions d'intérêt des effets de l'irradiation sur la fraction d'anisotropie (FA) mesurée par IRM de diffusion. Evolution temporelle des valeurs de FA chez les rats contrôles (CTL) et les rats irradiés (IR) dans différentes structures cérébrales :	212
Figure 118 : Dosage par fluorescence des taux de ROS dans le cerveau des animaux contrôles (CTL) et des animaux irradiés (IR).	214
Figure 119 : Dosage par fluorescence des taux de RNS dans le cerveau des animaux contrôles (CTL) et des animaux irradiés (IR).	215
Figure 120 : Dosage par fluorescence des taux de RSS dans le cerveau des animaux contrôles (CTL) et des animaux irradiés (IR).	216
Figure 121 : Dosage par fluorescence des taux de ROS dans le plasma des animaux contrôles (CTL) et des animaux irradiés (IR).	217
Figure 122 : Dosage par fluorescence des taux de RNS dans le plasma des animaux contrôles (CTL) et des animaux irradiés (IR).	217
Figure 123 : Dosage par fluorescence des taux de RSS dans le plasma des animaux contrôles (CTL) et des animaux irradiés (IR).	218
Figure 124 : Quantifications par test ELISA des concentrations plasmatiques de l'albumine	220
Figure 125 : Conclusion schématique sur les principaux résultats obtenus par la caractérisation longitudinale et multiparamétrique du modèle de radiotoxicité cérébrale développé chez le rat adulte.	221
Figure 126 : Suivi du poids corporel des animaux contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP) jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale.	224
Figure 127 : Score d'état général des rats contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP) jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale.	225
Figure 128 : Courbes de Kaplan-Meier illustrant la survie des individus contrôles (CTL), irradiés (IR) contrôles AP (CTL AP) et irradiés AP (IR AP) réalisée jusqu'à 6 mois après irradiation encéphalique.	226
Figure 129 : Evaluation quantitative de l'état de fatigue avec le Fatest des rats contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP) jusqu'à 6 mois après irradiation cérébrale.	228
Figure 130 : Evaluation de l'activité locomotrice des animaux contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP) jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale avec le test de l'Open field.	230
Figure 131 : Evaluation de la mémoire à court terme des animaux contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP) jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale avec le test de reconnaissance d'objet.	232

Figure 132 : Evaluation de la mémoire à long terme des rats contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP) avec le test de l'évitement passif jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale.	233
Figure 133 : Evaluation du comportement de type anxiété chez les rats contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP) avec le test de l'Open field.	234
Figure 134 : Evaluation du comportement de type dépression à l'aide du Splash test chez les rats contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP).	236
Figure 135 : Analyse par régions d'intérêt des effets de l'irradiation sur le volume sanguin cérébral (VSC) mesuré par IRM vasculaire.	238
Figure 136 : Analyse par régions d'intérêt des effets de l'irradiation sur la diffusivité moyenne (MD) mesurée par IRM de diffusion.	239
Figure 137 : Analyse par régions d'intérêt des effets de l'irradiation sur la diffusivité axiale (AD) mesurée par IRM de diffusion.	240
Figure 138 : Analyse par régions d'intérêt des effets de l'irradiation sur la diffusivité radiale (RD) mesurée par IRM de diffusion.	242

LISTE des TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des principaux types de tumeurs cérébrales primitives	22
Tableau 2 : Principales tumeurs primitives, leurs traitements standardisés et le pronostic associé.	26
Tableau 3 : Synthèse des protocoles standardisés de traitement selon le type de tumeur cérébrale :	68
Tableau 4 : Définition des organes à risque et les seuils de dose recommandés.	69
Tableau 5 : Biomarqueurs sanguins (plasma ou lymphocytes) des dommages cérébraux induits par la RT.....	126
Tableau 6 : Paramètres d'irradiation selon la modalité choisie : radiothérapie conventionnelle (CONV) ou radiothérapie FLASH (FLASH).	132
Tableau 7 : Tableau de suivi de l'état général des rats en cours de protocole.	152
Tableau 8 : Tableau descriptif de la phase d'habituation des rats au tapis roulant.	159
Tableau 9 : Anticorps primaires utilisés dans les analyses immunohistologiques réalisées.	168

AVANT-PROPOS

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer survient dans une grande partie de la population chaque année et fait partie des principales causes de mortalité dans le monde ce qui en fait un enjeu majeur de santé publique et un axe de recherche important. Bien que les tumeurs du système nerveux central représentent 3% des cas de cancer à travers le monde et sont considérées comme des tumeurs rares, celles-ci sont généralement de mauvais pronostic et la prise en charge de ces patients est difficile. Avec une incidence de 21,8%, l'Europe apparaît comme le 2^e continent (après l'Asie : 54,2%) où la population développe des cancers du cerveau d'après les données de l'observatoire mondial du cancer publiées en 2020. En outre, les tumeurs cérébrales dites primitives ou primaires, puisqu'elles se développent initialement dans l'encéphale, touchent toutes les tranches d'âge et font partie des tumeurs les plus agressives. Ainsi, les patients atteints de glioblastome, forme la plus sévère des gliomes chez l'adulte, ont une médiane de survie de 15 mois après traitements (Tan et al., 2019). De plus, les tumeurs cérébrales peuvent se développer à partir d'un cancer périphérique, elles sont alors identifiées comme étant des métastases cérébrales. Ces dernières sont très fréquentes et des études estiment que 10 à 40% des patients cancéreux développeront une ou plusieurs métastase(s) cérébrale(s) selon le type du cancer primaire (Brown et al., 2018).

D'importants progrès de recherche ont été réalisés ces dernières années, permettant de mettre en place des thérapies efficaces et d'augmenter la survie des patients atteints aussi bien de tumeurs périphériques que cérébrales. Les traitements conventionnels consistent en une résection chirurgicale, si possible, suivie d'un traitement par radiothérapie avec, selon le type de tumeur cérébrale, une chimiothérapie concomitante et/ou adjuvante (Stupp & Roila, 2009). Toutefois, ces patients se plaignent de troubles cognitifs, et en particulier de perte de mémoire, de troubles attentionnels, de difficulté dans le traitement de l'information, ou encore de troubles des fonctions exécutives qui surviennent non seulement pendant la phase de traitement (chimiothérapie et/ou radiothérapie) mais également à plus long terme lors de la phase de rémission, impactant directement leur qualité de vie (Joly et al., 2015). Les mécanismes sous-jacents aux effets indésirables des traitements anticancéreux sur la cognition ne sont pas bien connus et il n'y a pas de prise en charge systématique de ces

troubles. Il apparaît donc important d'améliorer la compréhension de l'étiologie des effets délétères de ces traitements sur le tissu cérébral sain afin de pouvoir proposer à ces patients un moyen de récupérer secondairement les fonctions cognitives affectées par le cancer et ses différents traitements et aborder ainsi la récupération « après-cancer » dans sa globalité. De même, il est essentiel d'améliorer la prise en charge de ces patients en identifiant des biomarqueurs non-invasifs reposant notamment sur l'imagerie ou des prélèvements sanguins pour détecter les dommages cérébraux consécutifs aux traitements anticancéreux, voire même, prédire les atteintes cognitives. D'autre part, pouvoir proposer une stratégie thérapeutique pour minimiser l'impact de ces traitements chez les patients survivants au cancer est primordial afin d'améliorer leur vie quotidienne dans la phase « post-cancer ».

Dans ce contexte, les travaux entrepris au cours de cette thèse ont tout d'abord contribué au développement d'un modèle préclinique de radiotoxicité cérébrale afin de pouvoir évaluer d'une part, les effets de la radiothérapie sur les fonctions cognitives ainsi que sur le tissu cérébral chez le rat adulte et d'autre part, identifier des biomarqueurs potentiels de ces atteintes neuropathologiques. Puis, la caractérisation longitudinale et multiparamétrique de ce modèle animal a ensuite permis d'étudier l'intérêt de l'activité physique comme potentiel outil thérapeutique. Afin d'ancrer nos travaux dans le contexte scientifique actuel et d'étayer le choix de notre démarche expérimentale, l'introduction de ce manuscrit a été organisée en 4 grandes parties. Le premier chapitre est consacré à la présentation des différents types de tumeurs du cerveau, leur épidémiologie, leur classification et les traitements associés. La seconde partie détaille d'avantage le traitement par radiothérapie en abordant les différents effets biologiques radio-induits (effets ciblés et non-ciblés) ainsi que les différents types de radiothérapie actuellement utilisés en clinique et leurs bénéfices pour les patients atteints de tumeurs cérébrales primitives ou de métastases cérébrales. La troisième partie présente les effets de la radiothérapie sur le tissu cérébral sain en y détaillant les différents effets secondaires qui en découlent chez l'Homme et l'animal mais également les outils de recherche permettant de les étudier (tests comportementaux, imagerie multimodale, dosages sanguins). Enfin, la quatrième et dernière partie de cette introduction regroupe les différentes stratégies thérapeutiques pouvant être mises en place afin de réduire les toxicités cérébrales de la radiothérapie, qu'elles soient médicamenteuses ou non médicamenteuses telles que l'activité physique.

INTRODUCTION

I - Le cancer du cerveau

Les tumeurs qui se développent à l'intérieur du crâne sont indifféremment désignées en termes de cancer du cerveau, de tumeurs cérébrales, de tumeurs intracrâniennes et sont souvent regroupées sous l'appellation de tumeurs du système nerveux central (SNC). Les tumeurs cérébrales sont dites primitives ou primaires lorsqu'elles naissent dans le cerveau tandis que les métastases cérébrales sont des tumeurs dites secondaires puisque les cellules tumorales sont issues d'une tumeur initiale localisée hors de l'encéphale et parviennent à migrer vers le tissu cérébral. Il est très important de séparer les tumeurs cérébrales primitives des métastases car cela a des conséquences majeures en matière de prise en charge thérapeutique des patients.

I-1 Les tumeurs cérébrales primitives

I-1.1 Epidémiologie

En 2018, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a recensé 308 102 nouveaux cas de cancers du SNC à travers le monde dont 67 114 en Europe. Avec une incidence de 21,8%, l'Europe apparaît comme le 2^e continent (après l'Asie : 54,2%) avec une population développant des cancers du SNC (rapport de l'observatoire mondial du cancer publié en 2020). Cependant, ces cancers représentent environ 3% des cas de cancer à travers le monde et sont considérés comme des tumeurs rares (Miranda-Filho et al., 2017).

L'incidence en Europe de l'Ouest pour 100 000 personnes est de 6,8 pour les hommes et de 4,9 pour les femmes alors qu'à l'échelle mondiale l'incidence est respectivement de 3,9 pour les hommes et 3,0 pour les femmes. La prévalence des cancers du cerveau en Europe est de 23,6% sur une période de 5 ans (données de l'observatoire mondial du cancer, 2020). Le rapport de l'INCa (Institut National du Cancer) publié en juillet 2019 donne une idée plus précise de la situation en France. Les autorités de santé estiment à 5 886 le nombre de nouveaux cas de tumeurs malignes du SNC en France en 2018 dont 56% sont attribuables à la population masculine. En 2018, les âges médians lors du diagnostic et du décès sont respectivement de 63 et 66 ans chez l'homme et de 67 et 68 ans chez la femme. De plus, les

taux d'incidence et de mortalité observés en fonction de la classe d'âge augmentent de façon marquée à partir de l'âge de 40 ans, et ce, quel que soit le sexe, avant d'atteindre une valeur maximale entre 80 et 84 ans (**Figure 1**).

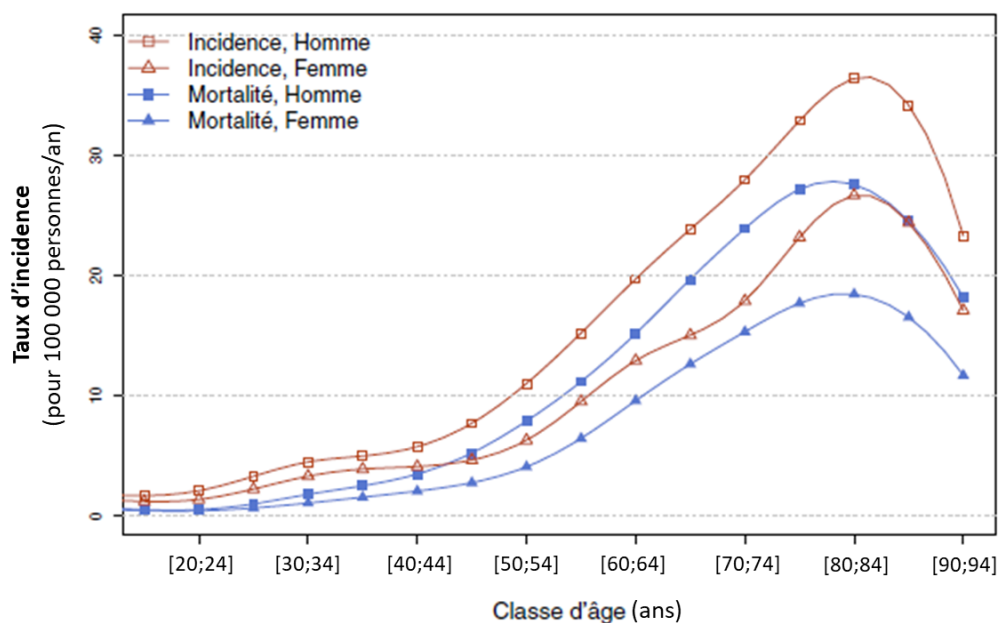


Figure 1 : Taux d'incidence et de mortalité des tumeurs cérébrales primitives en fonction de l'âge et du sexe (rapport de l'INCa, 2019).

En effet, si les tumeurs cérébrales touchent toutes les tranches d'âge, elles sont la 2^{ème} cause de cancer chez l'enfant après la leucémie lymphoblastique aiguë et représentent 20% des cancers pédiatriques (Ajithkumar et al., 2017; Rodgers et al., 2013). Les tumeurs du SNC sont relativement rares chez l'adulte. Il s'agit cependant de la 2^{ème} cause de mortalité par cancer chez les hommes et la 5^{ème} cause chez les femmes dans une population âgée de 20 à 39 ans (Gittleman et al., 2015). Ces données corroborent une étude publiée en 1991 sur les taux d'incidence et de mortalité en fonction de l'âge et du type de cancer du SNC dans plusieurs grands pays industrialisés de 1968 à 1987 (Davis et al., 1991). Bien que le débat semble encore ouvert, plusieurs équipes s'accordent à dire que l'amélioration du diagnostic avec l'introduction de la tomodensitométrie (scanner) et de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) dans les années 1980 serait principalement à l'origine de l'augmentation du nombre de cas observée dans les pays de l'Ouest au cours de ces dernières décennies (Miranda-Filho et al., 2017).

I-1.2 Etiologie

Les facteurs étiologiques des cancers du SNC ne sont pas clairement établis. Plusieurs études épidémiologiques ont exploré de nombreux facteurs pouvant être à l'origine de ces tumeurs et concluent que seuls les facteurs de risque génétiques et l'exposition aux rayonnements ionisants (RI) sont associés au risque de développer une tumeur cérébrale aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant (Miranda-Filho et al., 2017; Ostrom et al., 2019).

Les RI à doses modérées ou élevées apparaissent comme le facteur de risque environnemental le plus important et à ce titre le plus étudié. Ainsi, celui-ci a été observé aussi bien dans des études menées sur les survivants des bombes atomiques, des cohortes d'irradiation thérapeutique ou encore dans des études d'expositions professionnelles et environnementales (Ostrom et al., 2019). L'irradiation thérapeutique constitue le seul facteur de risque environnemental associé sans équivoque à un risque accru de tumeurs cérébrales (Ohgaki & Kleihues, 2005). Dans une revue publiée en 2012, 8 cohortes ont été incluses dans l'analyse de l'effet de l'exposition aux RI comme facteur de risque de tumeurs du cerveau. L'âge moyen lors de l'exposition variait de 8 mois à 26 ans et la dose moyenne reçue de 0,07 à 10 Gy. Les auteurs ont relevé des risques élevés de tumeurs cérébrales systématiquement associés à l'exposition aux RI (Braganza et al., 2012). Certaines études ont également montré que l'application de la radiothérapie (RT) pour le traitement des cancers infantiles, en particulier pour le traitement d'une leucémie lymphoblastique aiguë, était associée au développement de tumeurs cérébrales plus tardivement au cours de la vie de l'individu (Davis et al., 2011; Ostrom et al., 2019). Les enfants sont beaucoup plus sensibles aux effets cancérogènes des RI que les adultes du fait de leur plus grande espérance de vie qui augmente le risque de cancer secondaire radio-induit. En revanche, il existe un nombre plus restreint d'études ayant évalué le risque de cancer après une irradiation diagnostique (radiographie, scanner) chez les enfants. Bien que la dose de RI soit faible lors d'une seule procédure, les patients pédiatriques reçoivent généralement des examens radiographiques de façon répétée au fil du temps afin d'évaluer la progression de la maladie, ce qui peut être à l'origine d'un cumul relativement élevé de doses (Kleinerman, 2006). Dans ce contexte, des études épidémiologiques ont indiqué une augmentation de l'incidence des tumeurs cérébrales chez les enfants, de façon dose-dépendante avec le nombre d'examens en tomodensitométrie au niveau de la tête. De ce fait, les risques de cancer liés aux RI sont plus importants chez les

individus qui y sont exposés très jeunes, et ces risques semblent persister tout au long de la vie (Kleinerman, 2006).

L'impact des rayonnements non-ionisants a également été évalué pour des raisons de santé publique, notamment les champs électromagnétiques de basse fréquence émis par les téléphones portables. En effet, lorsque ceux-ci sont utilisés à proximité de la tête, le cerveau est l'organe qui va absorber la plus grande partie des radiations émises. En 2011, le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a classé les champs de radiofréquence comme « cancérigène possible » sur la base de résultats épidémiologiques préliminaires montrant un risque accru de gliomes et de schwannomes vestibulaires chez les personnes utilisant abondamment leur téléphone portable ou un téléphone sans fil (Cardis, 2010). Depuis 2011, au moins 16 études ont exploré l'incidence des tumeurs cérébrales suite à une utilisation croissante du téléphone portable et la majorité d'entre elles n'ont pas trouvé de changement dans l'incidence des tumeurs cérébrales (Baan et al., 2011). Néanmoins, une étude israélienne et une étude britannique ont révélé une diminution de l'incidence des gliomes de bas grades accompagnée d'une augmentation de l'incidence des gliomes de hauts grades (glioblastomes) (Barchana et al., 2012; Philips et al., 2018). Les données épidémiologiques publiées depuis la revue du CIRC en 2011 ne soutiennent donc pas l'hypothèse d'un lien entre l'utilisation du téléphone portable et le risque de tumeurs cérébrales (CIRC/IARC monograph, 2002). Si une association existe entre les rayonnements non-ionisants et l'incidence des tumeurs cérébrales, la période de latence pour ce type d'exposition est inconnue (Baan et al., 2011; Ostrom et al., 2019).

Les études sur les facteurs de risque génétiques ont permis d'identifier 32 variants associés à un risque accru de développement de ces tumeurs chez l'adulte : 25 dans le gliome, 2 dans le méningiome, 3 dans l'adénome hypophysaire et 2 dans le lymphome primaire du SNC (Ostrom et al., 2019).

D'autres facteurs ont été étudiés pour mieux comprendre l'étiologie des tumeurs du SNC tels que les virus, l'utilisation de contraceptifs hormonaux, l'hormonothérapie substitutive, les statines, le niveau de vitamine D, l'alcool, la taille, l'indice de masse corporelle et les expositions professionnelles mais, à l'heure actuelle, aucune conclusion définitive ne peut être faite sur ces facteurs (Miranda-Filho et al., 2017).

I-1.3 Les différents types de tumeurs cérébrales primitives

Une tumeur cérébrale peut provoquer des symptômes très variables qui vont dépendre notamment du volume de la tumeur, sa vitesse de croissance et surtout de son emplacement. L'apparition des symptômes peut être soudaine ou très progressive dépendamment de la rapidité à laquelle se développe la tumeur. Les symptômes possibles vont de céphalées inhabituelles et persistantes (dus à l'augmentation de la pression intracrânienne), à des crises d'épilepsie voire à des troubles fonctionnels, en lien avec la localisation de la tumeur, comme des troubles de la vision, des modifications de la personnalité, des difficultés à coordonner ses mouvements ou à trouver ses mots. Le diagnostic est ensuite établi par imagerie scanner et/ou par IRM pour préciser la localisation et la taille de la tumeur. De plus, ces examens d'imagerie permettent d'identifier rapidement les principales caractéristiques de la tumeur (aspect circonscrit ou invasif, caractère angiogénique...) permettant d'établir des hypothèses de diagnostic sur le type de tumeur cérébrale. L'un des aspects les plus importants du diagnostic initial des tumeurs cérébrales primitives est le prélèvement d'échantillons représentatifs de la tumeur, appelés biopsies, afin de pouvoir établir un diagnostic histologique de la tumeur qui déterminera le pronostic des patients et le(s) traitement(s) à leur proposer (Fuentes et al., 2018; Herholz et al., 2012).

I-1.3.1 Classification

Bien que les tumeurs cérébrales primitives soient moins fréquentes que les tumeurs périphériques (cancers du sein, de la prostate, colorectal...), elles constituent un groupe très hétérogène et sont pour certaines hautement agressives. Il existe plus de 200 types de tumeurs primitives du cerveau dont la dénomination repose essentiellement sur 3 critères : (1) la localisation, (2) le type cellulaire atteint et (3) le degré d'agressivité. La localisation de la tumeur va influencer le choix du traitement ainsi que les effets secondaires. En effet, selon la région cérébrale où se situe la tumeur, le patient n'aura pas accès aux mêmes traitements et présentera des atteintes fonctionnelles et cognitives très différentes. Pour harmoniser le diagnostic, améliorer la prise en charge des patients et déterminer de façon plus fiable le pronostic et la réponse aux traitements, il est donc apparu nécessaire de les classer.

En 2007, la classification de l'OMS des tumeurs du SNC était essentiellement basée sur un concept histologique qui définissait le degré de ressemblance entre les cellules tumorales et le tissu cérébral sain ainsi que son degré supposé de différenciation (Brouland & Hottinger,

2017; Louis et al., 2016). Les avancées majeures des deux dernières décennies dans le domaine de la génétique des tumeurs ont soulevé la question de la prise en charge de ces nouvelles données dans la classification des tumeurs. Certaines de ces altérations génétiques étaient connues dans la classification des tumeurs du SNC de 2007 mais, à l'époque, il n'était pas envisageable que les modifications génétiques puissent être utilisées pour définir des entités tumorales spécifiques. Ces mutations génétiques étaient alors perçues comme des données pronostiques ou prédictives des différents types de tumeurs cérébrales primitives établies par l'histologie conventionnelle (Louis et al., 2016). La classification de l'OMS de 2007 présente les tumeurs par type histologique et comportement biologique. Cependant, une proportion importante de tumeurs du SNC inscrites dans les registres du cancer n'est pas qualifiée selon cette classification et une faible proportion est notée de manière discordante (Lym et al., 2015).

En 2016, l'OMS définit une nouvelle classification des tumeurs du SNC et y incorpore pour la première fois des paramètres moléculaires et non plus seulement des critères morphologiques (Louis et al., 2016). A titre d'exemple, les principales altérations moléculaires étudiées sont les mutations d'IDH (isocitrate déshydrogénase), p53, ATRX (*Alpha-Thalassemia/mental Retardation syndrome X-linked* : Alpha-Thalassemie/syndrome de retard mental lié à l'X), des histones H3.1 et H3.3, du promoteur TERT et la co-délétion 1p/19q. Les données de la littérature démontrent que la classification moléculaire est mieux corrélée à l'évolution clinique que la classification histologique (Brouland & Hottinger, 2017). La nouvelle classification de 2016 a donc pour but de définir, sur une base moléculaire associée à l'histologie, des groupes de tumeurs homogènes à la fois en termes de pronostic et de réponse aux traitements (Brouland & Hottinger, 2017). Il faut cependant noter que cette classification n'impose pas de techniques spécifiques de test, laissant cette décision au praticien. Néanmoins, les commentaires clarifient certaines interprétations génétiques (Louis et al., 2016).

Les différents types de tumeurs cérébrales sont actuellement définis à partir de la classification de l'OMS de 2016. Le cerveau est composé de plusieurs types cellulaires, chacun pouvant être à l'origine d'une tumeur. Les tumeurs cérébrales portent ainsi généralement le nom de la cellule originelle. Les principaux types de tumeurs cérébrales primitives sont répertoriés dans le **Tableau 1** :

Types de tumeurs	Sous-type	Cellules d'origine
Gliomes	Astrocytomes, Glioblastomes, Oligodendrogliomes	Astrocytes, oligodendrocytes
Tumeurs épendymaires	Ependymomes	Ependyme (membrane tapissant les ventricules cérébraux)
Tumeurs neuronales et neurogliales mixtes	Gangliocytome, gangliogliome, tumeurs neuroépithéliale dysembryoplasique (DNET), neurocytome central et autres	Neurones
Tumeurs embryonnaires	Médulloblastome, tumeur théatoïde, rhabdoïde et autres	Cellules neuro-épithéliales
Méningiomes et tumeurs mésenchymateuses non-méningothéliales	Tumeur fibreuse solitaire, hémangioblastome, sarcome, tumeur neuroectodermique primitive (PNET), lipome et autres	Méninges, cellules mésenchymateuses

Tableau 1 : Classification des principaux types de tumeurs cérébrales primitives (Louis et al., 2016; en-neurologie.fr/deuxieme-cycle/tumeurs-intracraniennes).

Enfin, après avoir établi le type de la tumeur cérébrale, il convient d'en définir le degré de malignité qui reflète son agressivité. L'OMS reconnaît 4 niveaux de malignité des tumeurs, allant du grade I (tumeurs les moins agressives) au grade IV (tumeurs biologiquement les plus agressives). Les critères histologiques pour l'attribution du grade de malignité d'une tumeur ne sont pas identiques d'un type tumoral à l'autre. Certains types de tumeur ne peuvent recevoir plus d'un ou deux degrés de malignité. Cependant, il faut savoir que les tumeurs cérébrales sont connues pour progresser, parfois très rapidement, passant d'une tumeur bénigne à une tumeur très maligne de grade IV (**Figure 2**) (OMS ; Collins, 2004).

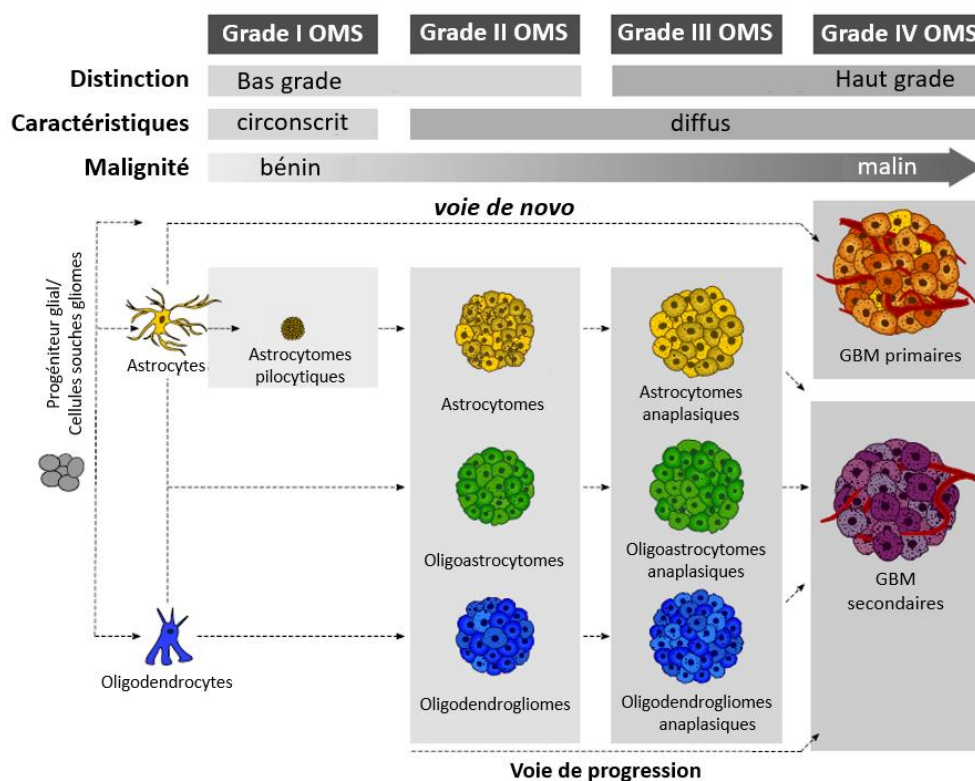


Figure 2 : Les différents grades des gliomes et leurs cellules d'origine selon la définition de l'OMS. La classification de l'OMS définit quatre grades de malignité pour les gliomes : 0 (tissu sain), I (bénin), II (bas grade ou prémalin), III (anaplasique ou malin), IV (anaplasique ou très malin) (Tilak et al., 2021).

Il peut être noté qu’une mise à jour de la classification de 2016 vient récemment d’être publiée pour apporter certaines précisions (Louis et al., 2021) notamment sur le statut IDH des astrocytomes. Ainsi, si le gène IDH est muté, alors il s’agit obligatoirement d’un astrocytome de grade II, III ou IV alors que les gliomes tels que les glioblastomes sont nécessairement IDH sauvage (IDH-wt). De plus, les méningiomes ne sont dorénavant plus subdivisés en sous-types. Enfin, cette nouvelle classification de 2021 inclut désormais les métastases cérébrales.

I-1.3.2 Le glioblastome

Le rapport statistique CBTRUS (*Central Brain Tumor Registry of the United States* : Registre central des tumeurs cérébrales des Etats-Unis) fait part des taux d’incidence des tumeurs cérébrales primitives malignes et bénignes du SNC entre 2013 et 2017. Ce rapport montre tout d’abord que les formes de tumeurs cérébrales bénignes sont plus fréquentes que les tumeurs cérébrales malignes (**Figure 3**) (Ostrom et al., 2020).

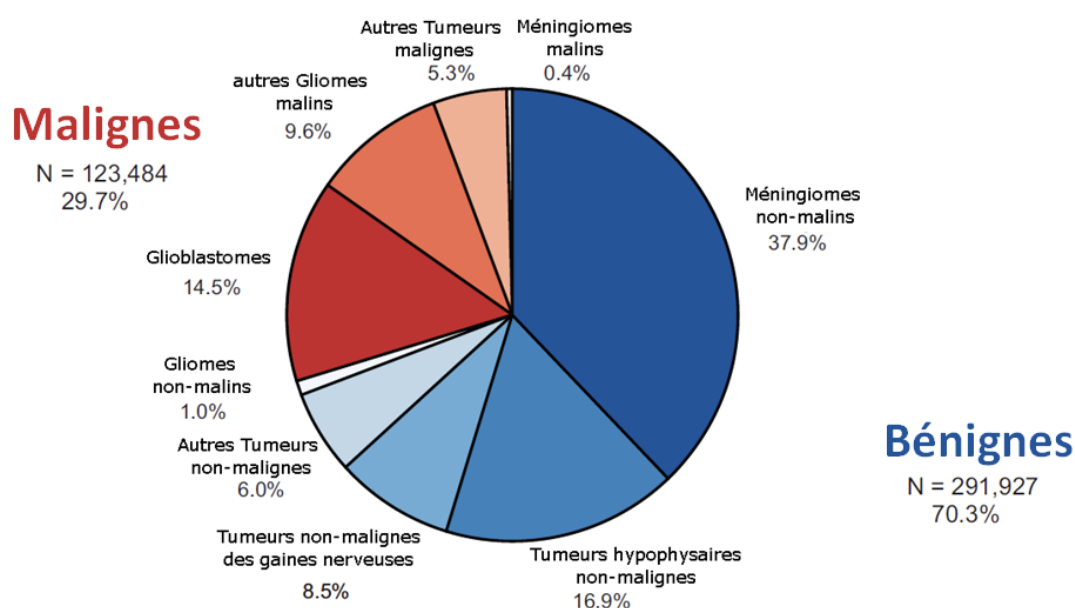


Figure 3 : Distribution des tumeurs cérébrales primitives en fonction de leur caractère bénin ou malin. (Central Brain Tumor Registry of the United States, 2013-2017, Ostrom et al., 2020).

De plus, parmi les tumeurs malignes, le glioblastome, également nommé gliome de grade IV, apparaît comme étant le type de tumeur le plus fréquent (48,6%) (**Figure 4 A**) tandis que le méningiome est la tumeur cérébrale bénigne la plus fréquente (53,9%) chez l’adulte (**Figure 4 B**) (Ostrom et al., 2020).

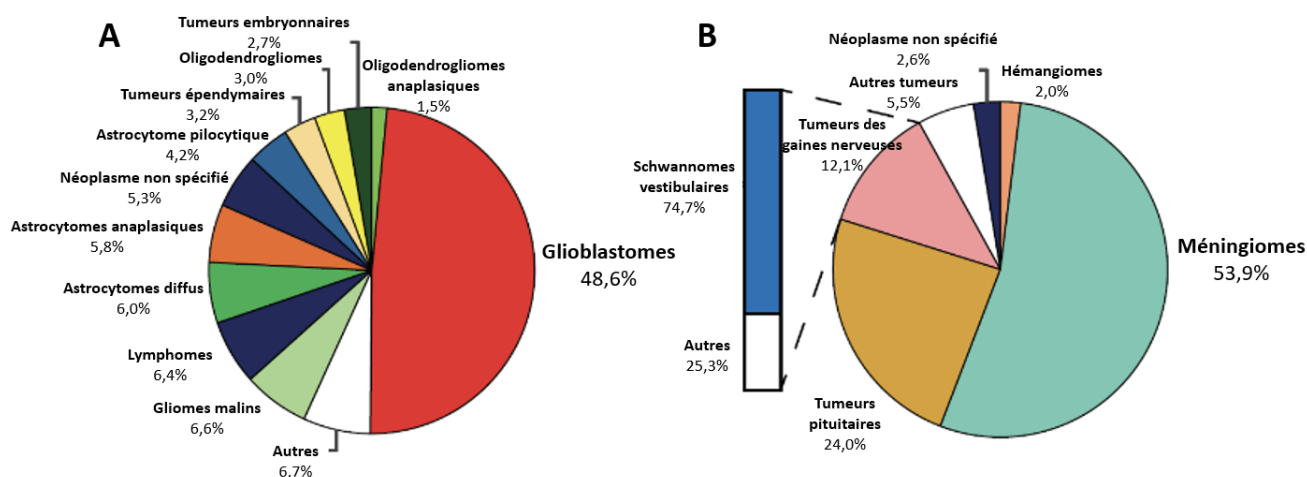


Figure 4 : Distribution des tumeurs cérébrales primitives malignes (A) et bénignes (B) (Central Brain Tumor Registry of the United States, 2013-2017, Ostrom et al., 2020).

Les gliomes représentent à eux seuls environ 25 % de l'ensemble des tumeurs du SNC et 80 % des tumeurs cérébrales malignes. La majorité des gliomes surviennent dans le cerveau, seule une très faible proportion se développe en dehors du cerveau (Ostrom et al., 2020). Les gliomes présentent 4 grades de malignité dont le plus fréquent est le glioblastome (GB). Ce sous-type représente à lui seul 57,7% des gliomes et 14,5% de l'ensemble des tumeurs cérébrales primitives bénignes et malignes confondues.

Les GB se définissent par la présence d'une nécrose, d'une prolifération endothéliale importante ainsi qu'un aspect diffus lié au caractère très invasif de ces tumeurs. De plus, cette tumeur primitive est particulièrement hypoxique ce qui la rend agressive et résistante à la radiothérapie et la chimiothérapie (Bekaert et al., 2017). Les images présentées dans la (**Figure 5**) présentent les principales caractéristiques d'un GB identifiables en imagerie. Les séquences pondérées en T1 après injection de gadolinium montrent un rehaussement de contraste hétérogène ainsi qu'une nécrose, indicateurs d'une rupture de la barrière hémato-encéphalique et donc de la présence d'une néo-angiogenèse. D'autre part, l'hyperintensité visible sur la séquence FLAIR (*Fluid Attenuated Inversion Recovery*) traduit la présence d'une tumeur très œdémateuse, conséquence de la prolifération intense des cellules tumorales associée à leur caractère invasif. De plus, l'imagerie de l'hypoxie réalisée par tomographie par émission de positons (TEP) [^{18}F]-FMISO montre des niveaux d'absorption de FMISO (F-fluoromisonidazole) au niveau du site tumoral correspondant à un volume sanguin cérébral plus élevé (Bekaert et al., 2017).

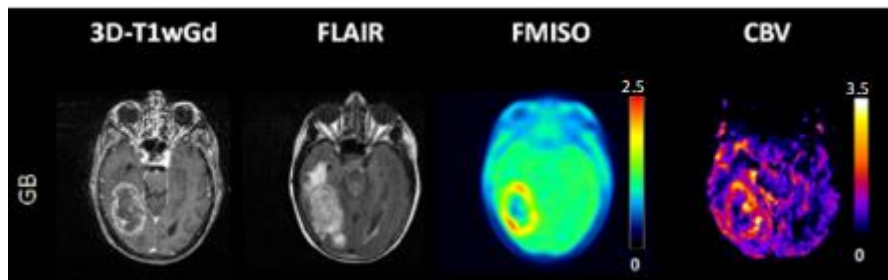


Figure 5 : Diagnostic par imagerie d'un glioblastome. Exemples d'images obtenues par une séquence 3D pondérée en T1 après injection d'un agent de contraste, le gadolinium (3D-T1wGd) et par séquence FLAIR permettant de délimiter la tumeur. L'image issue d'un examen TEP [^{18}F]-FMISO associée à la carte du volume sanguin cérébral (CBV) obtenue par une séquence dynamique T2* avec injection de gadolinium témoignent respectivement du caractère très hypoxique du glioblastome ainsi que de sa forte vascularisation (Bekaert et al., 2017).

I-1.4 Prise en charge thérapeutique

Face aux particularités du cerveau, le traitement des tumeurs cérébrales primitives est complexe. De plus, la multitude des types de tumeurs cérébrales et leur inhomogénéité intra- et inter-patient amènent à choisir un traitement qui doit être personnalisé. Comme présenté dans le **Tableau 2**, les stratégies thérapeutiques conventionnelles de prise en charge des patients atteints de tumeurs cérébrales primitives reposent sur un arsenal thérapeutique associant généralement la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Les progrès en recherche médicale et fondamentale ont amené à proposer de nouveaux traitements tels que les thérapies ciblées et l'immunothérapie qui sont actuellement en cours d'essais cliniques et semblent prometteurs pour améliorer la prise en charge personnalisée des tumeurs cérébrales.

Tumeur		Traitement	Pronostic (médiane de survie)
Gliomes	Gliome de grade I ou astrocytome pilocytique	Chirurgie	Guérison
	Gliome de grade II ou gliome diffus de bas grade	Chirurgie Si inopérable et signes évolutifs ou présence de facteurs de mauvais pronostic : RT ± chimiothérapie	Selon le profil moléculaire de la tumeur 5 – 10 ans
	Gliome de grade III ou gliome anaplasique	Chirurgie ± RT focale ± chimiothérapie dont les modalités dépendent du profil moléculaire	Selon le profil moléculaire de la tumeur 2 – 10 ans (en cas de codélétion 1p-19q : > 10 ans)
	Gliome de grade IV ou glioblastome (GB)	Chirurgie ± RT focale ± chimiothérapie par TMZ concomitant et adjuvant	12 – 18 mois
Méningiome		Chirurgie	Guérison
Lymphome primitif du SNC		Chimiothérapie (MTX à haute dose) Chez les patients jeunes : ± RT encéphale entier ou intensification avec autogreffe des cellules souches périphériques	3 – 4 ans Guérison dans 20 – 30 %
Médulloblastome		Chirurgie ± RT craniospinale ± chimiothérapie en cas de résection incomplète ou de diffusion leptoméningée	5-10 ans

Tableau 2 : Principales tumeurs primitives, leurs traitements standardisés et le pronostic associé. Abréviations : RT= Radiothérapie ; TMZ=Témzolomide ; MTX= Méthotrexate (d'après <https://www.cen-neurologie.fr/deuxieme-cycle/tumeurs-intracranienues>).

I-1.4.1 Chirurgie

La résection chirurgicale est le traitement le plus efficace et, par conséquent, le traitement de premier choix d'un cancer du cerveau (Fuentes et al., 2018). La chirurgie va alors consister à enlever le maximum de la masse tumorale pour réduire la pression intracrânienne, améliorer la récupération d'un éventuel déficit neurologique induit par l'effet de masse et ralentir la progression tumorale (Carpentier, 2008; Stupp & Roila, 2009). Dans le cas d'une tumeur cérébrale non-infiltrante (ex. méningiome), les contours sont bien délimités et la chirurgie va permettre d'extraire la totalité de la tumeur conduisant à augmenter considérablement l'espérance de vie des patients, voire même dans certains cas à la guérison. En revanche, il est impossible de pratiquer une exérèse complète dans le cas de tumeurs cérébrales diffuses telles que les GB (Stupp & Roila, 2009). En plus du caractère infiltrant de la tumeur, il s'agit de prendre en considération sa localisation au sein du cerveau. En effet, suivant la zone dans laquelle la tumeur se développe, il est difficile pour les neurochirurgiens

de procéder à une exérèse totale sans endommager certaines fonctions cérébrales. Afin de contrer et minimiser les risques de perte de fonctions, il existe une technique de chirurgie éveillée du patient pour cartographier par électrostimulation les zones du cerveau et ainsi éviter toutes séquelles lors de l'opération (Duffau, 2011). Ainsi, il est estimé que seuls 30% des patients atteints de GB pourront bénéficier d'une résection tumorale qui augmente de quelques mois la survie des patients. Celle-ci étant inférieure à 3 mois si aucun traitement n'est entrepris (Carpentier, 2008; Mitchell et al., 2005; Tsao-Wei et al., 2012). Toutefois, la récurrence tumorale survient dans presque 100% des cas et à proximité de la zone de résection.

Bien que la chirurgie reste le traitement de première intention des tumeurs cérébrales, une résection complète d'un point de vue microscopique reste difficile et rarement réalisée. Cette pratique d'exérèse totale avec des marges implique une atteinte du tissu cérébral fonctionnel pouvant conduire à de graves déficits neurologiques (Snider & Mehta, 2016). De ce fait, la chirurgie, même si elle est bénéfique, reste insuffisante et doit donc être associée à d'autres traitements comme la radiothérapie et la chimiothérapie. Dans cette partie, nous aborderons brièvement les différentes options thérapeutiques.

I-1.4.2 Radiothérapie

Le terme « radiothérapie » (RT) désigne l'ensemble des traitements utilisant des rayonnements ionisants, à savoir les rayons X et γ ainsi que les particules α , β et les neutrons, qui ont une énergie suffisamment forte pour arracher les électrons de la matière. La RT a une puissante capacité à induire la mort cellulaire et empêche la survie des colonies tumorales. Elle apparaît donc comme un traitement essentiel dans le parcours de soin des patients atteint d'un cancer.

A ce jour, la RT reste le deuxième traitement le plus efficace après la chirurgie (Choong et al., 2014; Snider & Mehta, 2016). En effet, 40% des patients cancéreux guéris auront reçu une RT dans leur prise en charge et environ 50% des patients auront besoin d'une RT à un moment ou un autre de leur parcours de soin, quel que soit le revenu national brut du pays et le type de cancer traité (Thompson et al., 2018). Ainsi, environ 200 000 patients atteints de tumeurs cérébrales primitives sont traités chaque année aux Etats-Unis par RT (Attia et al., 2014). La RT apparaît donc comme la modalité de traitement la plus utilisée, tous grades de tumeur cérébrale confondus (Armstrong et al., 2010).

Selon le type de la tumeur cérébrale, sa localisation et son étendue, la RT peut être réalisée sur l'ensemble du cerveau, technique également dite RT panencéphalique ou *in toto* (WBRT : *whole-brain radiotherapy*), ou bien elle peut être appliquée sur une partie de l'encéphale et est dite radiothérapie cérébrale partielle (PBRT : *partial-brain radiotherapy*). La RT cérébrale est utilisée pour répondre aux objectifs cliniques suivants : (1) contrôle ou guérison de la tumeur à long-terme en monothérapie ou thérapie combinée, (2) ralentissement de la croissance tumorale, (3) mesure prophylactique pour tuer les cellules tumorales afin d'éviter qu'elles ne se propagent dans l'ensemble du cerveau (Makale et al. , 2017). De plus, selon le type et grade de la tumeur cérébrale primitive ainsi que l'état du patient et son âge, les doses de RT peuvent varier entre 30 et 60 Gy (Feuvret et al., 2016).

La RT externe basée sur l'utilisation de rayons X est un standard thérapeutique pour de nombreuses tumeurs cérébrales primitives montrant un gain thérapeutique indéniable. A titre d'exemple, le bénéfice de la RT sur les GB a clairement été démontré à la fin des années 1970 par plusieurs études de phase III rapportant que la RT, réalisée en post-opératoire, permettait d'augmenter la médiane de survie des patients (Salazar et al., 1979), même si, celle-ci reste faible (8 à 12 mois) (Kantor et al., 2008; Weller et al., 2009). Il est alors nécessaire de coupler la RT à une chimiothérapie concomitante avec des molécules ayant des effets radio-sensibilisants et aussi en phase adjuvante pour améliorer le pronostic des patients.

Bien que la RT soit indéniablement importante dans la prise en charge thérapeutique des patients atteints de tumeurs cérébrales, la pénétration des rayons X dans le tissu sain avoisinant la tumeur provoque des effets secondaires, à plus ou moins long-terme, qui affectent la vie quotidienne des patients. Ainsi, la RT n'a cessé d'être optimisée à partir d'améliorations technologiques des machines d'irradiation afin de délivrer une dose plus importante à la tumeur tout en épargnant au maximum le tissu sain environnant (Snider & Mehta, 2016).

Le sujet de cette thèse étant axé sur la RT des tumeurs cérébrales, la planification du traitement, les différentes modalités de RT et leurs gains thérapeutiques seront détaillés dans la seconde partie de l'introduction (pages 42-75). De même, les effets secondaires de la RT, et en particulier sur le tissu cérébral sain, seront abordés dans la 3^{ème} partie de l'introduction du manuscrit (pages 76-127).

I-1.4.3 Chimiothérapie

La chimiothérapie fait partie intégrante du processus de soin des patients atteints de tumeurs cérébrales primitives, soit en complément d'une chirurgie, soit comme principal traitement lorsque la tumeur est dite inopérable. Ce type de traitement consiste à administrer des médicaments ayant des actions cytotoxiques. En pratique, son action est limitée dans le cadre d'une tumeur cérébrale car peu de molécules arrivent à atteindre le cerveau à cause de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui présente une perméabilité très sélective (Bhowmik et al., 2015). Cependant dans les gliomes de haut grade, la BHE est perturbée ce qui permet le passage de molécules dans l'espace extracellulaire (Wen et al., 2006). Bien qu'elle interagisse avec des macromolécules ou des enzymes particulières, la chimiothérapie conventionnelle n'est pas spécifique des cellules tumorales et agit sur toutes les cellules à division rapide, y compris celles des tissus sains, ce qui implique de nombreux effets indésirables qui limitent considérablement son usage et contraignent les oncologues à limiter les doses administrées (Merlin, 2008). En effet, bien que la chimiothérapie systémique soit essentielle pour le traitement de diverses formes de cancer, elle peut provoquer des effets secondaires cognitifs pendant ou après traitement, phénomène qui est désigné sous le terme de « *chemobrain* » ou « *chemofog* » (Park et al., 2018).

Pour les tumeurs cérébrales de haut grade comme le GB, le traitement de première ligne a longtemps reposé sur l'utilisation des nitroso-urées (CCNU = lomustine, BCNU = carmustine, fotemustine), dont le bénéfice, rapporté dans le cadre d'essais de phase III, se limite le plus souvent à un faible impact sur la médiane de survie (Galanis & Buckner, 2000; Lonardi et al., 2005). Depuis les années 2000, le témozolomide (TMZ), agent alkylant de deuxième génération ayant une bonne pénétration dans le SNC, a permis d'établir un nouveau standard thérapeutique de première intention dans la prise en charge des patients atteints de GB. Cependant, son utilisation en monothérapie n'a pas montré d'augmentation de la survie des patients (Sher et al., 2008). Seul le traitement concomitant RT et TMZ puis TMZ adjuvant, appelé protocole Stupp, a montré un gain thérapeutique avec une augmentation de la survie globale et la survie à 5 ans par rapport à la RT seule (9,8% avec le traitement combiné contre 1,9% avec la RT seule) (Stupp & Roila, 2009; Stupp et al., 2009).

Ce traitement de référence pour les GB, repose sur le schéma thérapeutique suivant (**Figure 6**) :

- 30 fractions de RT à une dose de 2Gy à raison de 5 jours/semaine sur 6 semaines ;
- TMZ journalier à 75mg/m² en concomitance de la RT ;
- A la fin de la RT : 5 jours de TMZ à 150-200mg/m², répété tous les 28 jours pendant 6 cycles.

Brièvement, la chimiothérapie la plus utilisée pour le traitement de première ligne des tumeurs cérébrales de haut grade est le TMZ et lors de la récurrence tumorale, plusieurs chimiothérapies sont utilisées en association (protocole PCV : procarbazine, lomustine et vincristine) (Tan et al., 2020).

Face à l'échec de nombreux agents de chimiothérapie dû à la résistance des cellules tumorales ainsi qu'à une mauvaise distribution de ces drogues dans les tumeurs cérébrales très malignes, d'autres stratégies thérapeutiques ont été proposées et font actuellement l'objet de nombreux essais cliniques.

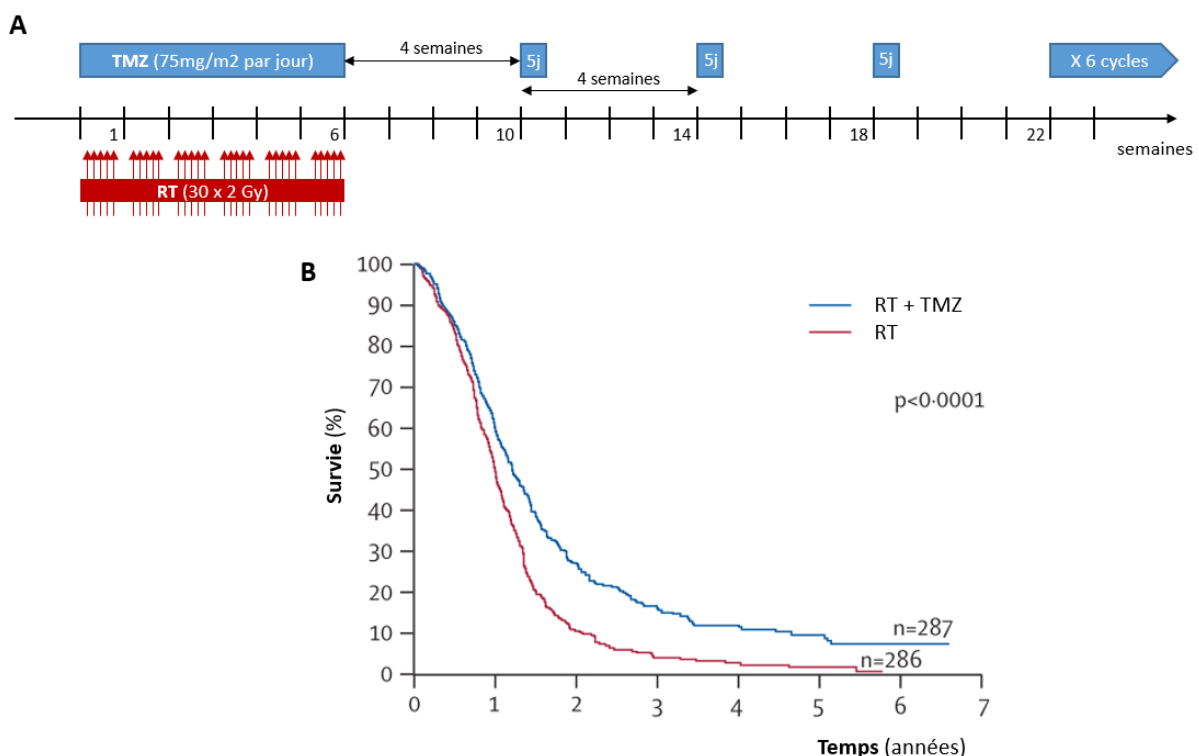


Figure 6 : Traitement standard des glioblastomes : protocole Stupp. (A) Schéma thérapeutique du traitement de référence des glioblastomes comprenant une radiothérapie et chimiothérapie (TMZ) concomitante puis adjuvante. **(B)** Survie des patients traités par ce protocole standardisé RT + TMZ par rapport aux patients traités uniquement par RT (d'après Stupp et al., 2009).

I-1.4.4 Nouvelles thérapies

Face à la résistance des tumeurs cérébrales de haut grade aux traitements conventionnels, de nouvelles thérapies ont été développées pour 1) cibler des molécules ou des voies de signalisation cellulaires fortement impliquées dans la progression tumorale (thérapies ciblées) ou 2) stimuler ou bloquer le système immunitaire (immunothérapie) et 3) plus récemment est apparu l'intérêt des champs électriques alternatifs (**Figure 7**). Ces différents types de nouvelles thérapies sont abordés ci-dessous très brièvement.

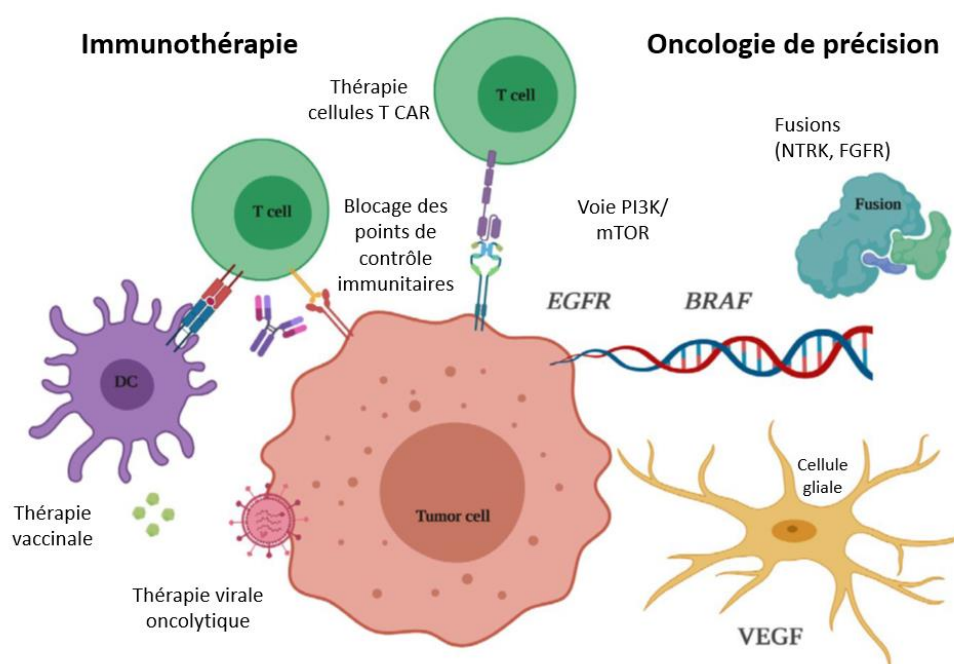


Figure 7 : Schéma des principales nouvelles thérapies en cours d'essais cliniques pour le traitement des glioblastomes. CAR, récepteur antigène chimérique ; DC, cellule dendritique ; EGFR, récepteur du facteur de croissance épidermique ; FGFR, récepteur des facteurs de croissance des fibroblastes ; mTOR, cible de la rapamycine chez les mammifères ; VEGF, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Tan et al., 2020).

- **Thérapies ciblées :** Il existe plusieurs approches de thérapie ciblée avec notamment les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de tyrosine kinase. Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) ont une meilleure pénétration de la BHE (Brown et al., 2018) et, contrairement aux chimiothérapies conventionnelles, vont pouvoir interférer avec des cibles moléculaires spécifiquement exprimées ou surexprimées par les cellules tumorales et les cellules endothéliales vasculaires à l'origine des néovaisseaux irrigant les tumeurs (stratégies anti-angiogéniques). Parmi les ITK, nous pouvons citer, le Sorafénib (VEGFR2-3, PDGFR β), l'Imatinib (Abl 1-2, VEGFR3, PDGFR), le Sunitinib (VEGDFR 1-2-3, PDGFR) ou encore le Crizotinib (Met, ALK) mais il en existe bien d'autres avec des spécificités particulières (Merlin, 2008; Nehoff et al., 2015).

Ces types de thérapies ciblées sont également utilisées en association avec la chimiothérapie conventionnelle ou la RT afin d'obtenir une action additive voire synergique (Merlin, 2008). Ainsi, le bevacizumab anticorps monoclonal anti-VEGF permettant d'inhiber l'angiogenèse, a été approuvé pour le traitement de différents cancers dont le GB récurrent (Ghiaseddin & Peters, 2015; Saran et al., 2016). Des essais cliniques de phase II ont montré que le bevacizumab améliore la survie des patients sans progression de la tumeur à 6 mois (Ghiaseddin & Peters, 2015). Ce traitement apporté en monothérapie lors de la récurrence des GB semble donc avoir une activité anti-tumorale. Néanmoins, il est associé à plusieurs effets secondaires graves tels que des événements hémorragiques et des accidents vasculaires cérébraux qui ont tous deux des conséquences potentiellement importantes dans les tumeurs intracrâniennes hautement vascularisées (Ghiaseddin & Peters, 2015; Saran et al., 2016). En outre, il existe peu de données sur l'utilisation concomitante du bevacizumab à la RT ou la chimiothérapie (TMZ) ou avant une autre intervention chirurgicale.

- **Immunothérapie** : ce mode de thérapie émergent fait suite aux importants progrès de la recherche fondamentale sur la compréhension de l'immunologie des tumeurs. Les modalités d'immunothérapie principalement proposées sont classées comme thérapies vaccinales, inhibiteurs des points de contrôle immunitaire, thérapies virales oncolytiques ou encore thérapies par récepteurs antigéniques chimériques des lymphocytes T.

Plusieurs essais d'inhibiteurs des points de contrôle immunitaire, ciblant principalement PD-1/PD-L1 et/ou CTLA-4, sont en cours dans le GB. Après plusieurs succès spectaculaires contre diverses tumeurs solides, les premiers résultats dans le GB sont malgré tout décevants comme en témoigne l'essai de phase III comparant les effets du nivolumab (anticorps monoclonal anti-PD-1) à ceux du bevacizumab dans le GB récurrent et qui n'a montré aucune amélioration de la survie des patients (Filley et al., 2017). Néanmoins, un essai clinique très récent redonne espoir en ce traitement. En effet, la simple modification des schémas thérapeutiques incluant une seule administration néoadjuvante du pembrolizumab (anticorps monoclonal anti-PD-1) a prolongé la survie médiane des patients atteints de GB récidivant, à savoir 417 jours contre 228,5 jours pour les patients recevant une dose adjuvante de pembrolizumab (Sampson et al., 2020).

La thérapie par les cellules T du récepteur antigénique chimérique (*CAR-T cells*) avec des cellules T génétiquement modifiées est un autre domaine d'investigation en plein essor. Les résultats préliminaires des premiers essais indiquent la présence d'une activité ciblée observée à travers l'augmentation de l'infiltration des lymphocytes T dans la tumeur (Tan et al., 2020). Pour le traitement du GB, les essais cliniques réalisés se sont attardés à présenter des cellules CAR-T ciblant 3 antigènes : EGFRvIII, ERBB2 (récepteur du facteur de croissance épidermique humain) et le récepteur IL2 de l'IL-13.

Pour conclure, l'immunothérapie n'est qu'au début de son développement. Le prochain défi sera donc d'identifier et d'anticiper les raisons pour lesquelles, chez certains patients atteints de tumeurs cérébrales hautement agressives, l'immunothérapie n'offre pas une réponse durable, voire même, la tumeur est complètement réfractaire au traitement (Riera-Domingo et al., 2020).

- **Thérapie basée sur l'utilisation de champs électriques alternatifs** : cette modalité unique qu'est la thérapie par champs de traitement des tumeurs (TTF, *Tumor Treating Fields*) implique l'administration de champs électriques alternatifs de faible intensité et de fréquence intermédiaire au niveau de la tumeur. Ces champs électriques alternatifs entraînent *a priori* la mort ou l'arrêt des cellules tumorales à division rapide en perturbant la formation du faisceau mitotique et la cytokinèse. Le traitement est administré via des électrodes fixées au cuir chevelu du patient, alimentées par une batterie portable. Pour maximiser l'efficacité de la thérapie, il est recommandé de porter l'appareil de stimulation au moins 18h par jour pendant 4 semaines (Shah et al., 2020). Le dispositif NovoTTF-100A a fait l'objet d'une étude clinique pour le traitement des GB nouvellement diagnostiqués en association avec une chimiothérapie (TMZ). Le TTF a alors présenté un bénéfice de la survie sans progression tumorale ainsi que de la survie globale. Un essai antérieur avait également permis de démontrer son efficacité dans un contexte de GB récurrents avec un taux de réponse de 14% contre 9,6% dans le cas d'une chimiothérapie seule même si le principal critère d'évaluation, la survie globale, n'a pas été atteint dans cette étude (Tan et al., 2020). Le TTF peut donc être considéré à l'heure actuelle comme une option thérapeutique possible chez les patients volontaires et éligibles (Tan et al., 2020).

I-2 Les métastases cérébrales

I-2.1 Données épidémiologiques

Les métastases cérébrales (MC), ou tumeurs secondaires, se développent dans le cerveau à partir d'un cancer périphérique. Elles sont très fréquentes puisqu'il est estimé que 10 à 40% des patients avec un cancer développeront des MC, en fonction de la nature de la tumeur primitive (Brown et al., 2018; Cacho-Díaz et al., 2019). Les MC sont les tumeurs intracrâniennes les plus fréquentes chez l'adulte et surviennent jusqu'à 3 à 10 fois plus fréquemment que les tumeurs cérébrales primitives (Balestrino et al., 2020). Plus communément, elles sont principalement issues du cancer du poumon (20 à 56 % des patients), du sein (5 à 20 %) et du mélanome cutané (7 à 16 %) (Balestrino et al., 2020; Brown et al., 2018; Shaw & Ball, 2013). Cependant, chez environ 15% des patients présentant une MC, la tumeur primaire ne peut pas être identifiée. Ce type de tumeur est alors dénommée métastase cérébrale de cancer primitif inconnu (Balestrino et al., 2020).

Les patients présentent en moyenne trois MC. Les patientes atteintes d'un cancer du sein présentent le nombre médian de MC le plus élevé pouvant aller jusqu'à 11. En revanche, les MC issues d'un cancer primitif inconnu sont la plupart du temps solitaires. La majorité des MC sont localisées dans les lobes frontaux (31,3%), le cervelet (24,6%), les lobes pariétaux (15,0%), temporaux (10,7%) et occipitaux (10,4%) (**Figure 8**) (Schroeder et al., 2020).

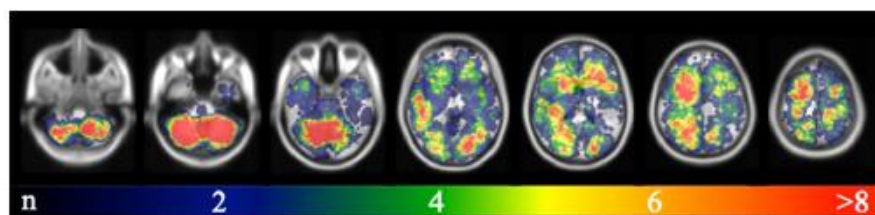


Figure 8 : Carte de probabilité des métastases cérébrales (MC) des coupes ventrales (gauche) à dorsales (droite) à partir de 369 patients inclus dans l'étude. La bande colorée indique le nombre de MC par zone sous forme d'échelle de couleur (bleu représente une seule métastase et rouge représente le nombre maximum de métastases) (Schroeder et al., 2020).

Le cervelet, qui ne représente que 12,6% du volume total du cerveau, présente un nombre disproportionné de MC. De plus, la distribution des MC varie en fonction de la tumeur primitive (Schroeder et al., 2020). Par le passé, il était important d'identifier la tumeur primaire afin de décider du traitement à mettre en place. Cependant, dans le cas d'une MC de cancer primitif inconnu, cette approche n'est pas adaptée mais les récents progrès réalisés ont permis de changer de stratégie. En effet, plusieurs études récentes soulignent

l'importance de l'identification des marqueurs moléculaires cibles au niveau de la métastase elle-même (Balestrino et al., 2020).

I-2.2 Diagnostic

Pour améliorer le diagnostic des MC, l'association européenne de Neuro-Oncologie (EANO : *European Association of Neuro-Oncology*) a publié en 2017 des recommandations (Soffietti et al., 2017). Ainsi, lorsque des symptômes et/ou signes neurologiques se développent chez un patient atteint d'un cancer solide connu, une MC doit toujours être suspectée. L'IRM est la méthode de choix pour identifier les MC avec notamment l'imagerie FLAIR pour visualiser la masse tumorale et l'imagerie T1 avec injection d'agent de contraste (gadolinium) pour voir s'il existe une rupture de BHE (**Figure 9**).

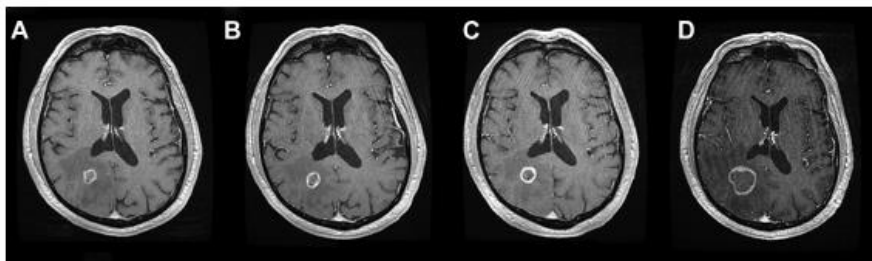


Figure 9 : Observation par imagerie d'une métastase cérébrale. Suivi de l'évolution d'une métastase cérébrale présente au niveau du lobe pariétal droit par IRM T1 post-injection de gadolinium : (A) avant traitement par radiothérapie stéréotaxique (1 seule fraction de 21 Gy), (B) 1 semaine, (C) 1 mois et (D) 1 an après traitement (Jakubovic et al., 2014).

Toutefois, les caractéristiques des MC en IRM restent peu spécifiques : elles se présentent typiquement comme des lésions bien limitées, avec un hyposignal en T1 et un hypersignal en T2, et sont associées à un rehaussement T1 post-gadolinium de manière nodulaire ou annulaire en raison d'une composante nécrotique fréquente (Delmaire et al., 2015).

En cas de tumeur primitive inconnue, l'IRM cérébrale sera complétée par d'autres examens, à savoir un examen physique approfondi (incluant testicules et examen cutané), une tomodensitométrie du thorax et de l'abdomen ainsi qu'une mammographie et/ou une échographie du sein. Si, ces examens sont négatifs, une TEP [^{18}F]-FDG (fluorodésoxyglucose) du corps entier est recommandée (Soffietti et al., 2017). De plus, une biopsie de la MC est fortement incitée afin d'identifier la tumeur primaire à partir de colorations histologiques permettant de déterminer la morphologie et l'ultrastructure des cellules tumorales qui doivent être similaires à celles de la tumeur primaire. De plus, l'étude de marqueurs

moléculaires spécifiques, à partir du tissu biopsié, peut être effectuée en vue d'identifier le site primaire inconnu (Balestrino et al., 2020).

La nouvelle classification de l'OMS sur les tumeurs du SNC, publiée en 2021, inclut maintenant les MC en distinguant 2 sous-types selon leur localisation : 1) les métastases au niveau du parenchyme cérébral et médullaire et 2) les métastases au niveau des méninges (Louis et al., 2021). Cependant, les marqueurs moléculaires et les altérations génétiques ne sont pas clairement établis. D'intenses recherches doivent être menées pour améliorer l'identification de marqueurs moléculaires spécifiques des MC, lesquels pourront être très utiles pour améliorer le diagnostic et/ou orienter les thérapies.

I-2.3 Pronostic

Le pronostic des patients atteints de MC est très variable. Cela dépend entre autres du type de la tumeur primitive et des facteurs pronostics associés (Chitti et al., 2020). La médiane de survie globale à la fin des années 1990 était de 3,4 mois avec des pourcentages de survie à 6 mois, 1 an et 2 ans qui étaient respectivement de 36%, 12% et 4%. De plus, la survie était statistiquement différente selon la modalité de traitement mise en place. Ainsi, la médiane de survie chez les patients traités uniquement par des stéroïdes était de 1,3 mois, de 3,6 mois chez les patients traités par RT et de 8,9 mois chez les patients ayant été soumis à une neurochirurgie suivie d'une RT (Lagerwaard et al., 1999). Actuellement, la médiane de survie globale est de 7,2 mois, mais celle-ci varie de 2,8 à 25,3 mois selon le diagnostic, c'est-à-dire le type de tumeur primitive et l'indice d'évaluation pronostique graduée (GPA, *Graded Prognostic Assessment*) (Chitti et al., 2020). Le GPA divise les patients en 4 groupes, en fonction de différents facteurs pronostiques cliniques pour lesquels la médiane de survie peut varier. Les 4 niveaux identifiés sont : 0 à 1, 1.5 à 2, 2.5 à 3 et de 3.5 à 4 (Chitti et al., 2020; Sperduto et al., 2012). Ces groupes sont obtenus en faisant la somme des scores (0, 0,5 et 1) des quatre facteurs suivants : l'âge, le score de performance de Karnofsky (KPS)¹, métastase extra-crânienne (présence ou non) et enfin le nombre de métastases (1 à 3 ou plus de 3) (Sperduto et al., 2008). Le GPA est alors un indice pronostique facilement réalisable en clinique. Un score de 4 est corrélé à un meilleur pronostic alors qu'un score de 0 est corrélé

¹ Le score KPS (*Karnofsky Performance Status*) est une échelle de 100 à 0 permettant d'apprécier le niveau d'indépendance d'un malade. 100 pour sain, 0 pour décédé. Un score de 50 équivaut à une dépendance totale du malade et exige une assistance considérable ainsi qu'un soin médical fréquent (Chitti et al., 2020).

au pronostic le plus sombre. La **Figure 10** rend bien compte de la survie pour chacun des groupes pronostiques en fonction de la tumeur primitive diagnostiquée (Sperduto et al., 2012).

Historiquement, la survie des patients atteints de MC étant uniformément faible, les recommandations de gestion des soins étaient assez fatalistes. Avec les progrès des thérapies systémiques et des technologies de RT telle la radiochirurgie stéréotaxique, cette attitude a été remplacée par la nécessité d'adapter la thérapie aux sous-groupes appropriés, en fonction de la survie attendue. (Sperduto et al., 2012).

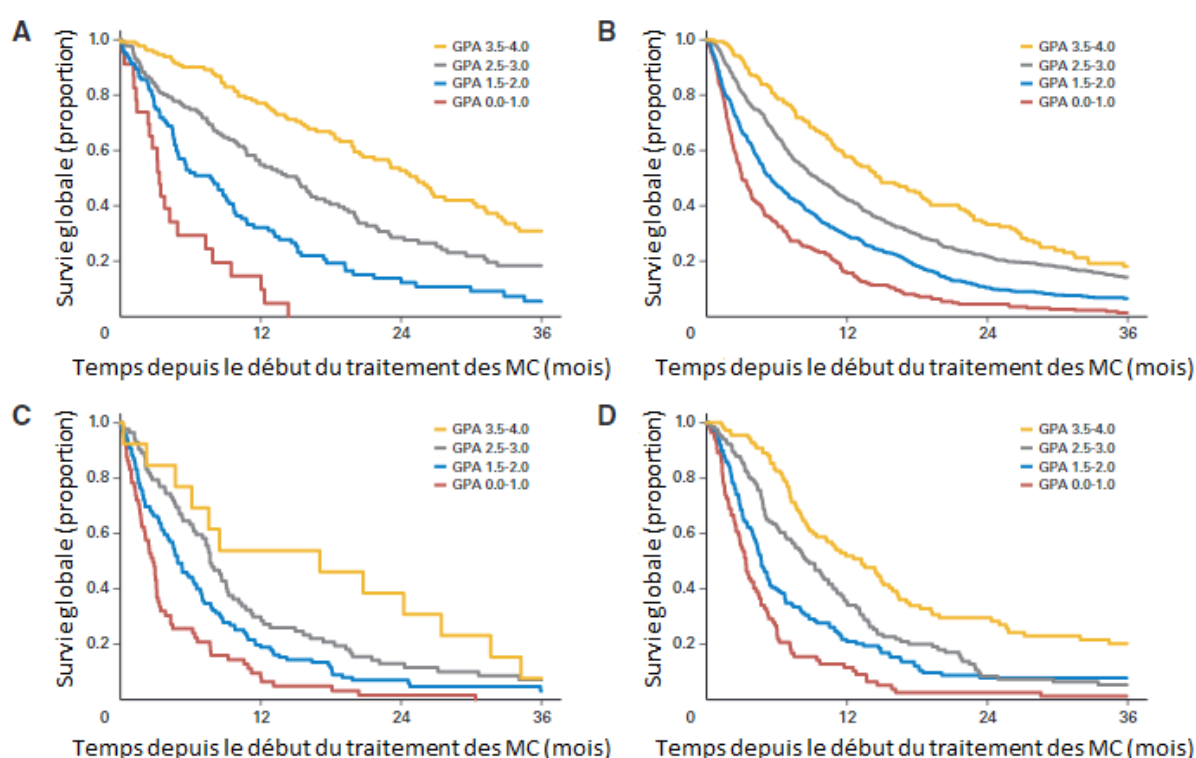


Figure 10 : *Survie des patients atteints de métastase cérébrale (MC) en fonction de l'indice GPA (Graded Prognostic Assessment) et du type de tumeur primitive diagnostiqué. Courbes de Kaplan-Meier pour les MC issues du (A) cancer du sein, (B) cancer du poumon non à petites cellules, (C) cancer du poumon à petites cellules, (D) mélanome (Sperduto et al., 2012).*

I-2.4 Prise en charge thérapeutique

La prise en charge des MC a évolué ces dernières années et fait à présent appel à des stratégies variables incluant des traitements plus ou moins agressifs. Ces traitements peuvent également être combinés afin de permettre un allongement de la survie et une amélioration de la qualité de vie des patients (Métellus et al., 2015). Le choix du traitement étant complexe pour cette population de patients, une approche multidisciplinaire est donc nécessaire afin

d'optimiser la gestion des soins. Cette réflexion multidisciplinaire prendra en compte les facteurs pronostiques établis, incluant l'état général du patient, le statut de la maladie extracérébrale ainsi que le tableau clinique et radiologique des MC (Brown et al., 2018; Métellus et al., 2015). Les modalités de traitement des MC comprennent une RT sur cerveau entier (95%), une chimiothérapie systémique (14%) ou intrathécale (9%), une résection chirurgicale (8%) ou encore une radiochirurgie (3%) (Cacho-Díaz et al., 2019).

L'analyse préalable des facteurs relatifs aux données liées à ces métastases (symptomatologie provoquée, menace neurologique, nombre et taille), à la situation du patient et à la maladie primitive viendra orienter le choix du schéma thérapeutique (**Figure 11**) (Métellus et al., 2015).

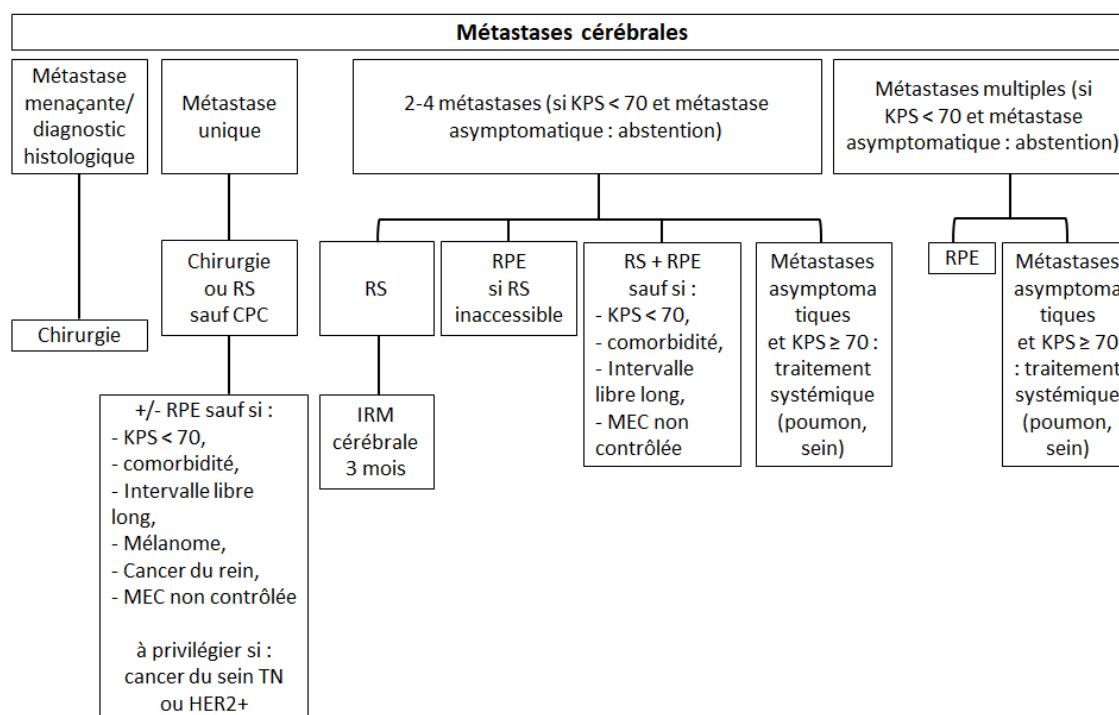


Figure 11 : Arbre décisionnel pour le traitement des métastases cérébrales. CPC : cancer bronchique à petites cellules. Abréviations : IRM=imagerie par résonance magnétique ; KPS= indice de Karnofsky ; MEC= maladie extracérébrale ; RPE= radiothérapie panencéphalique ; RS= radiothérapie en condition stéréotaxique ou radiochirurgie ; TN= triple négatif (Métellus et al., 2015).

I-2.4.1 Chirurgie

La chirurgie des MC est complexe car ces tumeurs sont généralement trop nombreuses et disséminées pour envisager une exérèse de chacune d'elles. Il a été démontré que la résection chirurgicale des MC apportait un bénéfice de survie pour les patients. Cependant, même après résection macroscopique totale confirmée par IRM, il existe 50% de risque de récurrence au niveau du lit tumoral (Brown et al., 2018). Dans le cas d'une MC unique, un

traitement local (chirurgie ou radiochirurgie) est préconisé dans la mesure où ce dernier améliore la probabilité de survie. Il n'y a pas d'étude randomisée comparant la chirurgie et la radiochirurgie, mais les résultats obtenus en matière de contrôle local apparaissent similaires. Le choix thérapeutique est alors guidé par l'opérabilité, la localisation et la taille de la métastase ainsi que la présence de symptômes et/ou œdème. En effet, s'il existe une MC menaçant l'état neurologique (œdème, syndrome d'hypertension intracrânienne), qu'elle soit accompagnée ou non d'autres MC, celle-ci doit autant que possible faire l'objet d'une chirurgie (Métellus et al., 2015).

I-2.4.2 Radiothérapie

En présence de MC multiples (plus de 4), bien que certaines équipes se réfèrent à la radiochirurgie, la RT panencéphalique est préférable dans la mesure où le risque de récurrence à court terme au niveau de l'encéphale est important (Métellus et al., 2015).

Plusieurs études ont rapporté dans l'ensemble un taux de réponse à la RT panencéphalique (WBRT) allant jusqu'à 60% des patients (Li et al., 2007). Néanmoins, l'amélioration neurologique associée pourrait être en partie attribuable aux stéroïdes. Malgré tout, la réduction du volume tumoral après RT sur cerveau entier est associée à une meilleure préservation de la fonction neurocognitive et à un allongement de la survie. Ainsi, la médiane de survie après WBRT seule chez des patients présentant de multiples MC varie de 3 à 6 mois avec 10 à 15% des patients survivants à 1 an (Tsao et al., 2018). Néanmoins, la question de la nécessité d'une WBRT après résection chirurgicale est moins bien définie car les essais randomisés ont rapporté un risque accru de rechute locale après la chirurgie seule, bien qu'il reste difficile d'établir si une surveillance active et une thérapie locale de sauvetage est aussi efficace qu'un traitement précoce supplémentaire sous forme de RT panencéphalique (Soffietti et al., 2017). Les nouvelles modalités de RT (RT stéréotaxique et radiochirurgie) font actuellement l'objet de plusieurs études cliniques et leurs intérêts dans la prise en charge des patients atteints de MC seront abordés dans la 2^{ème} partie de l'introduction.

I-2.4.3 Chimiothérapie et Thérapies ciblées

Une chimiothérapie conventionnelle est proposée comme traitement initial pour les patients présentant des MC issues de tumeurs chimiosensibles, telles que le cancer du poumon à petites cellules ou le cancer du sein, et plus particulièrement si ces métastases sont petites et/ou asymptomatiques (Métellus et al., 2015; Soffietti et al., 2017). Cependant, ce traitement systémique est envisageable sous condition d'un suivi par IRM cérébrale tous les 3 mois afin de vérifier la stabilité des lésions.

En revanche, les taux de réponse des MC aux thérapies ciblées semblent plus élevés que ceux observés après chimiothérapie. La majorité des thérapies ciblées qui ont été étudiées jusqu'à présent sont de petites molécules, telles que la première génération d'ITK (mentionnés précédemment, page 31), avec une pénétration limitée par la BHE car ce sont des substrats des transporteurs actifs. La modification du schéma d'administration avec par exemple le dosage pulsatile de l'erlotinib, inhibiteur de l'EGFR, pourrait permettre d'augmenter l'efficacité. En effet, deux facteurs limitent l'impact des thérapies ciblées disponibles sur les MC : (1) un manque imprévisible de concordance moléculaire entre la tumeur primaire et les MC et (2) l'émergence rapide d'une résistance secondaire (Soffietti et al., 2017). Néanmoins, le taux de réponse à l'erlotinib, au géfitinib et à l'osimertinib dans des cas de MC du cancer du poumon à mutation EGFR positive varie entre 50 et 80% lors d'essais prospectifs. Cela entraîne une augmentation de la survie sans progression (12 mois vs 6 mois) et de la survie globale (22 mois vs 15 mois) (Brown et al., 2018). L'immunothérapie semble également intéressante pour le traitement des MC comme le montre le pembrolizumab qui est actif dans les MC issues du mélanome avec une toxicité acceptable et des réponses durables. En effet, la survie à 2 ans était similaire à celle observée chez les patients sans MC traités avec des agents anti-PD1. Ainsi, des réponses cérébrales et extra-cérébrales concordantes appuient l'utilisation du pembrolizumab pour traiter les petites MC asymptomatiques (Kluger et al., 2018).

Concernant le traitement des MC de cancer primitif inconnu, il n'y a actuellement aucune preuve d'amélioration de survie des patients avec l'utilisation d'un traitement spécifique guidé par des tests moléculaires (Balestrino et al., 2020).

Ainsi, la RT panencéphalique initiale reste une approche standard pour les patients présentant plusieurs MC. En combinaison avec cette approche, la radiochirurgie est généralement réservée à la thérapie de sauvetage ou comme thérapie consolidatrice pour des lésions plus grandes ou des types histologiques radio-résistants tels que le mélanome ou le carcinome rénal (Brown et al., 2018).

En conclusion, la survie globale des patients atteints d'une tumeur cérébrale primitive, telle que le glioblastome, reste sombre avec une médiane de survie à 16 mois avec un traitement de pointe alliant résection chirurgicale, radiothérapie et chimiothérapie (De la Puente et al., 2018). Concernant le traitement des métastases cérébrales, la chirurgie présente rarement un intérêt du fait de la multitude de tumeurs secondaires et de leurs localisations. Pour ces raisons, la radiothérapie est le traitement de référence actuel dans la prise en charge des métastases cérébrales (Chitti et al., 2020).

II – La radiothérapie

Lors de ses travaux sur le phénomène du passage d'un courant électrique à travers un gaz sous basse pression, le physicien Wilhelm Röntgen découvre en 1895 les rayons X (Münsterberg, 1896). Cette découverte fut complétée 3 ans plus tard par la caractérisation de la radioactivité par Marie Curie et rapidement reconnue pour ses applications médicales potentielles (Snider & Mehta, 2016). En effet, les rayons X ont la capacité de traverser le corps tout en étant plus ou moins freinés selon les tissus traversés. Les applications directes sont la radioscopie et la radiographie dans le cadre du diagnostic médical. Ainsi, pendant la première guerre mondiale, Marie Curie met en place une flotte d'unités radiographiques mobiles pour permettre aux médecins militaires de localiser et retirer les éclats d'obus ou de *Shrapnel* des blessures des soldats sur la ligne de front (Thompson et al., 2018). Rapidement, l'utilisation des rayons X n'est plus uniquement dans un but diagnostic mais également à visée curative. Ainsi dès 1896, Victor Despeignes publiait le premier article concernant le traitement d'un cancer de l'estomac par les « rayons de Röntgen » (Gérard et al., 2010). La radiothérapie (RT), définie comme l'application thérapeutique des rayonnements ionisants (RI), est donc à présent largement utilisée que ce soit dans le traitement des tumeurs périphériques ou cérébrales. En France, l'observatoire national de la radiothérapie relève plus de 190 000

patients traités chaque année avec cette modalité, tous types de cancers confondus. Dans cette partie, nous nous attacherons tout d'abord à rappeler les généralités sur les RI et leurs interactions avec la matière. Ensuite, nous décrirons les bases des effets biologiques de l'irradiation par photons, notamment les réponses cellulaires et moléculaires. Puis, nous terminerons par la RT des tumeurs cérébrales (planification de traitement et avancées technologiques) en mettant en exergue son intérêt sur le pronostic des patients.

II-1 Les rayonnements ionisants

II-1.1 Généralités

Un rayonnement est dit « ionisant » lorsqu'il a assez d'énergie pour arracher des électrons d'un atome, libérant ainsi des ions. Il existe différents types de RI dont l'origine et le pouvoir de pénétration est différent (Feuvret et al., 2016) :

- Les **rayonnements cosmiques** qui proviennent de l'Espace et du Soleil ;
- Les **rayonnements particuliers** regroupant les rayonnements α , β , les électrons et les neutrons, sont émis lors de la désintégration d'atomes radioactifs. Le rayonnement α a une charge électrique positive puisque ces particules sont composées de deux protons et de deux neutrons. Sa portée dans l'air n'est que de quelques centimètres. Son pouvoir de pénétration est alors très faible et cette particule peut être arrêtée par la couche cornée de la peau voire même par une simple feuille de papier (**Figure 12**). Le rayonnement β est constitué d'électrons avec une charge électrique positive (β^+) ou négative (β^-). Même s'il est plus pénétrant que le rayonnement α , la pénétration du rayonnement β reste limitée. En effet, sa portée dans l'air est de quelques mètres et peut être arrêté par une feuille d'aluminium ou des matériaux de faible poids atomique (ex. plexiglas) (**Figure 12**). De plus, il ne pénètre pas en profondeur dans l'organisme si la source n'est pas en contact direct. Le rayonnement neutronique est lui, très pénétrant. Il traverse les vêtements et le corps et peut parcourir plusieurs centaines de mètres dans l'air. Les neutrons libres sont essentiellement présents dans les réacteurs nucléaires puisqu'ils sont le fruit de fissions ou fusions nucléaires. Ce rayonnement ayant une énergie variable, cela implique l'utilisation de différents types de matériaux pour l'arrêter tels qu'un écran de paraffine, de l'eau ou encore du béton (**Figure 12**).

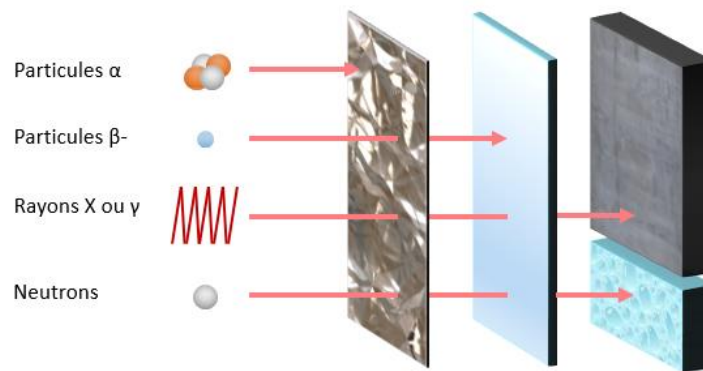


Figure 12 : Pouvoir de pénétration des différents types de rayonnements ionisants. Les particules α (noyaux d'hélium) sont arrêtées par une feuille d'aluminium ou de cuivre ; les particules β^- (électrons) sont arrêtées par du verre ou du plexiglas de quelques mm d'épaisseur ; les rayonnements X ou γ sont eux arrêtés par une forte épaisseur de béton, de plomb ou d'acier et les neutrons sont arrêtés par de l'eau ou de la paraffine.

- Les **rayonnements électromagnétiques**, également dénommés photons, qui correspondent aux rayonnements X et γ . Les photons X sont produits par un faisceau d'électrons envoyé sur une cible métallique. Cette rencontre va produire un réarrangement des électrons des atomes de métal et des rayons X. Les rayons γ sont quant à eux émis lors de la désintégration nucléaire d'atomes radioactifs tels que le Césium 137 ou l'Iridium 192. Les rayonnements électromagnétiques proviennent d'un champ électrique et d'un champ magnétique perpendiculaires oscillant en phase (**Figure 13 A**) (INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité). Ils sont caractérisés par une énergie, une longueur d'onde ainsi qu'une fréquence spécifique. L'énergie, exprimée en électron-volt (eV) correspond à l'énergie cinétique acquise par un électron accéléré lorsqu'il subit une différence de potentiel d'un volt (V).

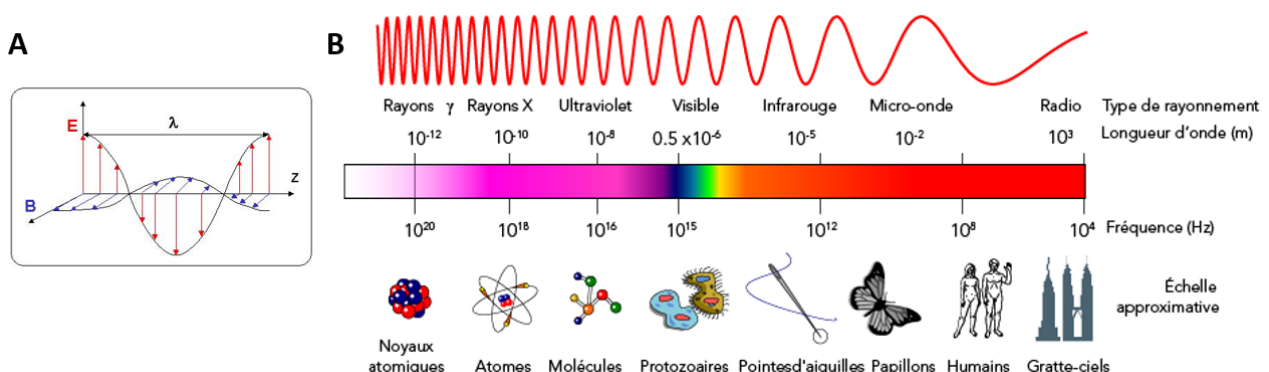


Figure 13 : Caractéristiques d'une onde électromagnétique. (A) Structure à un instant donné des champs électriques (noté E) et magnétique (noté B) de l'onde se propageant dans la direction Z. λ = distance parcourue par l'onde en une période. (B) Spectre des ondes électromagnétiques.

(<https://parlonssciences.ca/ressources-pedagogiques/documents-dinformation/telescopas-et-astronomie>)

Une onde électromagnétique est en fait une superposition de plusieurs ondes de fréquences différentes. La répartition de la puissance fournie en fonction de la fréquence est appelée le « spectre » de l'onde. Le spectre des ondes électromagnétiques englobe toute une gamme d'énergies, allant de la plus faible (les ondes radio) à la plus forte énergie (les rayons γ) (**Figure 13 B**). Les rayons X correspondent aux ondes électromagnétiques dont les fréquences sont comprises entre 10^{16} Hz et 10^{20} Hz avec des longueurs d'onde de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-12} m et dont l'énergie varie entre 40 et $4 \cdot 10^5$ eV.

Les rayons X et les rayons γ sont très pénétrants, ils peuvent traverser les vêtements et le corps et parcourir plusieurs centaines de mètres dans l'air. Ils peuvent alors être arrêtés ou atténués par des écrans constitués de matériaux denses tels que plusieurs épaisseurs de béton, d'acier ou de plomb (INRS) (**Figure 12**).

Dans la suite du manuscrit, nous nous intéresserons plus particulièrement aux rayons X puisque ce sont les RI les plus utilisés actuellement en RT conventionnelle.

II-1.2 Origine des rayons X et ses interactions avec la matière

Dans le cadre d'une RT, les rayons X sont actuellement produits par des tubes à rayons X ou des accélérateurs linéaires d'électrons. Le tube de Coolidge a été un véritable tremplin technologique dans la production de rayons X. En 1913, William Coolidge eut l'idée révolutionnaire de placer deux électrodes dans un tube à vide puis de chauffer la cathode (filament de tungstène) par le passage d'un courant électrique de basse tension. La cathode devient alors un émetteur d'électrons. Les électrons émis par la cathode sont accélérés par une différence de potentiel élevée (de 10 à 150 kV) en direction d'une cible : anode en métal (souvent du tungstène). L'anode initialement fixe a été perfectionnée en 1929 par Albert Bouwers en la rendant rotative « de façon à changer constamment le point d'émission qui, par la suite, n'a pas le temps de s'échauffer dangereusement » (**Figure 14**) (Behling, 2015).

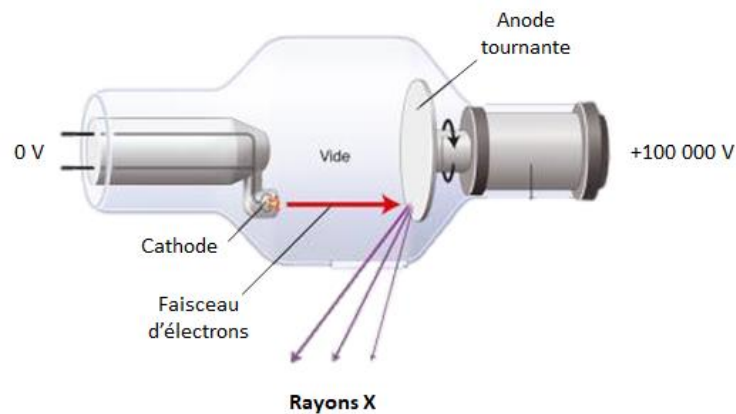


Figure 14 : Tube de Coolidge ou tube à rayons X. Un courant chauffe la cathode (filament de tungstène), émettant ainsi un faisceau d'électrons fortement accéléré vers l'anode. Ces électrons devenus très énergétiques vont interagir avec la cible et perdre leur énergie dont une partie est transformée en rayons X. Ce faisceau X peut alors être modulé par différentes collimations et filtrages.

A noter que les tubes à rayons X ont un très faible rendement puisque seul 1% de l'énergie cinétique des électrons est transformé en rayons X, les 99% restants sont convertis sous forme de chaleur, d'où l'intérêt de l'anode tournante afin de refroidir le système.

Les rayons X sont ainsi produits de façon multidirectionnelle. Pour limiter cette diffusion et optimiser la production pour ne cibler que la zone d'intérêt (le patient ou un organe cible), des filtres en plomb et un blindage en béryllium sont utilisés tout en laissant une fenêtre dans la direction de la cible. Ainsi, les rayons X émis dans une autre direction que celle du patient sont extrêmement atténués. Lorsqu'ils rencontrent la matière, les rayons X sont soumis à un phénomène d'atténuation qui peut se présenter sous deux formes : l'effet photoélectrique et l'effet Compton.

- **L'effet photoélectrique** se caractérise par un arrêt dans la matière du rayonnement incident. Toute l'énergie du rayon X incident se transmet à un électron périphérique sous forme d'énergie cinétique, cet électron est alors éjecté de l'orbite du cortège électronique de l'atome. Un électron placé sur une couche orbitale supérieure viendra alors combler la place de l'électron éjecté et conduira à l'émission d'un rayon X de faible énergie (**Figure 15 A**).

- **L'effet Compton** (ou appelé effet de diffusion) se produit lorsque le photon X interagit avec un électron périphérique situé sur une orbite externe du cortège électronique. Seule une partie de l'énergie du photon X incident est communiquée à l'électron qui est alors éjecté de l'atome. Le rayon X est dévié mais continue sa route avec une énergie plus faible et est dénommé photon diffusé (**Figure 15 B**). L'énergie incidente se trouve donc répartie entre l'électron éjecté et le photon X résiduel diffusé.

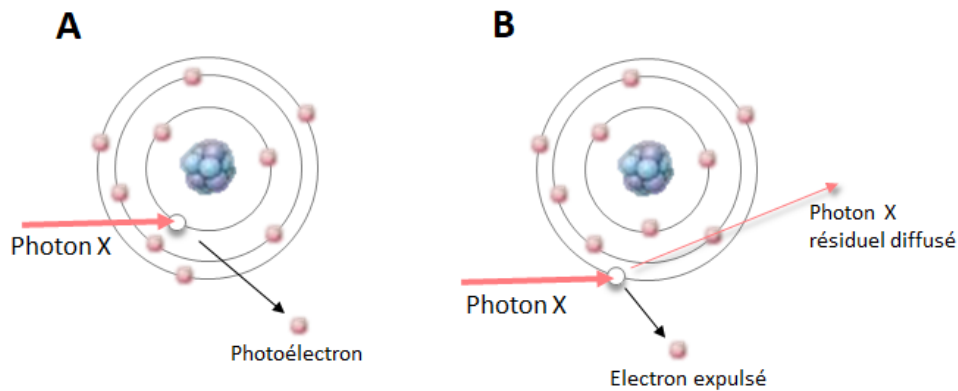


Figure 15 : Schéma des effets photoélectriques et Compton. (A) Effet photoélectrique : un photon X frappe un électron d'une couche profonde de l'atome, puis l'électron absorbe toute l'énergie du photon et est éjecté. (B) Effet Compton : un photon X frappe un électron du cortège électronique, ce qui entraîne l'expulsion de l'électron et l'ionisation de l'atome. Le photon X résiduel est d'énergie plus faible et subit une déviation de sa trajectoire.

L'atténuation des rayons X dépend de l'absorption photoélectrique (prédominante aux faibles énergies < 50 keV) et de l'atténuation par effet Compton (prédominant aux fortes énergies > 50 keV). L'atténuation des rayons X chez le patient, se fera donc préférentiellement par effet Compton. La radiothérapie permet de délivrer, sur un volume cible, des photons X d'énergies variables (allant de 4 à 25 MV). La dose absorbée est l'énergie à la matière [Joule (J)] par unité de masse (kg). En pratique, l'unité J/kg a été remplacée par le Gray (Gy) (Feuvret et al., 2016) qui est maintenant l'unité du système internationale des doses physiques utilisées en RT.

II-2 Effets biologiques radio-induits

Les rayons X peuvent interagir différemment avec les cellules selon leur énergie :

- soit par ionisation : l'énergie du photon est supérieure à l'énergie de liaison des électrons ($E > 30$ eV), un électron est alors arraché au cortège électronique et il y a donc ionisation de l'atome.
- soit par excitation : si l'énergie n'est pas suffisante pour arracher un électron, elle peut l'être cependant suffisamment pour faire passer un électron du niveau énergétique fondamental à un niveau énergétique supérieur, l'atome est dit excité.
- soit par transfert thermique : si l'énergie n'est pas suffisante pour exciter l'atome, le photon X peut cependant augmenter son énergie cinétique de translation, de rotation et de vibration et ainsi libérer de la chaleur.

Les excitations et principalement les ionisations sont les phénomènes physiques à l'origine des lésions biologiques radio-induites. En effet, l'ionisation des cellules va conduire

aux effets directs des rayons X, à savoir des dommages aux molécules, principalement des cassures de l'ADN. En revanche, l'excitation des cellules déclenche une succession de réactions physico-chimiques aboutissant à la formation de radicaux libres qui provoqueront des dommages cellulaires dont des dommages à l'ADN, ce sont les effets indirects des rayons X (Choong et al., 2014; Feuvret et al., 2016). Qu'ils soient provoqués par des effets directs ou indirects des RI, les dommages à l'ADN vont déclencher une cascade de réponses moléculaires et cellulaires aboutissant à la survie ou à la mort de la cellule. Outre ces processus radiobiologiques s'exerçant sur les cellules directement exposées à l'irradiation, phénomène dénommé **effets ciblés** des RI, d'autres concepts sont apparus ces dernières années suggérant que des cellules non-exposées aux RI peuvent tout de même présenter des lésions radio-induites. Il s'agit des **effets non-ciblés** des rayons X qui regroupent les effets *bystander*, les effets *abscopal* et les effets *inter-individuel* (Selzer & Hebar, 2012) (**Figure 16**).

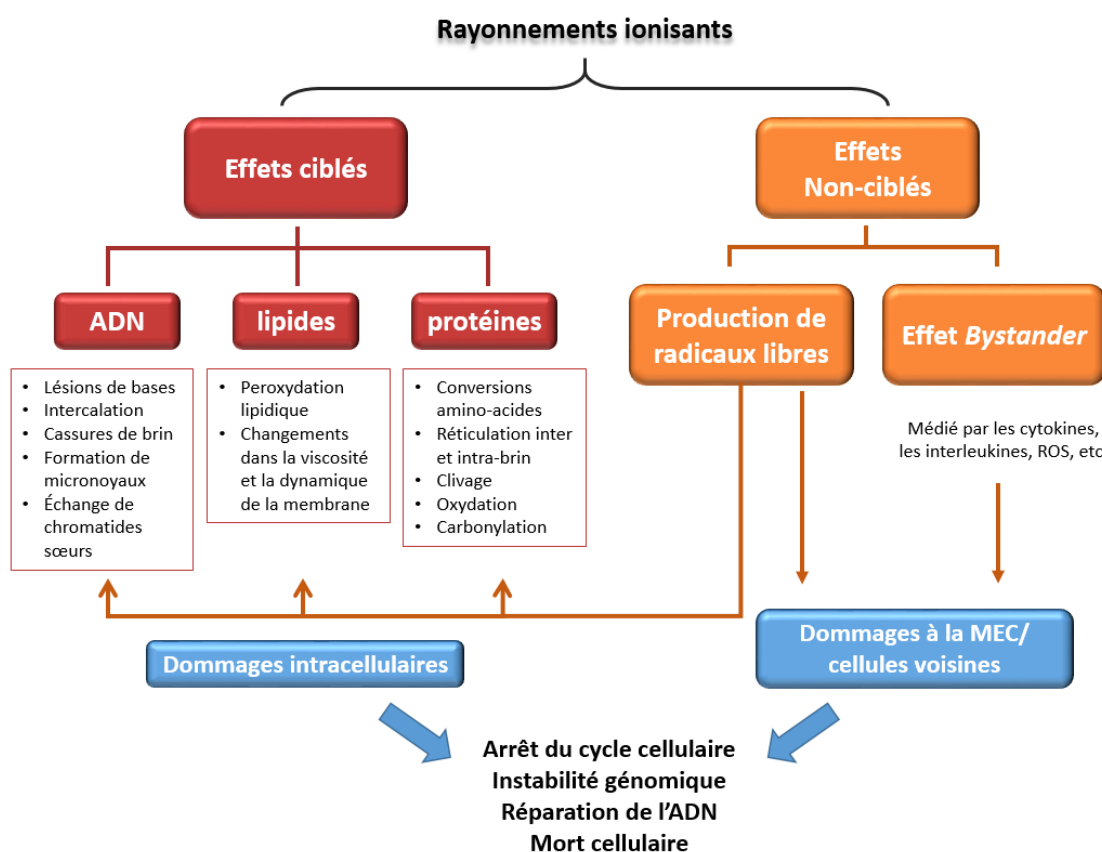


Figure 16 : Effets biologiques cellulaires radio-induits. Les rayonnements ionisants (RI) peuvent avoir des effets directs (effets ciblés) en entraînant des dommages des macromolécules telles que l'ADN, les lipides et les protéines. Les RI vont également provoquer des effets indirects (effets non-ciblés) qui vont générer des radicaux libres affectant secondairement les macromolécules des cellules irradiées et aussi des effets bystander correspondant à des dommages radio-induits sur les cellules avoisinantes qui n'ont pas été directement exposées à l'irradiation. MEC= matrice extracellulaire. Quel que soit le type d'effet des RI, cela va aboutir à un arrêt du cycle cellulaire, une instabilité génomique, une réparation de l'ADN si possible, ou conduire à la mort cellulaire (adapté d'après Nambiar et al., 2011).

II-2.1 Les effets ciblés

L'absorption des RI par les cellules irradiées peut engendrer deux types de réactions radiochimiques distinctes. D'une part, cela peut perturber directement les structures anatomiques en perturbant les liaisons chimiques des différents composants cellulaires tels que les membranes, les lipides, les protéines et surtout l'ADN. D'autre part, l'irradiation peut agir de façon indirecte via la radiolyse de l'eau qui va générer des espèces chimiques réactives pouvant à leur tour infliger des dommages macromoléculaires (Azzam, et al., 2012).

Un rayon X a statistiquement une probabilité plus importante de rencontrer une des nombreuses molécules d'eau présente dans la cellule qu'une macromolécule. La radiolyse de l'eau représente donc le principal processus de lésions ciblées et va provoquer la genèse spontanée d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet}$), l'oxygène singulet ($O^{\bullet}$), les radicaux hydroxyles ($OH^{\bullet}$) et peroxydes ($ROO^{\bullet}$) ainsi que l'oxyde nitrique ($NO^{\bullet}$). Ces ROS peuvent ensuite interagir entre eux et avec d'autres molécules, généralement des molécules d'eau, entraînant en cascade l'augmentation du nombre et de la densité des radicaux libres. Cela va perturber le système redox de la cellule et endommager l'ADN, les protéines et les lipides (Nambiar et al., 2011; Pieters et al., 2017).

Ensemble, les effets directs et indirects des RI déclenchent une série d'évènements biochimiques et moléculaires pouvant réparer les dommages ou aboutir à des changements physiologiques permanents voire à la mort cellulaire (**Figure 16**) (Azzam et al., 2012).

L'ADN est connu pour être la principale cible des dommages induits par les RI au sein d'une cellule. Ces derniers provoquent un éventail de changements tels que des mutations, lésions de bases, réticulations ou encore cassures simple brin (SSB : *single-strand breaks*) et double brin (DSB : *double-strand breaks*) (Nambiar et al., 2011). La cellule dispose de différentes « sondes » lui permettant de détecter les dommages à l'ADN. Ces sondes sont des protéines appelées « senseurs » telles que PARP, MRN ou RPA. Selon le type de dommages à l'ADN détecté, ces protéines vont recruter des protéines transductrices des dommages à l'ADN (ATM ou ATR) qui pourront alors orienter la cellule vers un arrêt du cycle cellulaire pour permettre l'activation des voies de réparation de l'ADN spécifiques. Selon la qualité des réparations de l'ADN, cela entraînera une restauration de l'information génétique, une

transcription altérée ou bien la cellule s'orientera vers une mort cellulaire (Hühn et al., 2013) (**Figure 17**).

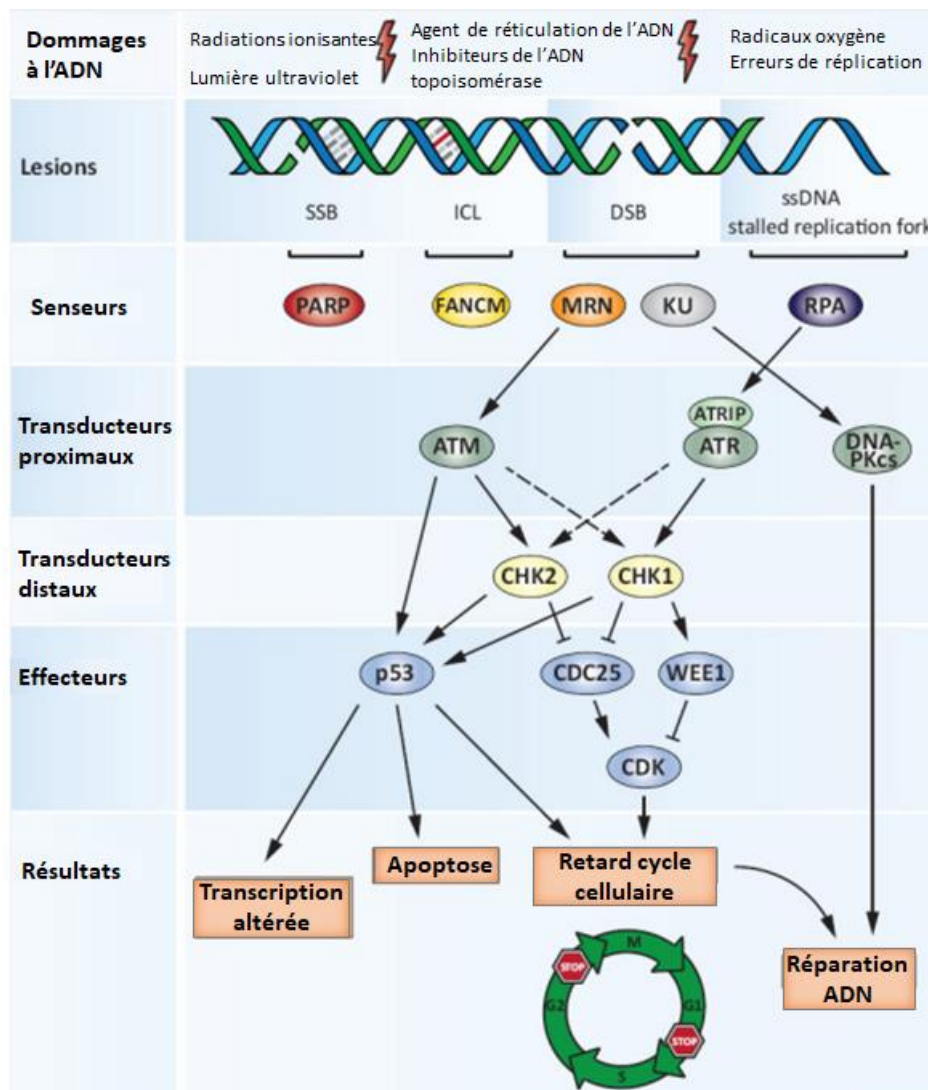


Figure 17 : Voies de signalisation des dommages à l'ADN radio-induits et conséquences sur la cellule. Abréviations : SSB (single-strand breaks)=cassure simple brin de l'ADN ; DSB (double-strand breaks) = cassure double brin ; ICL (Interstrand crosslink) = réticulation interbrins ; ssDNA (single stranded DNA) = ADN simple brin exposé au niveau des fourches de réplication (Hühn et al., 2013).

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'implication des ROS, générées par la radiolyse de l'eau, dans l'arrêt du cycle cellulaire (**Figure 18**). En effet, l'exposition aux RI altère la progression du cycle cellulaire. Sauf exception, toutes les cellules marquent un arrêt en phase G2 (environ 1h/Gy), la plupart des cellules marquent un arrêt en phase S et enfin les cellules exprimant une protéine p53 normale marquent également un arrêt en phase G1. Ces arrêts aux points de contrôles du cycle cellulaire sont liés à l'activation d'un signal cellulaire induit par la reconnaissance des lésions radio-induites de l'ADN et vont permettre aux mécanismes

de réparation d'œuvrer afin de prévenir les anomalies de réplication (transition G1-S) ou les aberrations chromosomiques pendant la mitose (transition G2-M) (Favaudon, 2000).

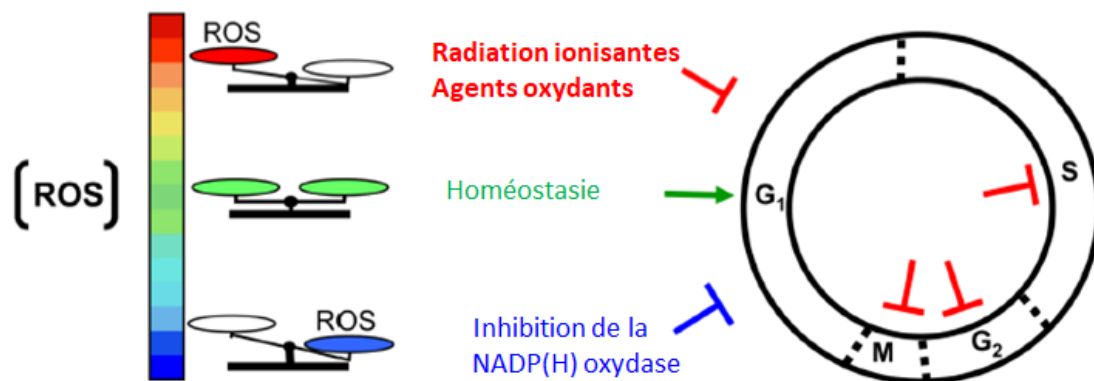


Figure 18 : Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la régulation de la prolifération cellulaire. Une concentration plus élevée de ROS suite à une irradiation ou plus basse que les taux normaux peuvent induire des arrêts à différentes phases du cycle cellulaire (Azzam et al., 2012).

Pour assurer l'intégrité génomique et le bon fonctionnement cellulaire, les cellules sont pourvues de différents systèmes de réparation de l'ADN : 3 principaux mécanismes sont capables de réparer des cassures simple brin (SSB) et 2 complexes protéiques majeurs sont impliqués dans les réparations des cassures double brin de l'ADN (DSB). En effet, des modifications mineures de l'ADN telles que des bases oxydées ou alkylées, des adduits de petites bases et des cassures simples brin (SSB) sont restaurées grâce au mécanisme de réparation par excision de base (BER, *base excision repair*) (**Figure 19**). Les lésions de base déformant l'hélice de l'ADN (réticulation) sont réparées par le système de réparation par excision de nucléotides (NER, *nucleotide excision repair*) (**Figure 19**). La structure hélicoïdale de l'ADN peut également être affectée par les mésappariements de bases. Le système de réparation des mésappariements (MMR, *mismatch repair*) reconnaît et traite les nucléotides mal incorporés ainsi que les boucles d'insertion ou de délétion qui surviennent lors de la recombinaison ou d'erreurs de l'ADN polymérase. Enfin, en cas de cassure double brin de l'ADN (DSB), deux mécanismes de réparation sont préférentiellement mis à contribution : la recombinaison homologue (HR, *homologous repair*) utilisant le chromosome homologue non-endommagé pour assurer une réparation fidèle de la lésion et la réparation par jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ, *nonhomologous end-joining*) provoquant une recombinaison non-homologue dont le principe est d'établir une jonction entre les extrémités de la cassure (**Figure 19**) (Hühn et al., 2013).

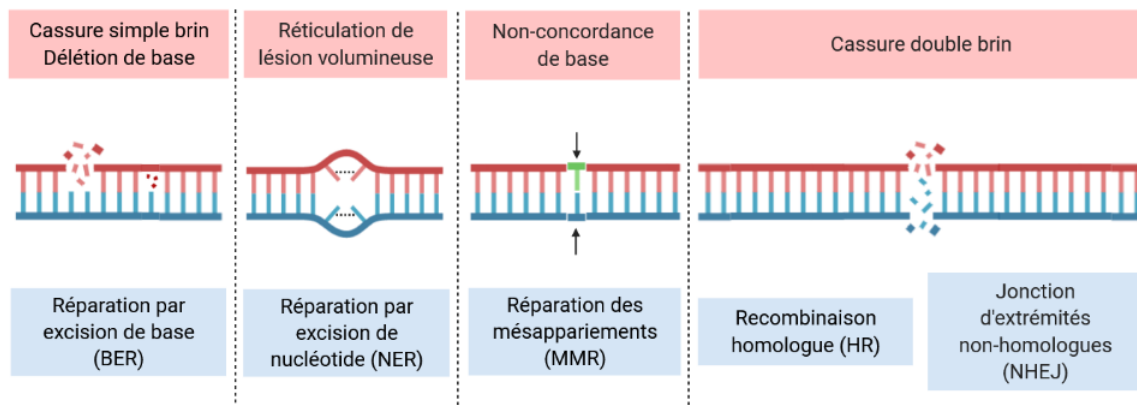


Figure 19 : Les différents mécanismes de réparation des lésions à l'ADN. Les systèmes de réparation de l'ADN impliqués dans les cassures simple brin sont BER (base excision repair) = réparation par excision de base ; NER (nucleotide excision repair) = réparation par excision de nucléotide ; MMR (mismatch repair) = réparation des mésappariements et les mécanismes activés lors de cassures double brin sont HR (homologous repair) = recombinaison homologue et NHEJ (nonhomologous end-joining) = jonction d'extrémités non-homologues.

Cependant, une forte irradiation est capable d'induire de nombreuses et importantes lésions à l'ADN de telle sorte que le système de réparation est dépassé. Les réparations incomplètes peuvent alors conduire à la formation de cassures double brin nombreuses et complexes qui sont considérées comme les lésions à l'ADN les plus critiques (Pieters et al., 2017; Selzer & Hebar, 2012). Chez l'Homme, la majorité des cassures double brin sont réparées par le complexe protéique NHEJ qui est sujet aux erreurs (réparation non-fidèle) et représentent donc des lésions mutagènes importantes induites par les RI.

Par conséquent, les dommages à l'ADN non-réparés entraînent soit la survie des cellules présentant alors des instabilités génomiques, à l'origine de développement de cancer radio-induit secondaire, ou bien la mort des cellules (**Figure 20**) (Orth et al., 2014; Pieters et al., 2017). A noter qu'une cellule est plus sensible aux RI lorsqu'elle subit une mitose, en revanche les cellules en phase G0 et en fin de phase S sont relativement radio-résistantes (Favaudon, 2000; Pieters et al., 2017), ce qui souligne l'importance du fractionnement des doses d'irradiation. L'hyper-radiosensibilité observée lors du passage en mitose semble s'expliquer par un défaut de réparation des cassures double brin de l'ADN (Favaudon, 2000).

La prédiction de l'efficacité thérapeutique ainsi que des effets secondaires de l'exposition aux RI repose sur l'établissement de relations dose/effet entre la dose d'irradiation et les réactions tissulaires induites. Les effets biologiques induits par des doses moyennes (0,5-5Gy) à élevées (5-15Gy) sont relativement bien connus et sont subdivisés en : (1) effets non stochastiques (ou effets déterministes ou de réaction tissulaire), se produisant obligatoirement et dont la gravité augmente avec la dose. Ils sont directement liés aux effets

ciblés décrits ci-dessus ; (2) les effets stochastiques qui sont aléatoires et résultent généralement de réparations non-fidèles des dommages à l'ADN conduisant alors à des mutations génétiques. Ces effets stochastiques représentent donc les risques génétiques transmis à la descendance ainsi que les risques de cancer radio-induit pouvant se déclarer des dizaines d'années après l'irradiation. De plus, il n'y a pas de seuil pour ces effets mais seulement une probabilité d'occurrence (Pouget et al., 2018).

Ainsi, l'exposition aux RI peut, selon les doses et le type cellulaire considéré, produire une large gamme d'effets réversibles ou irréversibles, à échéance immédiate ou à très long terme. Cela peut se traduire par une altération de la progression dans le cycle cellulaire, des mutations, une polyploïdisation et/ou un syndrome d'instabilité génomique, des aberrations chromosomiques et plus généralement la perte de la capacité proliférative, accompagnée ou non d'une lyse cellulaire (**Figure 20**). La lyse cellulaire ou la perte de la capacité proliférative (mort clonogénique ou reproductive) définit la mort cellulaire proprement dite. C'est l'effet recherché pour l'éradication des tumeurs par RT (Favaudon, 2000). Suite à l'irradiation, différents types de mort cellulaire peuvent être observés comme représenté sur la **Figure 20**.

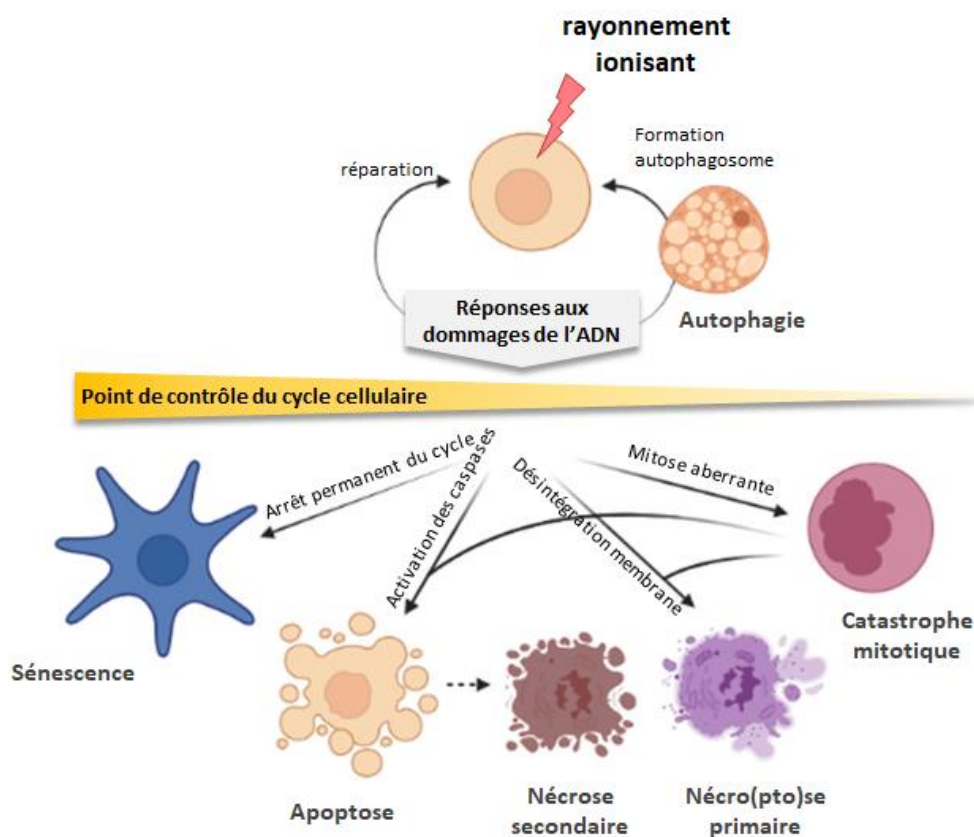


Figure 20 : Représentation schématique des principaux types de mort cellulaire observés après exposition aux rayonnements ionisants (d'après Orth et al., 2014).

L'irradiation cellulaire peut induire une **sénescence cellulaire** qui est un état d'arrêt permanent du cycle cellulaire provoqué par des dommages à l'ADN (**Figure 20**) (Nardella et al., 2011; Orth et al., 2014). Les cellules sénescentes sont métaboliquement actives mais ne progressent pas dans le cycle cellulaire. Cependant, elles libèrent des facteurs pouvant soutenir et inhiber la progression tumorale en influençant à la fois la prolifération des cellules voisines et les réponses immunitaires anti tumorales. **L'apoptose** est une mort cellulaire programmée, caractérisée par une condensation/fragmentation de la chromatine, un rétrécissement cellulaire et un gonflement des membranes cellulaires (**Figure 20**). L'apoptose peut être déclenchée en réponse à l'irradiation. Le clivage de plusieurs substrats de caspases dans la cellule entraîne la fragmentation de la chromatine, la destruction des organites et la désintégration cellulaire (Orth et al., 2014). Cependant, lorsque l'activation des caspases est bloquée, les dommages à l'ADN peuvent induire une autre forme de mort cellulaire appelée **nécroptose** (**Figure 20**). De fortes doses de RI peuvent également provoquer une **nécrose** qui est une mort prématurée et non programmée des cellules. Elle est caractérisée par une perméabilisation de la membrane conduisant à un relargage de protéines et organites à l'extérieur de la cellule, activant une réponse inflammatoire (Orth et al., 2014). En cas de progression aberrante du cycle cellulaire avant l'entrée en mitose ou pendant la division cellulaire elle-même, les cellules peuvent subir une « catastrophe mitotique », également dénommée **mort mitotique**. Elle se caractérise par la formation d'énormes cellules à noyaux multiples ainsi que des centrosomes hyperamplifiés. Ce mécanisme constitue le principal type de mort cellulaire radio-induite et prédomine dans les cellules dont les points de contrôle du cycle cellulaire sont défectueux. Néanmoins, les cellules ayant subi une catastrophe mitotique peuvent survivre plusieurs jours, passer en sénescence ou mourir par apoptose et/ou nécrose du fait de leur degré élevé d'aneuploïdie (Orth et al., 2014).

Enfin, **l'autophagie** est un état cellulaire qui est actuellement discuté en tant que mécanisme de mort et de survie cellulaire (**Figure 20**). En effet, elle se caractérise par la séquestration de protéines et/ou d'organites au sein d'énormes vésicules autophagiques : les autophagosomes. La fusion de ces vésicules avec les lysosomes conduit à la formation d'autophagolysosomes et à la dégradation de leur contenu fournissant ainsi du matériel pour la synthèse et la régénération *de novo* (Orth et al., 2014).

II-2.2 Les effets non-ciblés

L'évolution des techniques, et notamment la mise au point des microfaisceaux à particule unique, a permis de démontrer l'existence d'effets dits non-ciblés qui définissent de façon générale les dommages d'un tissu ou d'une cellule qui n'a pas été irradié directement (Selzer & Hebar, 2012).

Les effets non-ciblés sont subdivisés en 3 catégories (Wang et al., 2018) :

- Les effets *bystander* : altérations biologiques retrouvées dans les cellules non-irradiées situées à l'intérieur ou à proximité du volume irradié (**Figure 21**, partie gauche). Ces phénomènes sont aussi dénommés les effets locaux radio-induits ;
- L'effet *abscopal* : émission de signaux par les cellules irradiées pouvant affecter des tissus non-irradiés à distance et en dehors du volume irradié (**Figure 21**, partie droite). Ces phénomènes sont également appelés les effets distaux radio-induits ;
- Et plus récemment, le concept de l'effet inter-individu a émergé et propose qu'un être vivant non-irradié mais vivant au contact d'un congénère irradié pourrait présenter des dommages radio-induits.

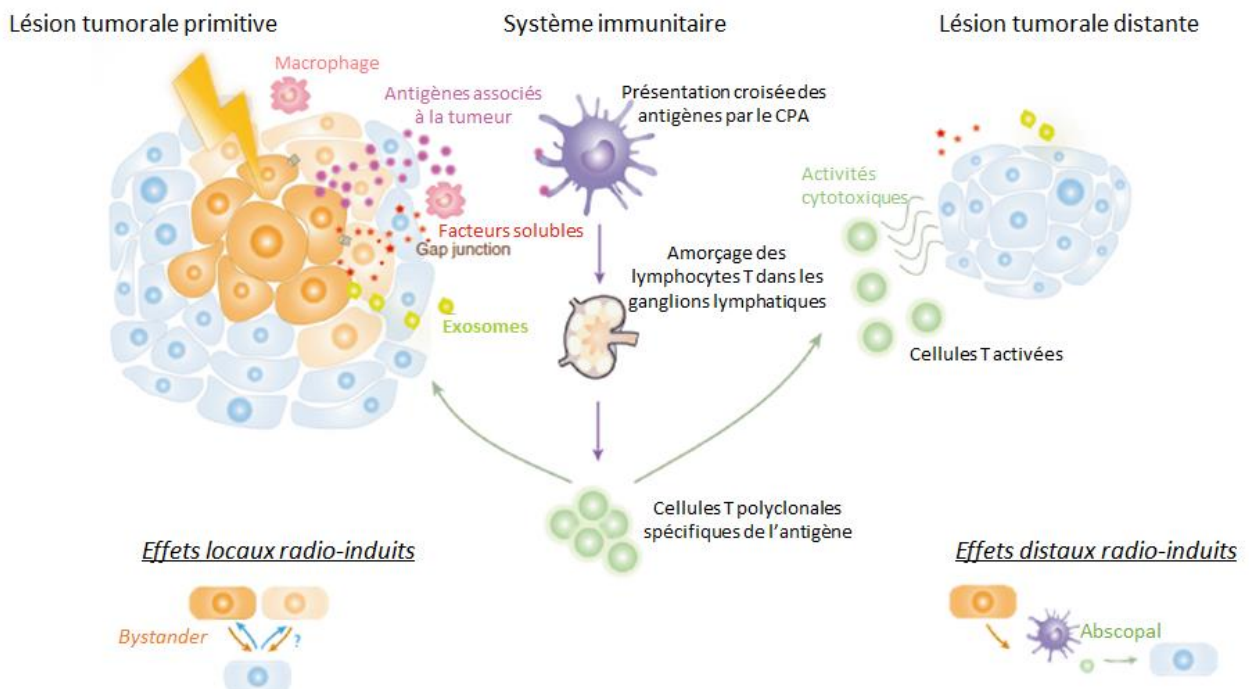


Figure 21 : Aperçu schématique des effets locaux (effet bystander) et distaux (effets abscopal) induits par l'irradiation tumorale. Les rayonnements ionisants agissent directement au cœur de la lésion primitive irradiée, laquelle libère des signaux via la libération de facteurs solubles et les jonctions communicantes et entraîne des effets proximaux entre cellules ciblées à forte dose (en orange foncé), ou faible dose (en orange clair) et les cellules non-irradiées (en bleu). Ce sont les effets dits bystander (partie gauche de la figure). L'irradiation induit la mort cellulaire immunogène dans les cellules cancéreuses et la libération subséquente d'antigènes associés aux tumeurs (points violet clair), activant ainsi le système immunitaire, en

particulier les cellules présentatrices d'antigène (CPA, en violet) et les macrophages (en rose). Après présentation aux lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques, les cellules T polyclonales spécifiques de l'antigène sont amorcées pour cibler les tumeurs ciblées dans le champ irradié ainsi que celles à distance conduisant ainsi à des effets radio-induits à distance, phénomène appelé effet abscopal (partie droite de la figure). Récemment, il a été proposé que les exosomes (en vert) soient des médiateurs des effets non-ciblés des RI se produisant localement ou à distance (Daguenet et al., 2020).

Les effets *bystander* ou *abscopal*, sont connus pour se produire à la fois à de faibles et fortes doses de RI et leur existence a été démontrée à la fois *in vitro* et *in vivo* (Fernandez-Palomo et al., 2015). Ces effets non-ciblés sont potentiellement délétères ou au contraire bénéfiques. Et bien qu'ils ne représentent qu'une infime part du mode d'action de la RT, la compréhension de leurs mécanismes est capitale afin de pouvoir les exploiter d'un point de vue thérapeutique (Sun et al., 2014).

II-2.2.1 L'effet bystander

Le rapport du comité scientifique des Nations Unies de 2006 sur les effets des RI définit l'effet *bystander* comme étant « la capacité des cellules irradiées à transmettre les dommages radio-induits aux cellules voisines non-directement irradiées » (Pouget et al., 2018). Cet effet pourrait simplement être décrit comme un effet de communication locale, depuis le site d'irradiation jusqu'à quelques millimètres, relayé par la sécrétion de facteurs solubles ou par la signalisation intercellulaire via des jonctions communicantes mais également à travers un réseau impliquant les cellules inflammatoires du microenvironnement (Daguenet et al., 2020). Cet effet est d'autant plus important dans le cas d'une irradiation à faible dose (<100 mGy) (Selzer & Hebar, 2012).

En 1992, Nagasawa et Little publie une étude-clef dans la compréhension des effets non-ciblés de l'irradiation. Ils ont ainsi démontré qu'en irradiant à très faible dose (0,31 mGy) 1% des noyaux cellulaires avec un unique faisceau de particules α , plus de 30% des cellules totales présentaient une augmentation significative des échanges de chromatides sœurs et donc des aberrations chromosomiques. Une dose d'environ 2 Gy était nécessaire pour produire un effet similaire par rayons X. Les auteurs de cette étude alertent alors sur l'importance de comprendre ce phénomène et ses implications dans l'estimation des risques de telles expositions et donc des normes d'exposition pour la population générale (Nagasawa & Little, 1992).

Plusieurs études ont mis en évidence les multiples rôles des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS, *reactive nitrogen species*) dans les effets *bystander*. En effet, les ROS et les RNS seraient à l'origine de l'activation de voies de signalisation telles que MAPK ou PI3K/AKT et de la transmission du signal aux cellules voisines. Plus précisément, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), moins réactifs que les autres ROS mais plus diffusibles, ont leur concentration qui augmente dans les cellules irradiées jusqu'à 60h après irradiation et jusqu'à 30h dans les cellules non-irradiées. De plus, une accumulation intracellulaire de monoxyde d'azote (NO, *nitric oxide*) est observée après irradiation et serait responsable d'un signal *bystander* persistant lors de co-cultures de cellules irradiées et non-irradiées. La production de NO serait modulée par les cellules irradiées provoquant le relargage du cytochrome c, via un mécanisme dépendant de la NO-synthase inductible (iNOS). La mitochondrie, où se trouve le gène COX2, est un potentiel générateur de radicaux libres tels que le NO et joue un rôle important dans l'amplification des ROS dans les cellules non-irradiées. En outre, l'absence d'effets *bystander* dans des cellules HeLa dépourvues d'ADN mitochondrial soutient l'idée que la fonction mitochondriale est indispensable à la médiation de la signalisation de l'effet *bystander* (Sun et al., 2014). A titre d'exemple, cette signalisation intracellulaire de l'effet *bystander* a également été démontrée dans des cellules tumorales de gliomes (lignée T98G) et impliquerait le NO et la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (**Figure 22**). En effet, les auteurs montrent une production accrue de NO dans les cellules irradiées mais aussi dans les cellules non-irradiées. De plus, les effets *bystander* étaient significativement atténués par l'inhibition du NO mais nettement augmentés par les inhibiteurs de PI3K. En outre, il a été montré dans cette étude que le NO sensibilise les cellules tumorales à l'apoptose induite par l'irradiation via l'activation de la protéine p53. Ainsi, il est probable qu'une formation accrue de NO active la protéine p53 dans les cellules non-irradiées et les rend plus sensibles aux signaux *bystander* (Wang et al., 2018).

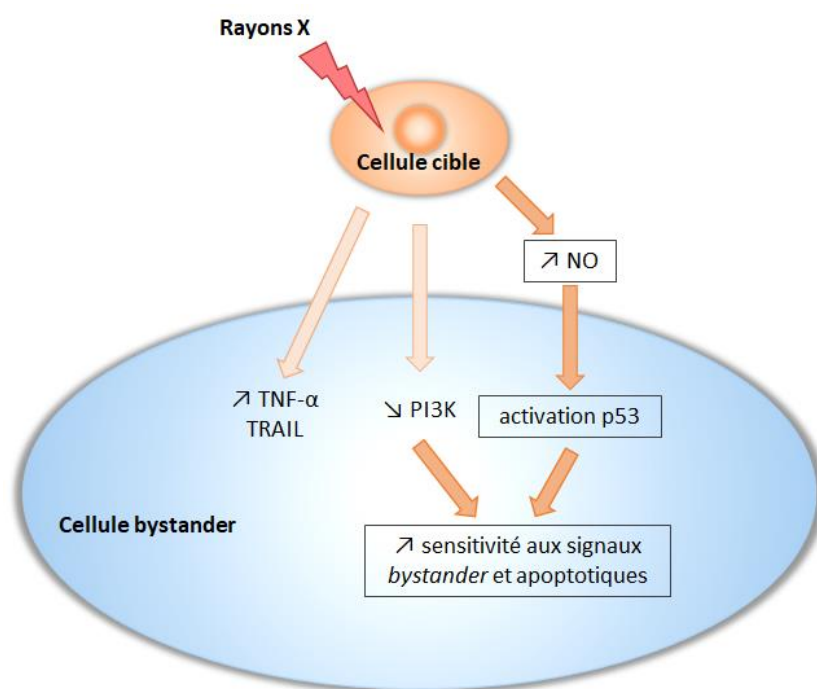


Figure 22 : Schéma des voies de signalisation impliquées dans les effets bystander après irradiation de cellules tumorales du cerveau (lignée T98G). Abréviations : NO=oxyde nitrique ; PI3K=phosphoinositide 3-kinase ; TNF- α =facteur de nécrose tumorale α ; TRAIL=ligand inducteur de l'apoptose lié au facteur de nécrose tumorale (Wang et al., 2018).

Certaines pistes sur les mécanismes sous-jacents à l'effet *bystander* ont été évoquées. Ainsi, la transmission de signaux entre les cellules irradiées et non-irradiées pourrait se faire par deux voies différentes : les jonctions communicantes entre les cellules (*gap junctions*) ou par la sécrétion paracrine dans l'espace extracellulaire de facteurs solubles (**Figure 21**). Ainsi, les cellules irradiées vont produire des substances médiatrices solubles, en particulier des ROS et RNS mais également des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 8 (IL-8), le *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) et des molécules telles que le *transforming growth factor- β* (TGF- β), le ligand de mort Fas ou encore le *tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL). Des exosomes contenant de l'ARNm, du microARN et de l'ADN peuvent également être libérés (Pouget et al., 2018; Sun et al., 2014). Les gènes associés aux effets *bystander* jouent également un rôle dans l'inflammation. Les stress oxydatif généré par l'irradiation est ainsi intensifié à mesure que ces gènes sont activés, ce qui va stimuler l'inflammation et la formation de NO (**Figure 22**) (Wang et al., 2018).

Il a également été démontré qu'une irradiation partielle du corps à forte dose (irradiation du corps hormis la tête à 3 Gy) chez la souris juvénile provoque des dommages à l'ADN, de l'apoptose et une tumorigenèse dans le cervelet (**Figure 23**). Mancuso et collaborateurs apportent ainsi en 2008 la première preuve de concept que les effets *bystander*

ont lieu également *in vivo* avec un potentiel cancérigène qu'il faut prendre en compte (Mancuso et al., 2008; Selzer & Hebar, 2012).

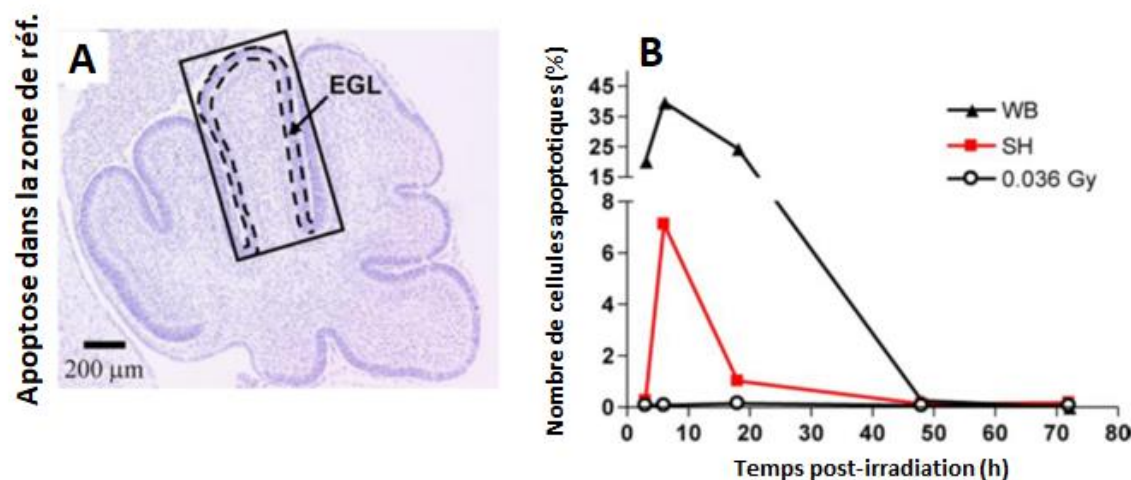


Figure 23 : Evaluation de l'apoptose dans le cervelet chez des souris juvéniles (2 jours post-natal) irradiées corps entier (WB) ou avec protection de la tête (SH). (A) Image représentative de l'apoptose mise en évidence dans le lobe cardinal antéro-dorsal du cervelet des souris SH. Les tirets noirs délimitent la couche granulaire externe du cervelet (EGL) chez les souris exposées corps entier. (B) Quantification du nombre de cellules apoptotiques chez les souris exposées WB ou SH en fonction du temps post-irradiation (Mancuso et al., 2008).

II-2.2.2 L'effet abscopal

L'effet *abscopal* est défini comme étant « une réponse significative dans un tissu qui est physiquement éloigné de la région corporelle exposée aux rayonnements ionisants » (Pouget et al., 2018). En 1953, Mole observe que les cellules tumorales hors du champ de l'irradiation primaire régressent voire disparaissent. Il définit alors l'effet *abscopal* comme une « action à distance du volume irradié mais au sein du même organisme ». Ce phénomène représente donc tous les effets produits en dehors de la cible irradiée. Cette définition spatiale, de fait, intègre l'effet *abscopal* dans la définition généraliste de l'effet *bystander* ce qui explique la confusion qui règne dans la littérature entre ces effets (Daguenet et al., 2020; Sun et al., 2014).

Contrairement à l'effet *bystander* qui concerne les cellules adjacentes ou voisines des cellules irradiées, l'effet *abscopal* est beaucoup plus étendu et s'effectue à longue distance (jusqu'à des dizaines de centimètres en dehors du champ irradié). Des expériences cliniques et précliniques l'ont ainsi défini comme une conséquence systémique sur des masses tumorales situées « hors champ » et il serait médié par les cellules effectrices immunitaires locales. Les RI sont donc capables d'avoir une activité anti-tumorale à la fois contre les lésions ciblées (tumeur initiale) et distantes (tumeur métastatique) (Daguenet et al., 2020). Plusieurs

études cliniques ont ainsi rapporté la régression de métastases non-irradiées après une RT conventionnelle combinée ou non à une immunothérapie. Dans ce contexte de sites irradiés/non-irradiés au sein d'un même organe, il reste difficile de distinguer un effet *bystander* à longue portée d'un effet *abscopal* (Daguenet et al., 2020; Wang et al., 2018). Néanmoins, les chercheurs ont à ce jour une meilleure compréhension de l'effet *bystander* et des mécanismes associés tandis que l'effet *abscopal* repose sur l'observation clinique de changements radio-induits (Wang et al., 2018).

Tout comme l'effet *bystander*, l'effet *abscopal* résulte de dommages locaux à l'ADN dans les cellules ou les tissus directement irradiés. La région irradiée peut être considérée comme zone de « stress » dans le corps, ce qui va déclencher des effets à distance. Ainsi, l'irradiation d'une partie spécifique du corps provoque des lésions chromosomiques et des altérations moléculaires et cellulaires dans des tissus éloignés de la zone initialement irradiée. L'effet *abscopal* induit alors dans les cellules non-irradiées et éloignées de la zone d'irradiation une augmentation des dommages génomiques, l'activation de la protéine p53 et des protéines de réparation de l'ADN et conduit également à la mort cellulaire (Pouget et al., 2018; Wang et al., 2018). Les études sur le sujet suggèrent que l'effet *abscopal* serait médié par la libération de facteurs par les cellules cancéreuses irradiées mais aussi par le système immunitaire avec en particulier l'implication des lymphocytes T. De plus, il a été démontré que les cytokines libérées en réponse à la RT jouent un rôle essentiel dans les réponses *abscopal*. La suppression des tumeurs induite par l'effet *abscopal* est probablement due à un effet anti-tumoral systémique provoqué par la décharge de cytokines dans la circulation sanguine (**Figure 24**). La régulation des effets *abscopal* repose donc sur un équilibre délicat entre la suppression et l'activation du système immunitaire comme en témoignent les rares cas d'effets *abscopal* observés chez les patients (Wang et al., 2018).

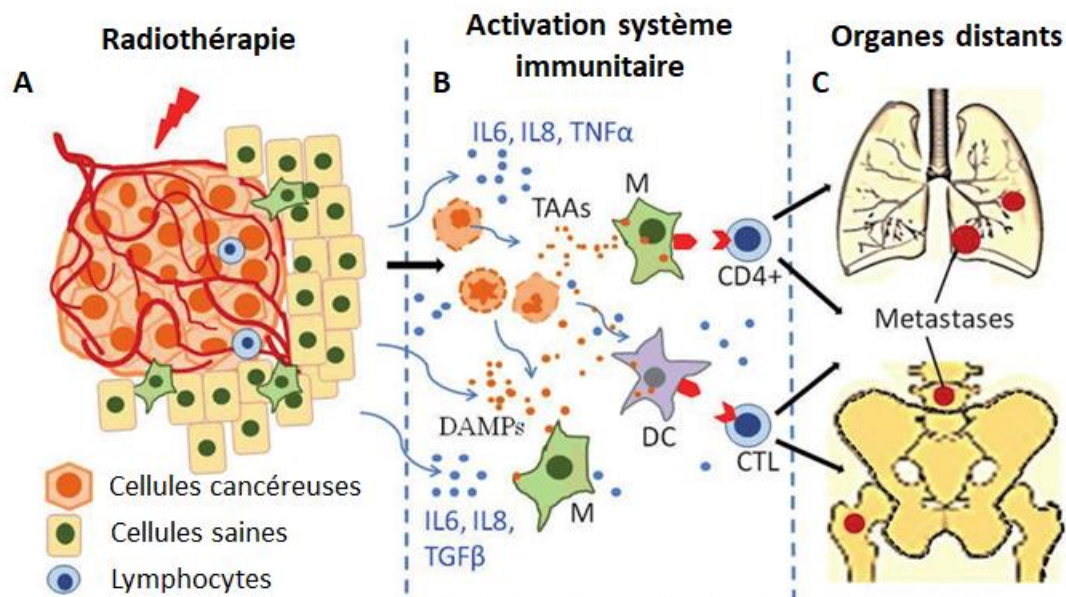


Figure 24 : Schéma de l'effet abscopal. (A) Les rayonnements ionisants induisent une série d'évènements (ROS, RNS, NO, IL6, IL8, mort cellulaire). (B) Les cellules endommagées par l'irradiation larguent des antigènes et des cytokines ; l'utilisation concomitante des modulateurs de l'immunité potentialise l'effet. (C) L'effet abscopal distant, peut être bénéfique (régression métastases).

L'effet *abscopal* a également été observé dans des études d'irradiation de tissus sains, ce qui témoigne que la présence d'une tumeur n'est pas indispensable au déclenchement de cet effet. En effet, l'équipe de Kovalchuk a d'ailleurs démontré dans une étude chez le rat qu'une irradiation du foie conduisait à des dommages cérébraux. Les auteurs ont remarqué qu'une irradiation hépatique entraînait des dommages à l'ADN au niveau de l'hippocampe et du cortex préfrontal, accompagnés d'une altération de l'organisation dendritique. De plus, ils ont également mis en évidence des altérations du comportement de l'animal telles qu'une réduction de l'activité locomotrice, une augmentation de l'anxiété et des déficits mnésiques. Cette étude suggère donc qu'une irradiation périphérique est capable d'altérer la structure et le fonctionnement du cerveau (Kovalchuk et al., 2015). Cette hypothèse est également appuyée par les travaux de Feiock et collaborateurs ayant mis en évidence chez la souris que l'irradiation du membre postérieur entraîne un hypométabolisme cérébral global détecté par TEP [^{18}F]-FDG (**Figure 25 A**), une augmentation du nombre d'astrocytes et de cellules microgliales activées (**Figure 25 B**) et une augmentation de l'expression du TNF- α témoignant de la présence d'une neuroinflammation. Ces effets à distance sur le cerveau pourraient donc être expliqués par la production de cytokines pro-inflammatoires et de ROS libérées dans la circulation sanguine après irradiation (Feiock et al., 2016).

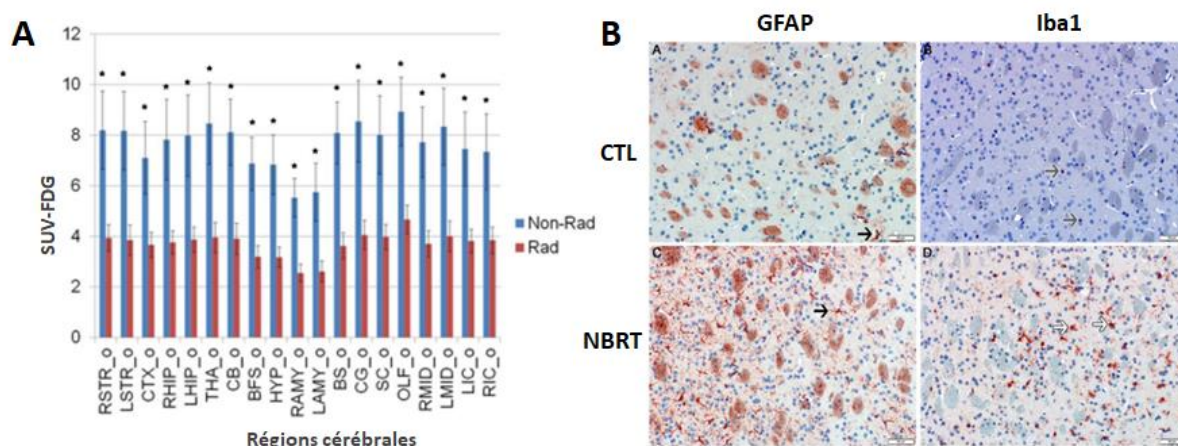


Figure 25 : L'irradiation du membre postérieur chez la souris entraîne des effets non-ciblés sur le cerveau. (A) Dans le cerveau de souris, la captation de $[^{18}\text{F}]$ -FDG a été quantifiée dans 19 structures cérébrales. Un hypométabolisme cérébral est observé dans l'ensemble des régions cérébrales étudiées chez les souris soumises à une irradiation de la patte arrière (groupe Rad, 16 Gy) par comparaison aux animaux non-irradiés (groupe Non-Rad). Abréviations des structures cérébrales : R/LSTR = Striatum Droit/Gauche ; CTX = Cortex ; R/LHIP = Hippocampe Droit/Gauche ; THA = Thalamus ; CB = Cervelet ; BFS = Cerveau antérieur basal ; HYP = Hypothalamus ; R/LAMY = Amygdale Droite/Gauche ; BS = Tronc cérébrale ; CG = Cingulum ; SC = Colliculus supérieur ; OLF = Bulbe olfactifs ; R/LMID = Mésencéphale droit/gauche ; R/LIC = Colliculi inférieurs droit/gauche. **(B)** Images représentatives d'immunomarquages des astrocytes (anticorps anti-GFAP) et de la microglie (anticorps anti-Iba1) dans le striatum de souris irradiées (groupe NBRT) ou non (groupe CTL) au niveau de la patte arrière (16 Gy). L'irradiation du membre postérieur de la souris conduit à une neuroinflammation (Feiock et al., 2016).

Pour résumer, les effets biologiques radio-induits doivent être étudiés à l'échelle du corps entier. Les effets ciblés et non-ciblés de l'irradiation peuvent entraîner la mort, la transformation ou la survie cellulaire ce qui doit être pris en compte dans le domaine de la thérapie anticancéreuse et de la radioprotection (Pouget et al., 2018).

II-2.2.3 L'effet inter-individu

Bien que certaines études aient apporté des preuves de l'existence des effets non-ciblés *in vivo* médiés par la circulation sanguine et le système immunitaire, ils sont encore difficilement prédictibles et contrôlables (Chai & Hei, 2008). En effet, ces effets non-ciblés dépendent probablement des paramètres d'irradiation utilisés conduisant à un certain type et niveau de dommages radio-induits mais également du type de tissu ou d'organe ainsi que le type de rayonnement ionisant étudié. Certaines études ont même soulevé la question de la transmission de ces effets non-ciblés d'un individu à l'autre (Mothersill et al., 2014; Smith et al., 2018).

En 2014, Mothersill et ses collaborateurs ont étudié l'impact d'une irradiation à forte dose (35 ou 350 Gy) de l'hémisphère cérébral droit sur l'hémisphère cérébral gauche pour étudier les effets *bystander* et aussi sur la vessie pour déterminer s'il existe des effets *abscopal*. Les auteurs sont allés plus loin dans leur démonstration en se demandant si des

effets pouvaient se retrouver chez les congénères non-irradiés hébergés avec les animaux irradiés. Les auteurs ont ainsi démontré des dommages au niveau des deux hémisphères cérébraux et de la vessie similaires voire supérieurs dans chacun de ces tissus chez les compagnons de cages non-irradiés et hébergés pendant 48h avec des rats irradiés. Les auteurs soulignent alors que ces résultats soutiennent l'hypothèse que la proximité d'un animal irradié induit des modifications chez un partenaire non-irradié et témoignent de la présence d'un effet inter-individu (Mothersill et al., 2014). Le développement d'un modèle d'irradiation locale à haute dose (35 ou 350 Gy) sur un gliome cérébral implanté dans l'hémisphère droit d'un rat permet d'obtenir des données plus pertinentes vis-à-vis de la pratique de RT clinique et de pouvoir mieux comparer les effets *bystander*, des effets *abscopal* et des effets inter-individu. Pour mieux appréhender leurs résultats, les auteurs ont mis dans le milieu de culture de cellules HPV-G (lignée humaine de kératinocytes) cultivées *in vitro* les broyats tissulaires issus des hémisphères droit ou gauche ainsi que de la vessie des animaux irradiés et de leurs partenaires non-irradiés hébergés dans la même cage. Puis, la survie des cellules HPV-G a été évaluée par test clonogénique. Comme montré sur la **Figure 26**, la survie cellulaire est réduite lorsque les cellules HPV-G ont été exposées aux lysats tissulaires des animaux irradiés et, de manière intéressante, cet effet est d'autant plus important lorsque ces cellules sont cultivées en présence de lysats de cerveau et de vessie des rats non-irradiés et hébergés dans la même cage que leurs congénères (Mothersill et al., 2014). De plus, la présence d'une tumeur dans le cerveau droit amplifie les effets *abscopal* et *bystander* dans les tissus des animaux irradiés mais également les effets non-ciblés observés chez leurs partenaires non-irradiés qui ne présentaient pas de tumeur et hébergés dans la même cage (Fernandez-Palomo et al., 2015).

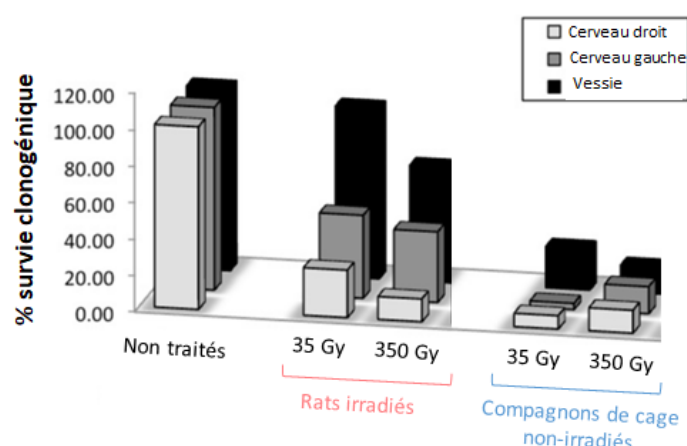


Figure 26 : Effets des lysats tissulaires (hémisphères cérébraux droit et gauche et de la vessie) de rats irradiés ou non-irradiés mais hébergés dans la même cage pendant 48 heures sur la survie cellulaire des cellules HPV-G. Quantification de la survie des cellules HPV-G (lignée humaine de kératinocytes) par test clonogénique (adapté de Mothersill et al., 2014).

En outre, certains travaux s'étaient préalablement attardés à évaluer le temps pendant lequel des poissons irradiés pouvaient produire des facteurs impliqués dans les effets non-ciblés de l'irradiation. Ainsi, un poisson irradié dans les premiers stades de sa vie continue de produire des signaux tout au long de sa vie (Mothersill et al., 2007). Les auteurs soulignent alors l'importance de déterminer si les rats irradiés, à l'instar de l'étude précédente chez le poisson, ont une capacité prolongée de production de signaux (Mothersill et al., 2014). Les expériences réalisées chez le rat ont montré que les rats adultes conservent leur capacité de production des signaux pendant au moins 48h après l'irradiation. Toutefois, il s'agit de résultats préliminaires à interpréter avec prudence. Cependant, il semble essentiel de pouvoir déterminer si cet effet est observable chez d'autres mammifères, y compris les humains. En effet, si une signalisation similaire se produit entre humains et est impliquée dans des effets inter-individu, les résultats pourraient avoir des implications pour les soignants et le personnel hospitalier prenant en charge les patients traités par RT (Mothersill et al., 2014).

Après avoir présenté les effets biologiques des RI, en particulier des rayons X sur l'organisme, il paraît essentiel de détailler les principales caractéristiques de la radiothérapie cérébrale et présenter son intérêt thérapeutique essentiel dans la prise en charge des patients atteints de tumeurs cérébrales.

II-3 Radiothérapie des tumeurs cérébrales

II-3-1 Principales modalités de radiothérapie

La RT conventionnelle, également appelée RT photonique, repose depuis le début des années 2000 essentiellement sur l'utilisation des rayons X car ceux-ci sont générés directement à partir d'accélérateurs linéaires d'électrons. Cette technique est plus aisée que l'utilisation de sources radioactives scellées nécessaires à la production des rayons γ .

Il existe 2 principales catégories de RT selon la localisation de la source d'irradiation (**Figure 27**) (Thompson et al., 2018) :

- La **RT externe** consiste en un traitement utilisant des faisceaux de photons ou de particules de haute énergie qui sont délivrés par une machine et dirigés précisément de l'extérieur du corps vers la tumeur (Choong et al., 2014; Pieters et al., 2017). A ce jour, la RT externe basée sur l'utilisation de rayons X est un standard thérapeutique pour de nombreuses

tumeurs cérébrales. La modalité de RT la plus largement utilisée est la photonothérapie de mégavoltage, irradiation par des rayons X de haute énergie (de 1 à 25 Mégavolt (MV)) qui ont une capacité de pénétration tissulaire importante, permettant ainsi de traiter des structures internes profondes telles que les tumeurs cérébrales.

- La **RT interne** est basée sur l'utilisation de sources radioactives irradiant des cellules cancéreuses à proximité. Ces sources radioactives sont placées à l'intérieur du corps et peuvent se présenter sous deux formes. Il peut s'agir de sources solides, ou implants, placées lors d'une intervention chirurgicale (curiethérapie ou brachythérapie) ou de sources radioactives non-scellées et liquides, telles que des radiopharmaceutiques, qui seront préférentiellement absorbées par le tissu cancéreux après avoir été injectées par voie intraveineuse ou ingérées (radiothérapie métabolique ou thérapie ciblée par radionucléides) (Choong et al., 2014; Thompson et al., 2018).

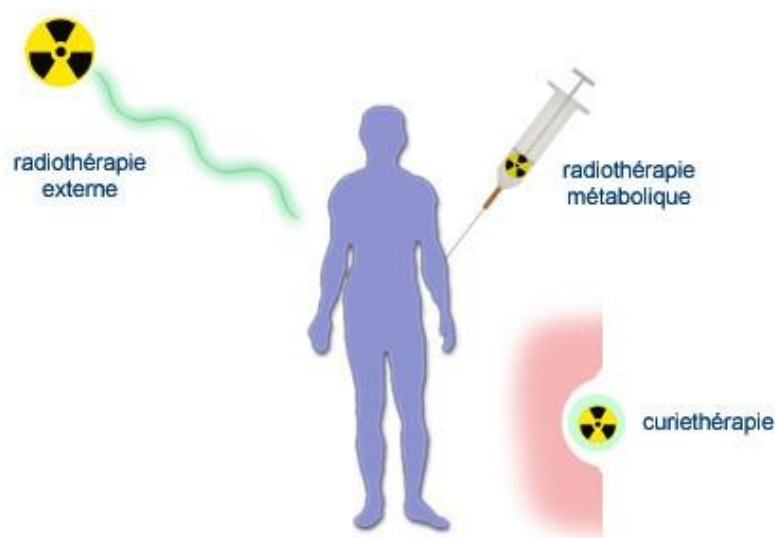


Figure 27 : Les deux principaux types de radiothérapie : RT externe et RT interne qui comprend la RT métabolique et la curiethérapie

La curiethérapie avec l'utilisation notamment de l'iode radioactif (^{125}I) ou le césium radioactif (^{131}Cs) est une modalité relativement rare dans le traitement des tumeurs cérébrales puisqu'elle nécessite l'étape délicate d'implantation d'isotopes radioactifs au moment de la résection tumorale. Quant à la RT métabolique, bien qu'elle soit de plus en plus utilisée dans le traitement des tumeurs les plus sensibles telles que les leucémies ou les lymphomes, elle est peu employée pour les tumeurs solides. Ces tumeurs étant généralement davantage radio-résistantes elles nécessiteraient des doses de radionucléides émetteurs de rayons α ou β très élevées et pourraient donc présenter une radiotoxicité importante. De

nombreuses investigations précliniques sont menées actuellement pour évaluer l'impact théranostique ainsi que les toxicités de la RT interne ciblée avec l'utilisation par exemple de l'Actinium-225, l'Astatine-211 ou le Bismuth-213 (Gudkov et al., 2015; Puttemans et al., 2019).

II-3.2 Planification des traitements de radiothérapie externe

Avant de débiter la RT, le radiothérapeute-oncologue doit élaborer le plan de traitement qui est adapté à chaque patient à partir des images IRM ou scanner de la tumeur cérébrale. Ainsi, il va établir des cartes dosimétriques prenant en compte différents paramètres : le volume cible à irradier, la dose et les organes à risque qui doivent être irradiés au minimum.

- Le volume cible : à partir des images obtenues en IRM ou en scanner, trois volumes sont définis (**Figure 28**) (Burnet et al., 2004) :
 - Le **GTV** (*Gross Tumor Volume* ou volume tumoral macroscopique) correspond à la délimitation des contours de la tumeur visibles en IRM T₁-Gd ou T₂-FLAIR. Il doit donc nécessairement intégrer la tumeur (si une chirurgie n'a pas pu être réalisée) ou le résidu tumoral laissé après la résection tumorale.
 - Le **CTV** (*Clinical Target Volume* ou *volume cible anatomo-clinique*) définit un contour d'extension tumorale microscopique (non visible à l'imagerie). Il comprend ainsi le GTV et une marge d'environ 2cm en périphérie de la tumeur.
 - Le **PTV** (*Planning Target Volume* ou *volume cible planifié*) correspond au volume irradié. Il comprend le GTV et le CTV ainsi que du tissu sain. En pratique, il constitue une marge de moins d'1cm du CTV permettant de pallier les éventuelles erreurs de configuration des faisceaux et les mouvements du patient.

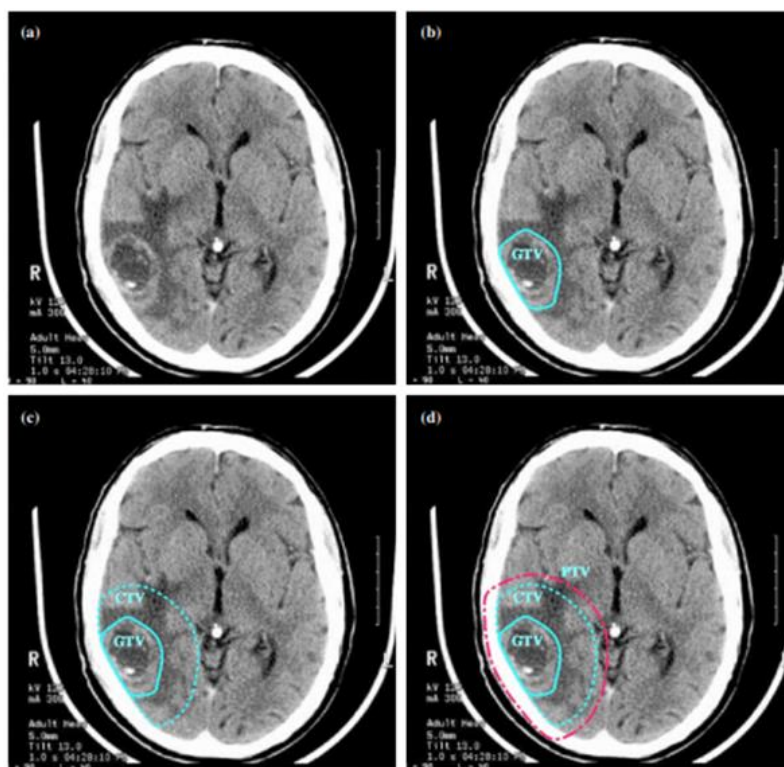


Figure 28 : Planification des volumes d'irradiation chez un patient atteint d'un glioblastome. (A) Image CT-scan montrant la tumeur cérébrale. (B-D) Délimitations des différents volumes nécessaires à la planification du traitement par radiothérapie : (B) le GTV (Gross Tumor Volume) correspondant à la tumeur visible macroscopiquement, (C) une marge de propagation microscopique est ajoutée pour tracer le CTV (Clinical Target Volume) ; la marge est la même dans toutes les directions sauf qu'elle est restreinte par le crâne. (D) Le PTV (Planning Target Volume) est ajouté en dehors du CTV afin de tenir compte des incertitudes dans la planification et l'exécution du traitement de radiothérapie ; il s'étend au-delà de l'intérieur du crâne (Burnet et al., 2004).

- La dose : selon le type et le grade des tumeurs cérébrales primitives ainsi que l'âge et l'état général du patient, les doses et le schéma radiothérapeutique vont varier. L'utilisation d'un hypofractionnement ou d'un hyperfractionnement dépendra de la technique de RT utilisée. Bien qu'il n'existe pas de consensus clinique sur les protocoles de RT, des recommandations ont été publiées par la Haute Autorité de Santé en 2007 ainsi que le « *Royal College of Radiologists* (RCR) » en 2019. Il est ainsi préconisé des doses de 45 à 54 Gy pour les tumeurs cérébrales de bas grade et des doses de 54 à 60 Gy pour les tumeurs cérébrales de haut grade. Les métastases cérébrales sont quant à elles traitées à des doses allant de 20 à 44 Gy selon le schéma retenu en fonction de l'espérance de vie estimée du patient (Latorzeff et al., 2016).

- Le fractionnement et l'étalement de la dose : c'est un paramètre essentiel pour optimiser les effets cytotoxiques de la RT sur la tumeur tout en réduisant les effets sur les tissus sains avoisinant la tumeur. En effet, pour améliorer la fenêtre thérapeutique, de petites fractions répétées s'avèrent plus efficaces pour produire une réponse tumorale tout en

minimisant la toxicité. Pour optimiser cet équilibre, la RT conventionnelle utilise généralement un fractionnement des doses quotidiennes de 1,8 à 2 Gy, 5 jours par semaine, pendant plusieurs semaines (Snider & Mehta, 2016). Les doses totales délivrées varient selon le schéma de traitement choisi et s'étalent généralement entre 30 et 60 Gy (Feuvret et al., 2016).

Le fractionnement des doses d'irradiation repose sur le principe des « 4 R de la radiobiologie » (Pieters et al., 2017) :

(1) Réoxygénation : lorsqu'une tumeur est irradiée, les cellules mieux oxygénées situées à la périphérie de la tumeur sont plus sensibles à l'irradiation. A mesure que les cellules périphériques meurent au cours du traitement, l'oxygène pénètre davantage dans la tumeur et atteint les cellules mal oxygénées, les rendant, à leur tour, plus sensibles aux rayons X. Par conséquent, la RT fractionnée permet de radiosensibiliser les cellules tumorales qui étaient à l'origine radorésistantes grâce au phénomène de « réoxygénation ».

(2) Réparation : les dommages à l'ADN, potentiellement délétères, sont des dommages qui peuvent être réparés. Que ce soit dans les cellules tumorales ou dans le tissu sain (non-tumoral) qui se trouve également irradié, les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN s'activent rapidement après irradiation et sont en grande partie achevés en environ 6 heures, et permettent de diminuer le risque d'effets de toxicité tardive (Pieters et al., 2017).

(3) Redistribution : la redistribution fait référence à la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Les cellules de la phase tardive S et la phase G0 sont relativement résistantes à l'irradiation, tandis que la phase G2 est connue pour sa plus grande radiosensibilité. Ainsi, la répétition du traitement augmente les chances qu'une cellule donnée soit dans une phase du cycle cellulaire plus sensible, rendant la RT plus efficace (Matsuya et al., 2016; Pieters et al., 2017).

(4) Repopulation : idéalement, toutes les cellules tumorales seraient irradiées tandis que la plupart du tissu sain serait épargné. Les cellules saines pourront alors repeupler la zone lésée par division cellulaire. Il est admis que le phénomène de repopulation accélère la guérison des effets neurotoxiques aigus et diminue le risque d'effets tardifs. Cependant, les cellules tumorales survivantes peuvent également se repeupler par division cellulaire. Une maîtrise de ce phénomène ou « contrôle de la tumeur » est donc nécessaire et peut être

influencé par des interruptions ou une durée de traitement allongée du fait du fractionnement des doses (Pieters et al., 2017).

Selon le type de tumeur cérébrale, les indications et les modalités de RT standardisée peuvent varier et sont synthétisées dans le **Tableau 3**.

Tumeur	Indication	Volume cible et dose
Glioblastome Gliome anaplasique Gliome du tronc	Post-opératoire ou exclusive si inopérable ± chimiothérapie	Volume tumoral + marge > 3cm : 60 Gy Volume tumoral + marge : 55 à 60 Gy Volume tumoral + marge : 55 Gy
Astrocytome de bas grade Oligodendrogliome	± post-opératoire, si récidive, si exérèse incomplète, rarement exclusive	Volume tumoral + marge : 55 Gy
Ependymomes	± post-opératoire, si récidive, si exérèse incomplète, post- opératoire ± chimiothérapie	Volume tumoral + marge : 55 Gy Fosse postérieure ± réduction : 55 Gy, ± axe : 35 Gy, idem médulloblastome
Médulloblastome	Post-opératoire, ± chimiothérapie	Névraxe : 35 Gy, Fosse postérieure ± réduction 55 Gy
Méningiomes	± exclusive ± post-opératoire, si récidive, si exérèse incomplète, post- opératoire	Volume réduit : 45-50 Gy Volume tumoral + marge : 50-55 Gy Volume tumoral + marge : 55-60 Gy
Adénome hypophysaire	± post-opératoire, si récidive, si exérèse incomplète, rarement exclusive	Volume réduit : 45-50 Gy

Tableau 3 : Synthèse des protocoles standardisés de traitement selon le type de tumeur cérébrale : Indications et modalités du protocole de radiothérapie

- **Les organes à risque (OAR)** : même si le cerveau n'est pas l'organe le plus radiosensible, il est admis que des complications importantes peuvent apparaître à partir d'une dose de 45 Gy et la dose létale à 50% est de 60 Gy (Gérard et al., 2017; Haberer et al., 2010; Lawrence et al., 2010). Lors de la planification du traitement, il doit être considéré que :

- 1/3 de l'encéphale ne doit pas recevoir plus de 60 Gy ;
- 2/3 de l'encéphale ne doit pas recevoir plus de 50 Gy ;
- l'ensemble du cerveau ne doit pas recevoir plus de 45 Gy.

Ainsi, le traitement par RT des métastases cérébrales de manière post-opératoire ou exclusive si celles-ci ne sont pas opérables (± chimiothérapie) implique généralement l'irradiation totale de l'encéphale à des doses de 30 Gy par séance.

Au sein du SNC, plusieurs structures sont radiosensibles et des seuils de dose ont donc été déterminés **Tableau 4**.

Organe sain à risque	Dose maximale	Conditions dépassement dose
Moelle épinière	45 Gy fractionnement habituel	Pourra être dépassée sur un petit volume sous réserve d'une dosimétrie 3D avec délimitation de la moelle, histogramme dose-volume et contrôle du positionnement
Œil	Dose moyenne < 35 Gy	
Cristallin	Dose la plus basse possible	
Conduit auditif, oreille moyenne et interne	50-55 Gy	Sauf si le contexte carcinologique impose une dose supérieure
Lobes temporaux	Dose aussi faible que possible (max. 60 Gy)	
Hypophyse	Dose aussi faible que possible (max. 45-50 Gy)	Une dose de 60 Gy pourra être acceptée si nécessaire

Tableau 4 : Définition des organes à risque et les seuils de dose recommandés (Haberer et al., 2010; guide des procédures de radiothérapie externe 2007).

Ces niveaux de dose peuvent éventuellement être dépassés sous réserve d'une justification liée au contrôle local de la tumeur et à la survie du patient, après information et accord de celui-ci. Ils doivent être appliqués en intégrant les facteurs de comorbidité présentés par le patient et les traitements associés qui peuvent majorer le risque de complication.

II-3.3 Les différentes techniques de radiothérapie externe

Il existe différentes modalités de RT pour délivrer la dose de rayons X la plus juste au patient, dont beaucoup ont considérablement évolué au fil du temps. La radiothérapie n'a cessé d'être optimisée afin d'être plus efficace sur la tumeur tout en épargnant au maximum le tissu sain environnant (Snider & Mehta, 2016). La RT panencéphalique était donc l'approche initiale mais grâce à l'imagerie tridimensionnelle, les volumes de traitement ont pu peu à peu être réduits pour ne traiter que l'œdème associé à la tumeur, la cavité post-opératoire et les résidus de la tumeur (Snider & Mehta, 2016).

La RT est actuellement dite conformationnelle en 3D et a ensuite évolué dans certains centres en conformationnelle 3D avec modulation de l'intensité pour être administrée à son efficacité maximale en condition stéréotaxique (**Figure 29**) (Snider & Mehta, 2016; Spasic et al., 2011).

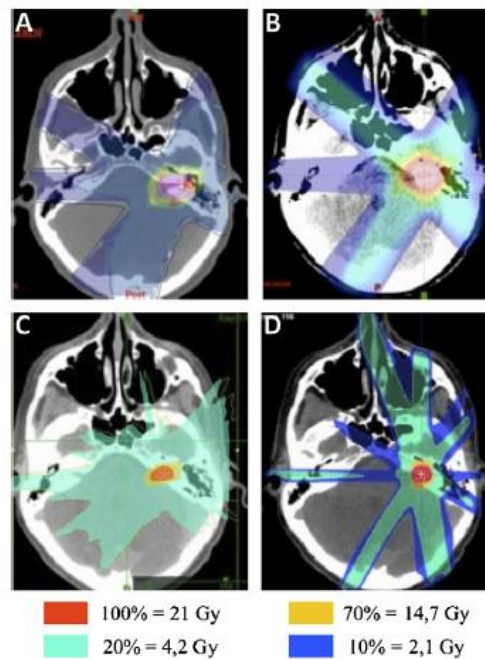


Figure 29 : Distribution de dose pour les quatre modalités de traitement par radiothérapie (RT) : (A) RT conformationnelle 3D ; (B) RT conformationnelle avec modulation d'intensité ; (C) RT stéréotaxique robotisée (Cyberknife) et (D) RT conformationnelle en conditions stéréotaxiques (Spasic et al., 2011).

Les 4 avancées technologiques majeures concernant la RT sont :

- **La radiothérapie conformationnelle 3D** (3D-CRT, *three-dimensional conformal radiotherapy*) est la technique la plus utilisée actuellement. Elle se base sur de l'imagerie scanner ou IRM pour définir les plans de traitements. En effet, des logiciels vont alors simuler la forme des faisceaux ainsi que la distribution des doses. Tous les faisceaux seront de taille et de dose équivalente. Au moins trois faisceaux coplanaires ou non sont employés et délivrent des rayons X d'énergie allant de 4 à 25 MV grâce à un accélérateur linéaire. Des collimateurs multi-lames et des filtres sont utilisés pour s'adapter aux courbures du crâne et aux éventuelles variations de densité (Feuvret et al., 2016) (**Figure 29 A**).

- **La radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité** (IMRT : *Intensity Modulated Radiation Therapy*) se base sur la radiothérapie conformationnelle 3D mais permet de faire varier la dose de chaque faisceau. Ainsi, une faible dose est appliquée lorsqu'il y a beaucoup de tissu sain à traverser avant d'arriver à la tumeur et une dose plus forte quand il n'y en a que très peu (**Figure 29 B**).

- **La radiothérapie conformationnelle en condition stéréotaxique** (SRT : *Stereotactic radiation therapy*) utilise la radiothérapie conformationnelle 3D associée à 2 positions différentes du patient. La possibilité de faire passer les faisceaux à des angles définis permet d'éviter certaines structures cérébrales très importantes sur le plan fonctionnel. En divisant

ainsi la dose entre ces nombreux faisceaux, la région cible sera donc la région qui recevra la plus forte dose tout en ayant une dose fortement réduite à distance de la tumeur (Snider & Mehta, 2016). Cela contribue à réduire considérablement l'exposition du tissu cérébral sain aux rayons X (Makale et al., 2017) (**Figure 29 C**).

- **La radiochirurgie ou radiothérapie en condition stéréotaxique** (SRS : *Stereotactic radiation surgery*) utilise notamment le CyberKnife®. La largeur de faisceau est maîtrisée et la modulation de l'intensité de dose également. Cette technique offre l'avantage de pouvoir délivrer le traitement selon l'angle de tir qui permet de toucher au minimum le tissu sain. Le positionnement du patient est alors établi à partir des images scanner pour chaque tir réalisé (**Figure 29 D**).

Ces dernières années, d'importantes améliorations sur la précision du dépôt de dose de la RT ont été réalisées avec le développement de la **RT guidée par l'imagerie** (IGRT : *Image Guided Radiation Therapy*). Ainsi, le guidage par l'imagerie permet une meilleure précision dans la configuration du patient et la localisation de la cible, permettant ainsi une réduction des marges de planification et conduisant à un plus petit volume de tissus sains irradiés à fortes doses (Scaringi et al., 2018). Ces machines de RT moderne ciblent les tumeurs avec une grande précision, en suivant leurs éventuels mouvements grâce à une imagerie intégrée, ce qui accroît considérablement la qualité et la sécurité des traitements.

II-3.4 Radiothérapie des tumeurs cérébrales primitives

De multiples essais contrôlés et randomisés ont confirmé que la RT était la pierre angulaire du traitement adjuvant des GB nouvellement diagnostiqués. Les patients de ces essais ont subi une RT en plus d'une chimiothérapie et/ou d'une intervention chirurgicale. Comparés à un groupe de patients n'ayant pas reçu de RT mais uniquement une chimiothérapie et/ou chirurgie, les patients traités par RT ont vu leur médiane de survie augmenter (Ziu et al., 2020). Néanmoins, malgré une thérapie oncologique de pointe avec résection chirurgicale et RT, le pronostic des patients atteints de GB reste sombre. Plusieurs études prospectives utilisant des modalités offrant une excellente distribution de dose de RT ont montré que l'augmentation de la dose est faisable et semble efficace. Des doses supérieures à 60 Gy seraient nécessaires pour contrôler le GB mais cette stratégie d'augmentation de la dose s'accompagnerait de certaines limites comme des toxicités graves

telles que la nécrose radiologique. Les patients atteints de GB traités par RT avec une dose croissante doivent donc être suivis afin d'identifier le volume cible approprié mais également d'établir un fractionnement de la dose optimal (Okonogi et al., 2014).

1. RT conformationnelle 3D (3D-CRT)

Dans le cadre du traitement des GB, des études ont présenté l'avantage potentiel de l'augmentation de la dose en RT post-opératoire en utilisant la RT conformationnelle 3D. En effet, il est apparu que la RT post-opératoire de 90 Gy en 45 fractions chez des patients atteints de GB entraînait significativement moins d'échecs locaux (31%) que chez les patients ayant reçu une RT à une dose de 60-80 Gy en 30-40 fractions (80%). Ainsi, l'augmentation de la dose jusqu'au volume cible peut permettre un meilleur contrôle local et une augmentation de la survie des patients atteints de GB (Okonogi et al., 2014).

De ce fait, les auteurs des directives cliniques recommandent une dose pouvant aller jusqu'à 60 Gy en fractions quotidiennes de 2 Gy. Cependant, pour les patients qui présentent un pronostic plus sombre et une survie limitée, il est recommandé de suivre un schéma hypofractionné (Ziu et al., 2020).

2. La RT conformationnelle avec modulation d'intensité (IMRT)

L'IMRT est une méthode ingénieuse pour le traitement des tumeurs malignes du SNC. En comparaison à la 3D-CRT, l'IMRT améliore la conformité de la dose cible, réduit les doses au niveau des OAR tels que le tronc cérébral, le chiasma optique, le cristallin, les nerfs optiques ou encore le cortex cérébral tout en atteignant une couverture cible comparable (**Figure 30**) (Okonogi et al., 2014). Il semble également que l'IMRT puisse être une bonne technique d'irradiation dans le cas d'un GB afin de réduire les doses de rayons X au niveau des tissus cérébraux sains (Ziu et al., 2020).

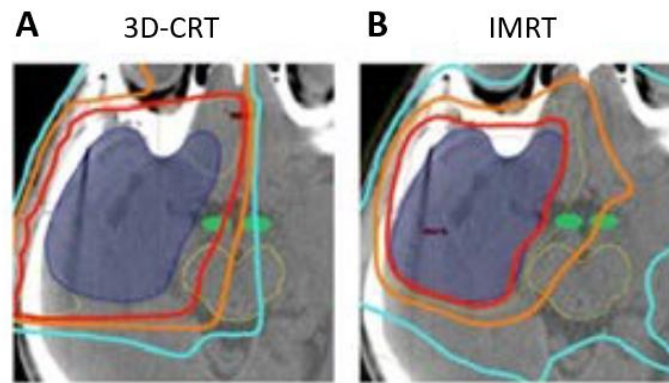


Figure 30 : Distribution de dose axiale représentative de la planification de différentes modalités de RT. (A) RT conformationnelle tridimensionnelle (3D-CRT) ; (B) RT à intensité modulée (IMRT). Les couleurs cyan, orange et rouge représentent respectivement des lignes d'isodose à 50%, à 80% et 95%. Les couleurs bleu foncé, vert et jaune indiquent respectivement le volume cible, les nerfs optiques et le tronc cérébral (Okonogi et al., 2014).

L'augmentation de la dose grâce à l'IMRT a montré une prolongation de la survie des patients atteints de GB sans augmentation de l'incidence des toxicités sévères. De plus, Luchi *et al.* ont évalué l'augmentation de la dose en IMRT hypofractionnée chez des patients atteints de GB. Ils ont alors constaté que les taux de survie sans progression à 1 et 2 ans étaient respectivement de 71,4% et 53,6%. Ainsi, l'augmentation de la dose a montré une amélioration significative à la fois du contrôle local et de la survie des patients atteints de tumeurs cérébrales (Okonogi et al., 2014).

3. La radiochirurgie stéréotaxique (SRS) et la RT conformationnelle stéréotaxique (SRT)

La SRS et la SRT sont des formes d'administration de RT hypofractionnées de haute précision. Plusieurs études ont évalué la SRS principalement comme une modalité qui viendrait en appoint de la RT conformationnelle. Lors d'un essai prospectif de phase II non randomisé, la majorité des patients ont subi une résection subtotale et 46% des patients ont alors reçu du témozolomide. Enfin, tous les patients ont subi une SRS *GammaKnife* au cours des 5 semaines suivant la chirurgie. Puis, au cours des 2 semaines suivant la SRS, les patients ont été soumis à une RT conformationnelle de 60 Gy au total répartis en fractions de 2 Gy/jour pendant 5 jours/semaine. La survie médiane pour les patients âgés de plus de 60 ans était de 11 mois et de 22 mois pour les patients plus jeunes. Les auteurs ont alors conclu que la SRS ciblée par spectroscopie par résonance magnétique dirigée uniquement vers les zones de forte activité biologique combinée à la RT conformationnelle est réalisable avec une toxicité acceptable et une survie supérieure à celle des témoins. En effet, la survie sans progression à 3 mois était de 75% chez les patients ayant subi une irradiation *GammaKnife* et de 45% pour

les autres. L'utilisation du *GammaKnife* (SRS) avant la RT conformationnelle pourrait être utile pour préserver la qualité de vie des patients (Ziu et al., 2020).

II-3.5 Radiothérapie des métastases cérébrales

La RT sur cerveau entier (WBRT : *whole brain RT*) initiale, avant chirurgie ou tout autre traitement, reste une approche standard pour les patients présentant de nombreuses métastases cérébrales (MC). Elle est également utilisée de façon préventive. En effet, la possibilité d'empêcher la maladie de se propager au cerveau a suscité beaucoup d'intérêt en oncologie. L'irradiation crânienne prophylactique est ainsi utilisée dans le cadre de la leucémie, du cancer du poumon à petites cellules et du cancer du poumon non à petites cellules. L'irradiation crânienne prophylactique s'est révélée prometteuse pour contrôler la maladie et prolonger la survie dans certaines populations de patients (Bovi, 2018).

La WBRT post-opératoire permet alors de réduire de moitié le risque de récurrence dans le lit chirurgical, le développement de nouvelles métastases distantes ainsi que le décès lié à des symptômes neurologiques. Cependant, il n'a pas encore été démontré que ces avantages se traduisent pas une augmentation de la survie globale des patients traités (Brown et al., 2018). Cette modalité de traitement est également employée comme soins palliatifs dans le cas où le pronostic estimé est inférieur à trois mois (**Figure 31**) (Latorzeff et al., 2016).

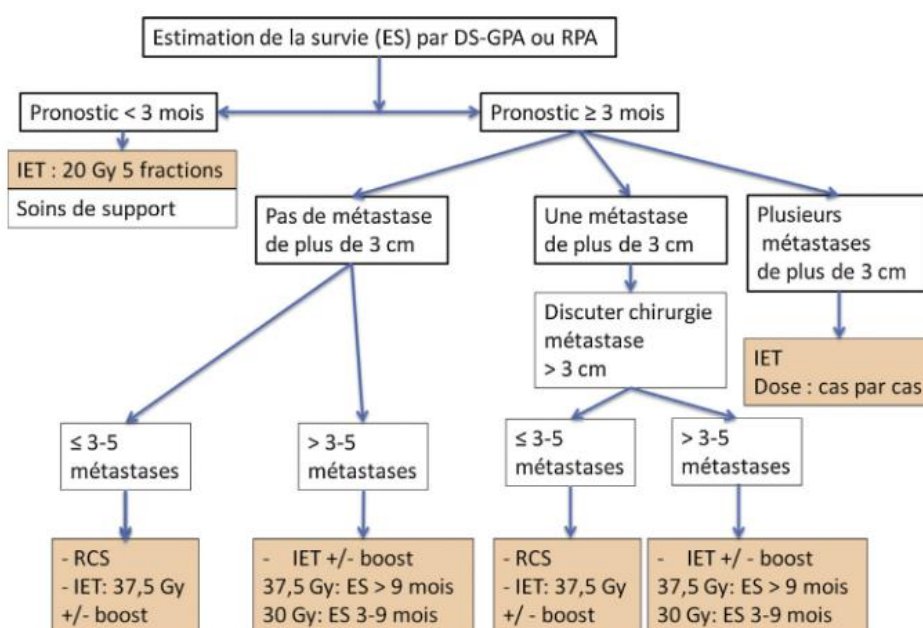


Figure 31 : Diagramme d'adaptation des traitements de radiothérapie des métastases cérébrales en fonction du score DS-GPA (Diagnosis-Specific Graded Prognostic Assessment) ou de celui du RPA (Recursive Partitioning Analysis). Pour les métastases de plus de 3 cm, la radiothérapie en conditions stéréotaxiques est fractionnée. IET : irradiation encéphalique en totalité, RCS : RT en conditions stéréotaxiques (Latorzeff et al., 2016).

Néanmoins lorsque le nombre de MC est limité, le terme de maladie cérébrale oligométastatique est utilisé. Dans ce cas, le traitement peut faire appel à une WBRT, une radiochirurgie stéréotaxique (SRS) ou une association de ces deux modalités de traitement. Le choix entre ces options radiothérapeutiques s'établit en prenant en compte différents facteurs pronostiques tels que le nombre de métastases, leur localisation ou encore la gravité des symptômes des patients (**Figure 31**) (Bovi, 2018; Latorzeff et al., 2016; Métellus et al., 2015). La définition de ce qu'est un nombre de MC « limité » n'est cependant pas clairement établi. La littérature fait généralement cas d'un état oligométastatique en présence de 2 à 4 MC ou 1 à 5 MC (Chaung et al., 2021; Métellus et al., 2015).

La WBRT utilisée seule offre un contrôle local moindre et étroitement dépendant de la taille des MC, sans corrélation avec leur nombre. Elle protège des récives cérébrales mais peut entraîner des troubles cognitifs à long terme (Métellus et al., 2015).

La SRS permet le traitement de plusieurs MC tout en évitant l'irradiation panencéphalique qui a un impact négatif reconnu sur la fonction neurocognitive. Des essais randomisés ont montré que la SRS utilisée seule est efficace pour traiter jusqu'à 4 MC avec une diminution des effets secondaires neurocognitifs, sans nuire à la survie globale des patients. Ces données ont alors conduit à la définition actuelle des MC « limitées ». Cependant, des données plus récentes suggèrent que les patients qui présentent jusqu'à 10 MC pourraient également bénéficier de la SRS. De plus, des essais cliniques en cours étudient si les patients présentant jusqu'à 15-20 MC peuvent bénéficier de la même manière de la SRS seule (Chaung et al., 2021). Il a été démontré que la SRS permet un bon contrôle local et une survie équivalente mais avec moins de déclin neurocognitif chez les patients traités après chirurgie (Bovi, 2018). En effet, la SRS offre un excellent taux de contrôle local (plus de 70%), mais utilisée seule, ne protège pas de la récive au niveau d'autres sites cérébraux. Le risque de récive étant proportionnel au nombre de MC initiales (Métellus et al., 2015).

En outre, bien que la RT améliore indéniablement le pronostic des patients atteints de tumeur cérébrale primitive ou secondaire, des effets secondaires sont de plus en plus décrits par les patients survivant à long terme. En effet, bien que les nouvelles techniques de RT visent à cibler au maximum la tumeur, le tissu cérébral non-tumoral est tout de même irradié ce qui conduit à des phénomènes de neuropathies radio-induites.

III - Effets de la radiothérapie sur le tissu cérébral sain

Un des principaux effets de la RT est la réduction du volume cérébral chez des patients atteints de tumeurs cérébrales. Hoffman *et al.* ont montré que des patients porteurs de MC présentaient, après WBRT, une diminution du volume global du cerveau. Toutefois, dans cette étude les auteurs ont mis en évidence que la réduction du volume cérébral n'était pas corrélée au rétrécissement de la tumeur (Hoffmann et al., 2018) suggérant donc que cette atrophie cérébrale est principalement due à des effets de la RT sur le tissu cérébral non-tumoral.

III – 1 Effets secondaires de la radiothérapie cérébrale

Avec les avancées dans la prise en charge thérapeutique des cancers ces dernières décennies, les patients survivent plus longtemps mais des effets indésirables des traitements, notamment la RT, sont de plus en plus décrits et invalident fortement la vie quotidienne des patients long-survivants. En effet, la plupart des patients traités par RT cérébrale présentent à plus ou moins long-terme des troubles neurocognitifs. Ceci est retrouvé à la fois chez l'adulte et chez les survivants de cancers pédiatriques et affecte directement les performances scolaires, l'emploi et plus largement l'autonomie (Barazzuol et al., 2020). Malgré les récents progrès de la RT en termes de précision, ces atteintes neurocognitives restent courantes. La planification du traitement de RT est complexe et implique des contraintes à prendre en compte par les radiothérapeutes : traiter la tumeur métaboliquement active et ses zones microscopiques d'infiltration tout en minimisant la dose reçue au tissu cérébral sain et en préservant les structures cérébrales critiques (Garbow et al., 2018). Une dose plus importante ainsi qu'un âge avancé sont des facteurs de risque de développement d'une neurotoxicité radique chronique (Shaw & Ball, 2013). En outre, pour le traitement de multiples MC, la méthode de traitement la plus fréquente est la radiothérapie panencéphalique. Cette technique améliore de nombreux symptômes neurologiques, la qualité de vie et prolonge l'espérance de vie des patients traités. Néanmoins, malgré ces bénéfices, la RT sur cerveau entier présente de nombreuses complications qui peuvent être classées en fonction du moment post-traitement : (1) phase aiguë, quelques heures à plusieurs jours ; (2) la phase précoce, quelques semaines à quelques mois et (3) la phase tardive, quelques mois à quelques années (Shaw & Ball, 2013) comme présenté dans la **Figure 32**.

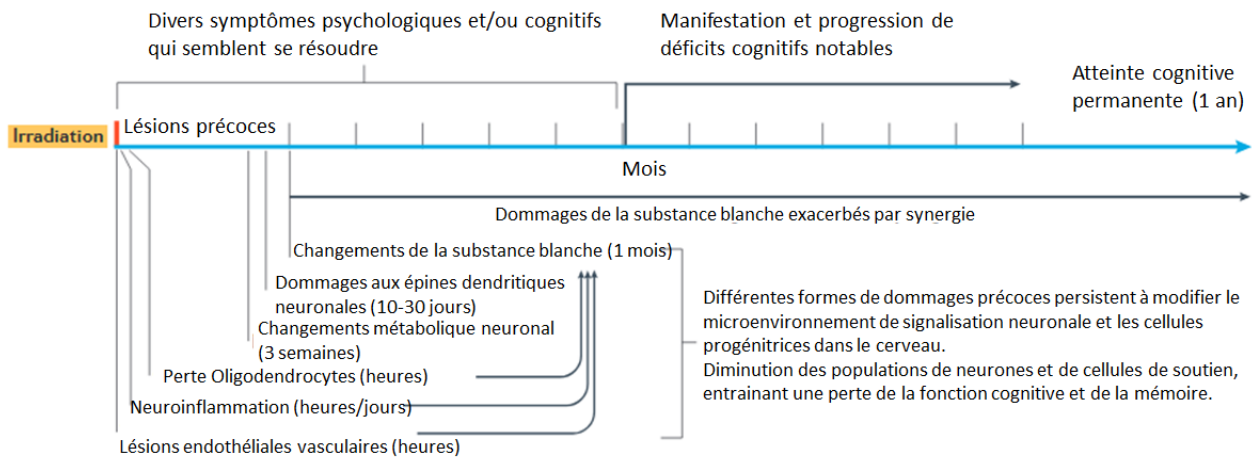


Figure 32 : Représentation des différentes phases des atteintes cérébrales et des troubles comportementaux induits par l'irradiation cérébrale (Makale et al., 2016).

Les effets aigus de la RT cérébrale qui apparaissent dans les jours et les premières semaines suivant l'irradiation comprennent, entre autres, la léthargie, la fatigue, la somnolence, l'alopecie, l'irritation du cuir chevelu, la sclérite (inflammation importante impactant la vision) ainsi qu'une aggravation de l'œdème (Snider & Mehta, 2016) entraînant une augmentation des symptômes neurologiques. Cet œdème intracrânien ou la tumeur elle-même peuvent être à l'origine d'une hernie cérébrale pouvant conduire à la mort des patients (Yang et al., 2017).

Les effets secondaires précoces, qui surviennent plusieurs semaines à quelques mois après RT, sont en grande partie dus à l'effet des rayons X sur les cellules saines à division rapide telles que les cellules de la peau ou des muqueuses (Pieters et al., 2017). Ces effets précoces sont souvent réversibles lorsque la dose est limitée et le renouvellement des tissus élevé comme dans le cas d'une irradiation de la muqueuse buccale ou de l'intestin. Ils sont cependant partiellement réversibles dans des tissus tels que les poumons, la peau ou encore le cerveau (Barazzuol et al., 2020). Au niveau du cerveau, les rayons X vont perturber de façon précoce la membrane plasmique de plusieurs types cellulaires et en particulier celles de l'endothélium vasculaire. La phase précoce est donc caractérisée par une rupture de la BHE associée à une neuroinflammation, un processus de démyélinisation transitoire ou une perte de fonction des oligodendrocytes qui s'accompagne d'une somnolence et de la survenue de déficits cognitifs (Makale et al., 2017; Yang et al., 2017). Toutefois, la survenue de ces effets aigus ne permet pas de prédire par la suite l'apparition d'effets tardifs (Pieters et al., 2017).

La toxicité tardive se manifeste plusieurs mois voire plusieurs années après l'irradiation sous forme de radionécrose, de sécheresse oculaire, de déficit hormonal hypophysaire, d'une atteinte de l'appareil optique, de lésions cochléaires, de déficits neurocognitifs ou dans quelques cas sous forme d'effets carcinogènes avec le développement de tumeurs cérébrales radio-induites (Snider & Mehta, 2016). Les effets tardifs sont en grande partie dus à des lésions microvasculaires, à la perte de fonction des cellules parenchymateuses et à des lésions tissulaires, notamment des atteintes majeures de la substance blanche (Pieters et al., 2017). Ces effets tardifs se manifestent par des déficits cognitifs (mémoire, apprentissage, fonctions exécutives) sont souvent progressifs puis deviennent chroniques, entraînant une diminution de la qualité de vie des patients après RT (Barazzuol et al., 2020). Contrairement aux effets secondaires précoces, le temps d'apparition des effets tardifs dépend de la dose et est modulé par la sénescence cellulaire, l'inflammation chronique, l'hypoxie ou encore la fibrose (Bentzen, 2006).

Avec l'amélioration de la survie des patients après RT, la préservation des fonctions neurologiques et neurocognitives est devenue à présent une des préoccupations majeures des oncologues et des radiothérapeutes. Ils doivent donc la prendre en compte dès la mise en place du traitement, notamment lors de la planification de la RT, dans le but de préserver *in fine* la qualité de vie des patients long-survivants.

III-1.1 Fatigue/asthénie

L'asthénie, couramment appelée la fatigue, est souvent signalée comme étant l'effet secondaire le plus problématique pour les patients atteints d'un cancer. En effet, jusqu'à 90% des patients déclarent ressentir de la fatigue après un traitement anticancéreux (Repka & Hayward, 2018). La fatigue liée au cancer (retrouvée dans la littérature sous l'acronyme CRF pour *Cancer-Related Fatigue*) est définie comme « un sentiment pénible, persistant et subjectif de fatigue ou d'épuisement physique, émotionnel et/ou cognitif lié au cancer ou au traitement du cancer qui n'est pas proportionnel à l'activité récente et interfère avec le fonctionnement habituel ». La CRF diffère considérablement de la fatigue dite « normale » car elle a tendance à être plus importante, plus pénible et moins susceptible d'être soulagée par le repos (Asher et al., 2016). La fatigue étant à la fois un phénomène physiologique et psychologique, il est difficile d'identifier un mécanisme spécifique. Il a été suggéré que la fatigue serait liée aux réponses immunitaires et inflammatoires, à une fonte musculaire liée à

une cachexie, aux troubles du sommeil, une dépression, une anémie, à des déséquilibres métaboliques induits par la tumeur, des dommages mitochondriaux ou encore à la diminution de la disponibilité des substrats due à l'anorexie, des nausées ou des vomissements. La CRF est probablement le produit d'une combinaison de ces différents facteurs et peut varier d'un individu à l'autre (**Figure 33**) (Repka & Hayward, 2018).

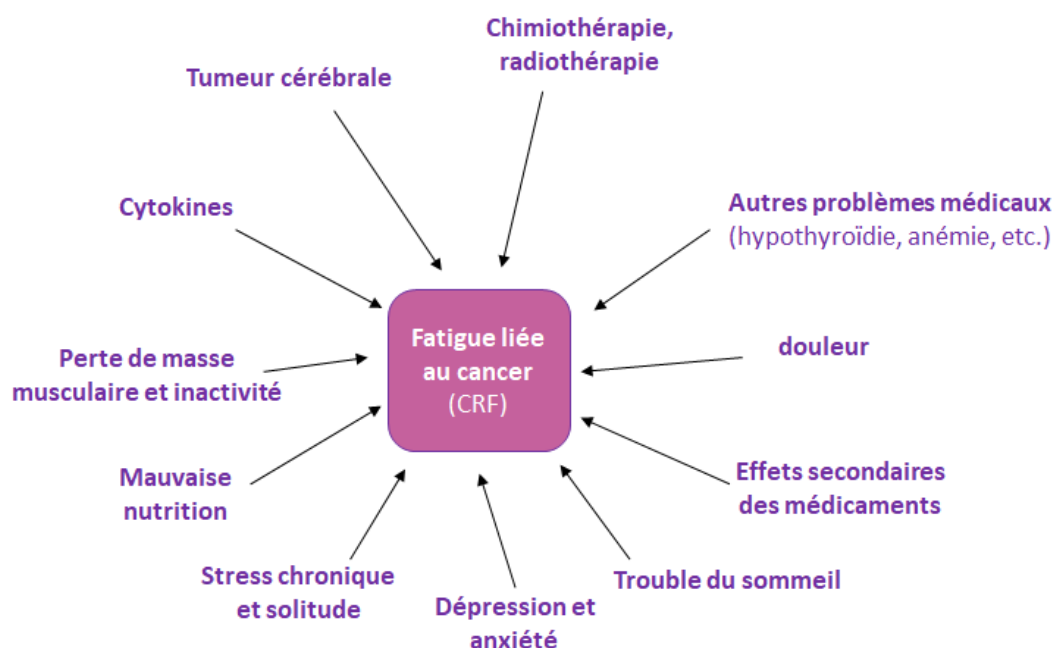


Figure 33 : Facteurs démographiques, médicaux, psychosociaux et biologiques pouvant influencer la genèse d'une fatigue liée au cancer chez les patients porteurs de tumeurs cérébrales (d'après Asher et al., 2016).

Concernant la fatigue radio-induite, une étude a rapporté que plus de 80% des patients atteints de tumeurs cérébrales primitives se plaignent de fatigue pendant le traitement. Cette fatigue est signalée dès la semaine suivant la première séance de RT et a tendance à augmenter en fonction du nombre de fractions (Armstrong et al., 2010). La fatigue qui survient pendant la RT peut également apparaître ou persister durant plusieurs années (Armstrong et al., 2010). Il a ainsi été observé que 39% des patients atteints de gliome de bas grade ont signalé une importante fatigue plus de 8 ans après la fin du traitement associant la RT post-chirurgicale à une chimiothérapie concomitante (Armstrong et al., 2010; Asher et al., 2016).

La fatigue étant un symptôme relevant d'une expérience subjective, il est indispensable d'utiliser des outils d'évaluation fiables et validés pour évaluer de manière appropriée et systématique ce problème clinique. La fatigue est souvent associée à d'autres symptômes du cancer, il apparaît donc intéressant d'utiliser un outil d'évaluation multi-symptomatique pour identifier soigneusement et bien quantifier la fatigue chez les patients.

Certaines de ces évaluations globales multi-symptomatiques peuvent ainsi aider à identifier d'autres symptômes associés et contributifs tels que le manque de sommeil, le manque d'appétit ou la dépression. Les outils les plus fréquemment utilisés pour quantifier la fatigue sont l'évaluation des symptômes d'Anderson (*Edmonton Symptom and Assessment System : ESAS*) ou encore la liste de contrôle des symptômes de Rotterdam.

Ainsi, la fatigue ne doit pas être considérée comme un symptôme isolé avec une cause fondamentale mais comme un signe clinique complexe lié à la gravité d'autres symptômes et ayant potentiellement différentes étiologies (Armstrong et al., 2010). De plus, la fatigue intègre à la fois des sensations physiques (manque d'énergie, lourdeur des membres) et mentales (se sentir épuisé émotionnellement, mentalement) à différencier des altérations du fonctionnement physique (manque de force ou d'endurance) et/ou cognitif (problèmes de mémoire, incapacité à se concentrer ou à penser clairement) (Barsevick et al., 2010).

III-1.2 Déficits cognitifs

Malgré son importance thérapeutique incontestée, la RT endommage inévitablement le cerveau et affecte la cognition (Makale et al., 2017). Comme décrit précédemment, le principal objectif de la RT est de détruire les cellules tumorales tout en infligeant le moins de dommages possibles aux tissus sains environnants. Cela n'est malheureusement pas souvent réalisable, notamment dans le cas d'une irradiation du corps entier ou du de l'ensemble du cerveau. Il est bien établi que les anomalies neurocognitives observées après RT cérébrale représentent un effet secondaire néfaste majeur, en particulier chez les enfants, et peuvent se manifester plusieurs mois à plusieurs années après l'irradiation (Pazzaglia et al., 2020). Le déclin cognitif se manifeste principalement par une atteinte des fonctions cortico-frontales, des déficits progressifs de la vitesse d'exécution, de l'attention, des capacités d'apprentissage, du rappel d'information, des fonctions exécutives ainsi qu'un déclin de la coordination motrice fine (Gérard et al., 2017).

La littérature scientifique indique que 50 à 90% des individus avec une tumeur cérébrale et survivants plus de 6 mois après avoir reçu une RT cérébrale présentent un dysfonctionnement cognitif souvent progressif et handicapant. celui-ci est observé aussi bien avec un protocole d'irradiation fractionnée sur cerveau entier qu'avec une irradiation partielle du cerveau (Greene-schloesser & Robbins, 2012; Makale et al., 2017). Ce chiffre peut en partie s'expliquer par le fait que les patients traités pour une tumeur cérébrale survivent plus

longtemps grâce aux progrès techniques des irradiateurs et des plans de traitement ainsi qu'à la mise en place des thérapies systémiques telle la chimiothérapie (Greene-schloesser & Robbins, 2012).

Les troubles cognitifs, associés au cancer et son traitement, se manifestent d'abord par une altération de la mémoire (Gérard et al., 2017), avec une diminution de la mémoire verbale, de la mémoire spatiale, de l'attention et de l'habilité à résoudre des problèmes avec une incidence et une sévérité qui augmentent avec le temps (**Figure 32**). Ces déficits cognitifs progressent ainsi jusqu'à la démence chez 2 à 5% des survivants à long terme. Les patients présentent alors une perte progressive de la mémoire, une ataxie (trouble de la coordination des mouvements) ainsi qu'une incontinence urinaire (Greene-schloesser & Robbins, 2012; Li et al., 2017). La plupart des troubles cognitifs apparaissent relativement tardivement (entre 12 et 24 mois) et peuvent ne pas être relevés lors des évaluations précoces. Ces troubles évoluent en deux temps : une première phase s'étend jusqu'à 4 mois après RT, les troubles semblent alors réversibles mais, au-delà du quatrième mois, les troubles deviennent irréversibles (Gérard et al., 2017).

Cependant, la sévérité du dysfonctionnement cognitif spécifiquement induit par la RT est controversée. En effet, les données disponibles à travers le monde sont limitées, souvent confondues avec un traitement par chimiothérapie et la progression de la maladie qui affectent également les fonctions cognitives (Attia et al., 2014). De plus, le vieillissement en lui-même, physiologique, est associé à des modifications cognitives et un déclin fonctionnel qui peuvent avoir un impact significatif sur l'autonomie du sujet. Chez les patients âgés atteints de cancer, plusieurs facteurs tels que les processus biologiques sous-jacents à la maladie ainsi que les thérapies contribueront à favoriser le déclin cognitif (Lange et al., 2014). Les auteurs parlent de « *chemobrain* » ou « *chemofog* », ce qui fait référence initialement à l'altération de la mémoire, de la fonction exécutive ou de la vitesse de traitement de l'information induite par la chimiothérapie mais ce terme est également employé pour parler des troubles radio-induits, d'où la confusion résultant des différentes études. Il existe différents tests de dépistage couramment utilisés en clinique comme par exemple :

- Le MMSE (*Mini Mental State Examination*) est un examen de la cognition globale peu spécifique. Lange et al. insistent sur le fait que l'évaluation gériatrique en oncologie devrait inclure des tests de dépistage plus sensibles que celui-ci, et si nécessaire,

ceux-ci devraient être complétés par une évaluation plus détaillée des troubles subtiles (Lange et al., 2014). En effet, créé pour dépister une démence, ce test n'est pas assez sensible et spécifique pour les domaines cognitifs les plus touchés par la RT et le résultat peut rester inchangé malgré une altération de la mémoire chez les patients avec des MC par exemple (Olson et al., 2008).

- Le MoCA (*Montreal Cognitive Assesement*) est plus sensible que le MMSE pour détecter une déficience cognitive légère ou un état clinique intermédiaire. De plus, le MoCA s'effectue rapidement ce qui permet de diminuer l'influence de la fatigue du patient sur les résultats. Disponible dans plus d'une douzaine de langues, le MoCA évalue également la fonction exécutive, la fonction visuo-spatiale, le nouvel apprentissage, l'attention et l'abstraction, de façon plus approfondie que le MMSE (Olson et al., 2008). Ainsi, Olson *et al.* ont montré que sur une population de patients présentant des MC et traités par irradiation panencéphalique, 80% des patients présentaient des altérations cognitives après évaluation par le MoCA contre 30% par le MMSE. Le MoCA permet donc de fournir rapidement (environ 10 minutes) des informations supplémentaires par rapport au MMSE (Gérard et al., 2017; Olson et al., 2008).

- Le HVLt-R (*Hopkins Verbal Learning Test-Revised*) évalue l'apprentissage verbal et la mémoire (Jacob et al., 2018).

- L'AVLT (*Auditory Verbal Learning test*) est un test d'apprentissage verbal et auditif (Jacob et al., 2018; Pospisil et al., 2017).

- Le BVMT-R (*Brief Visuospatial Memory Test-Revised*) permet de tester spécifiquement la mémoire visuo-spatiale (Pospisil et al., 2017).

De nombreuses fonctions cognitives ont ainsi été évaluées à l'aide de ces différents tests neuropsychologiques. Par exemple, à partir d'analyses dosimétriques sur l'hippocampe, différents paramètres ont été quantifiés comme la dose moyenne (D_{mean}), la dose maximale (D_{max}) ainsi que les volumes à 30% (V_{30}), 50% (V_{50}) sur un seul hippocampe, les deux hippocampes ou le PRV hippocampique (PRV : *planning organ at risk volume* ou planification du volume à risque). Les données disponibles suggèrent que des compensations hippocampiques pourraient réduire le risque de dysfonctionnement cognitif tardif et de la mémoire. De plus, l'épargne hippocampique permet de réduire significativement le déclin cognitif moyen observé 4 mois après RT et évalué à l'aide de l'HVLt-R (Jacob et al., 2018). Bien

que les données cliniques publiées soient hétérogènes de par l'utilisation de différents tests cognitifs, ces données ont tendance à mettre en évidence la sensibilité de la substance blanche vis-à-vis de la RT. La neurophysiologie de certaines zones, principalement le cingulum, le corps calleux, le fornix mais aussi la substance blanche présente au niveau du cervelet, pourrait être significativement modifiée par la RT de manière dose-dépendante (Jacob et al., 2018).

D'autres évaluations peuvent indirectement refléter les lésions hippocampiques radio-induites telles que l'indépendance fonctionnelle² ou la qualité de vie³. Pour certains auteurs, la détérioration des résultats obtenus dans des tests de mémoire pourrait précéder la dégradation de ceux obtenus à l'aide de questionnaires de qualité de vie (Gérard et al., 2017).

En dépit de l'intérêt grandissant de la recherche pour les déficits cognitifs radio-induits, la physiopathologie sous-tendant le développement de ce syndrome reste peu comprise et il n'y a aucune mesure préventive efficace ou de traitement à long terme (Makale et al., 2017). En effet, les patients qui développent des effets secondaires liés à la RT ont peu d'options thérapeutiques. Comme cela sera présenté dans la dernière partie de l'introduction, des médicaments neuroprotecteurs ont été étudiés mais ne sont pas utilisés en routine clinique (Garbow et al., 2018). La prise en charge multidisciplinaire des patients nécessite la prise en compte des informations cliniques, radiologiques et biologiques (Jacob et al., 2018). En effet, l'oncologie accorde à présent une plus grande importance à la qualité de vie des patients et le déclin cognitif induit par la RT érode la perception de qualité de vie des patients comme l'a révélé un questionnaire de la section cognitive de l'Organisation européenne pour la recherche et le traitement du cancer. L'OMS décrit la santé comme un « état de complet bien-être physique, mental et social et pas simplement l'absence de maladie ou d'infirmité ». C'est pourquoi le groupe de travail RANO (*Response Assessment in Neuro-Oncology*) recommande que les résultats neurocognitifs soient considérés comme l'un des principaux critères d'évaluation des essais cliniques sur les tumeurs cérébrales (Makale et al., 2017).

² Indépendance fonctionnelle évaluée à l'aide de l'ALD (*Activity of Daily Living*) et de l'IALD (*Instrumental Activities of Daily Living*).

³ Qualité de vie évaluée à l'aide des questionnaires de qualité de vie QLQ-C30 et QLQ-BN20 ou à partir de l'indice de Barthel de l'activité quotidienne mesuré avec l'ALD et le FACT-Br (*Functional Assessment of Cancer Therapy General*).

III-2 Etudes précliniques de la neurotoxicité radio-induite

L'évaluation préclinique des thérapies anticancéreuses, en particulier la RT, passe par l'utilisation d'outils se rapprochant le plus possible de la situation clinique. Il y a une dizaine d'années, de nombreuses études précliniques sur les effets de l'irradiation reposaient sur des irradiations corps entier par manque d'outils adaptés et pouvaient cibler des organes en particulier en plaçant des dispositifs de plomb de part et d'autre du champ d'irradiation. Récemment, des systèmes d'irradiation spécifiquement dédiés aux petits animaux ont été développés pour appuyer la recherche dans ce domaine. Il en existe différents modèles tels que le X-RAD SmART (*PrecisionX-Ray*, Connecticut, USA), le SARRP (*Small Animal Radiation Research Platform* : Xstrahl, Camberley, Royaume Uni) ou encore le système SAIGRT (*Small Animal Image-Guided Radiation Therapy*, collaboration entre le centre OncoRay, l'hôpital universitaire Carl Gustav Carus et le centre Helmholtz Dresden-Rossendorf, Dresde, Allemagne) (**Figure 34**). Ces irradiateurs ont été conçus pour permettre une irradiation partielle du corps très précise et ainsi cibler de très petits volumes.

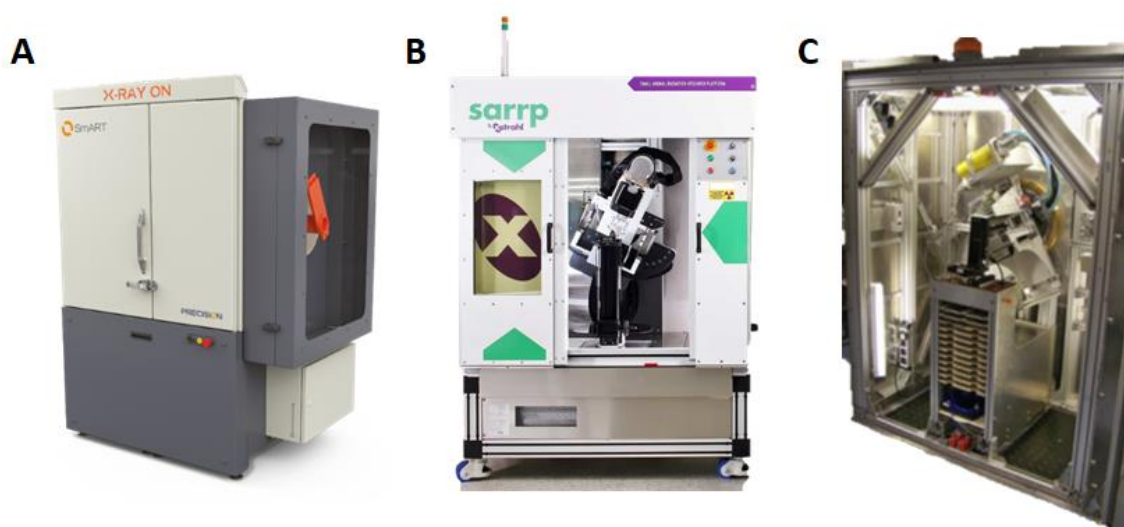


Figure 34 : Irradiateurs précliniques dédiés aux petits animaux. (A) XRad SmART (utilisé sur la plateforme CYCERON) ; (B) SARRP xstrahl ; (C) SAIGRT (Tillner, et al., 2014).

Cependant, ces systèmes très coûteux se retrouvent principalement dans des centres spécialisés et requièrent l'utilisation préalable d'un système de planification du traitement (TPS, *Treatment Planning System*) (Hartmann et al., 2016) dans le but d'irradier avec précision la zone cible tout en épargnant les OAR et de s'assurer de la dose déposée. Bien que ces irradiateurs dédiés à la recherche préclinique ne soient pas encore utilisés de manière universelle, ils apparaissent essentiels pour la mise en place d'un traitement de haute-

précision, mimant au mieux les conditions observées en clinique et ces outils pourraient permettre d'homogénéiser les recherches précliniques sur les toxicités de la RT.

III-2.1 Modèles animaux

Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux effets secondaires des traitements anticancéreux observés en clinique, différents modèles animaux ont été développés. En recherche biomédicale, les rongeurs tels que les rats et les souris sont les animaux les plus fréquemment utilisés. Ceci s'explique par leur patrimoine génétique bien connu et leur degré d'homologie avec celui des humains (70%), mais aussi leur anatomie, leur facilité d'hébergement et de reproduction ainsi que leur faible coût (Li et al., 2017). Les souris sont particulièrement très utilisées en radiobiologie du fait de cette grande homologie génétique avec les humains mais également parce qu'elles sont faciles à manipuler. Cependant, la petite taille de leur cerveau rend difficile la localisation précise de zones cibles et peut conduire à une distribution inégale des doses. De plus, les souris sont trop fragiles pour supporter des anesthésies répétées dans le cas d'un suivi à long terme. C'est pourquoi, les rats apparaissent être plus pertinents que les souris pour générer des modèles animaux de lésions cérébrales radio-induites (Li et al., 2017). Cependant, il existe d'autres modèles de troubles radio-induits comme la truite ou le poisson-zèbre (Smith et al., 2018) ou certains primates non-humains tels que les macaques rhésus (Andrews et al., 2017).

Les données expérimentales indiquent que les rongeurs présentent des changements anatomiques et des mécanismes physiopathologiques similaires à ceux retrouvés chez l'Homme après une irradiation cérébrale. Les changements anatomiques et fonctionnels relevés chez les rongeurs après irradiation cérébrale dépendent évidemment de la dose mais aussi de l'âge et du sexe, ce qui correspond aux facteurs de risque retrouvés chez les patients (De Guzman et al., 2015; Li et al., 2017). En outre, de par leur courte espérance de vie, l'évaluation des effets des RI sur les rongeurs peut être réalisée sur des périodes relativement courtes : des semaines à des mois et non des années voire des décennies comme c'est le cas chez l'Homme. Comme illustré dans la méta-analyse de Tomé *et al.* Réalisée à partir de plusieurs études précliniques chez la souris et le rat, des déficits cognitifs peuvent apparaître très précocement ou plus tardivement en fonction de l'âge au moment de l'irradiation (**Figure 35**) (Tomé et al., 2015).

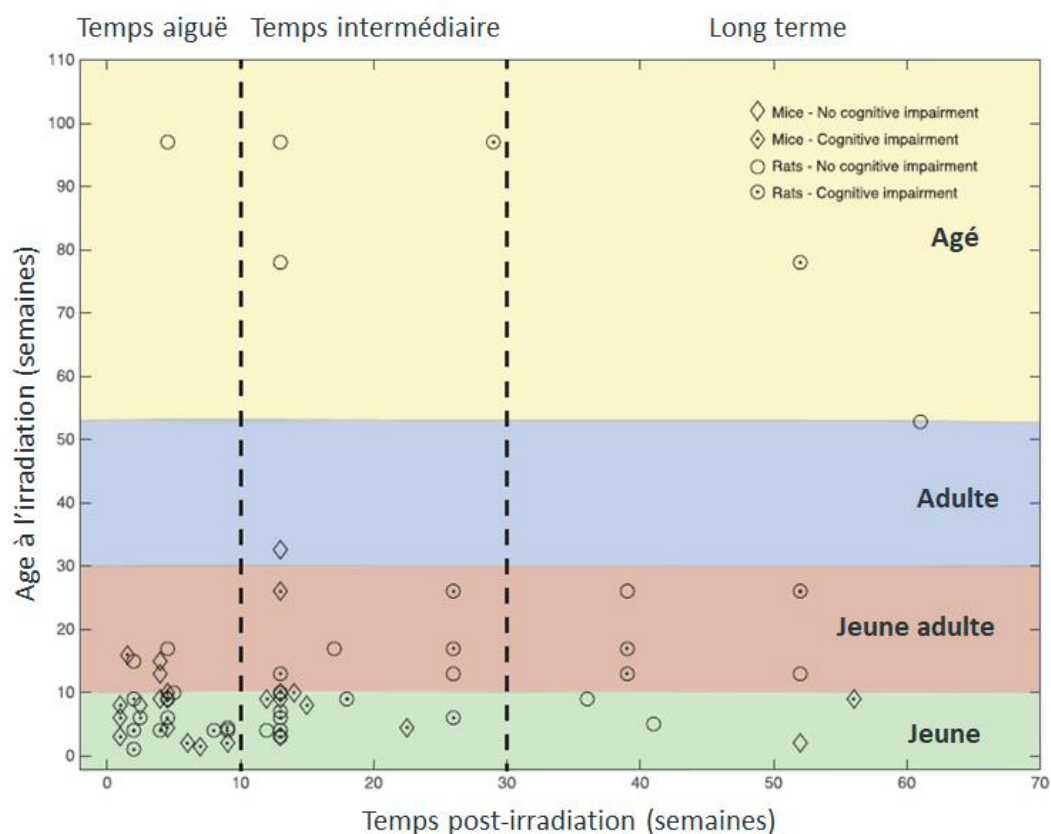


Figure 35 : Méta-analyse d'études précliniques évaluant les déficits neurocognitifs à l'aide de divers tests comportementaux chez la souris et le rat. Les données sont présentées en fonction de l'âge au moment de l'irradiation et du temps de suivi après irradiation (Tomé et al., 2015).

Guzman et collaborateurs ont ainsi tiré avantage de la courte espérance de vie des souris pour étudier les effets de l'irradiation à différents âges sur le développement cérébral. A partir d'études IRM réalisées *ex vivo* et des analyses de type VBM (*voxel based-morphometry*), ils ont montré qu'une exposition à 7 Gy à l'âge de 16 jours induit des réductions de volume cérébral, largement atténués par l'augmentation de l'âge au moment du traitement ou la diminution de la dose employée. Les auteurs ont toutefois noté certaines exceptions au niveau des bulbes olfactifs et de l'hippocampe. En effet, ces régions présentaient une différence de volume détectable et une perte de neurogenèse pour la plupart des âges et doses étudiés. De plus, les régions de la substance blanche situées à l'avant du cerveau sont restées sensibles à l'irradiation pour des âges plus avancés au moment du traitement que les régions postérieures. En revanche, les différences dues au sexe étaient subtiles, avec une radiosensibilité accrue chez les femelles détectable uniquement dans les corps mamillaires et le fornix (**Figure 36**) (De Guzman et al., 2015).

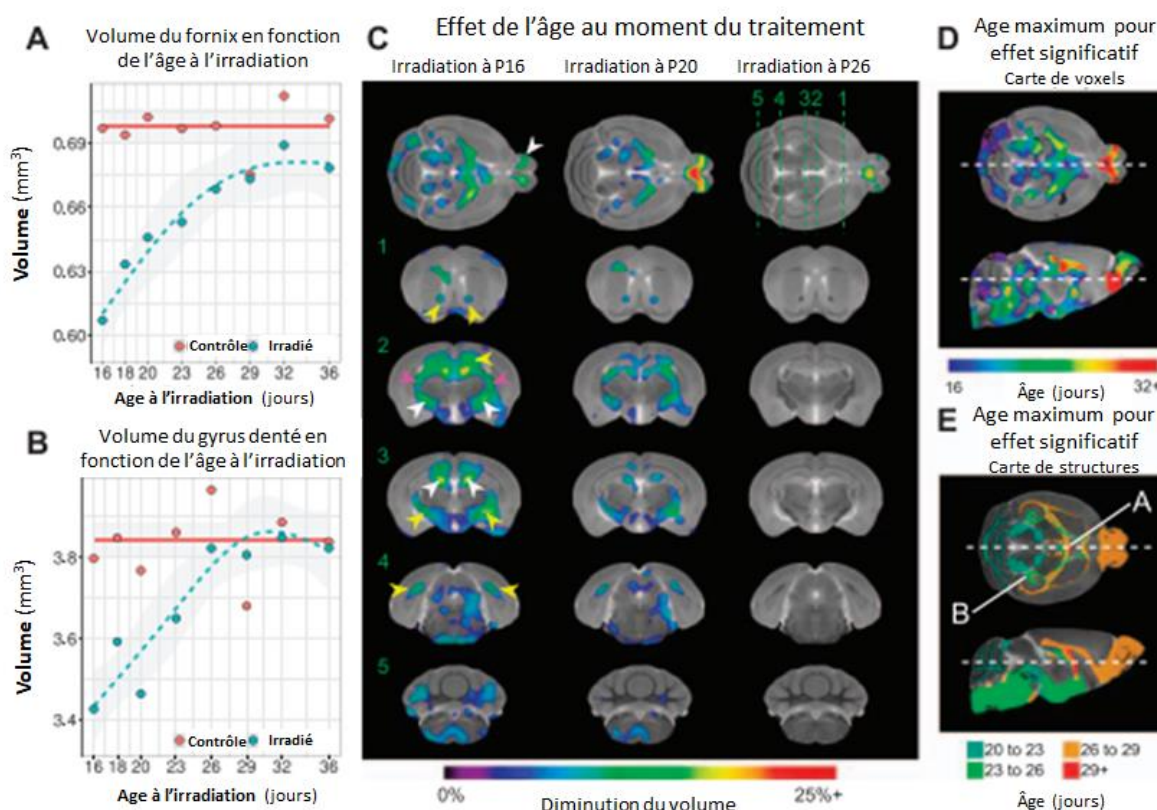


Figure 36 : Impact de l'irradiation lors du développement cérébral chez des souris : effets de l'âge et de la dose d'irradiation. (A-B) : volume moyen de la structure (A, fornix ou B, gyrus denté de l'hippocampe) en fonction de l'âge au moment de l'irradiation pour les souris témoins (roses) et irradiées (bleues). (C) A partir d'IRM T2 réalisées ex vivo chez des souris irradiées âgées de 16, 20 et 26 jours, les images obtenues ont été moyennées et recalées sur un cerveau standard (template) puis des analyses de type VBM (voxel based-morphometry) ont été réalisées – Représentation statistique des voxels significatifs et quantification des modifications de volume représentées par un code couleur. A ce niveau de signification, aucune différence n'a été relevée pour les expositions à des âges supérieurs à 26 jours. Les régions qui semblent particulièrement sensibles à l'irradiation au début du développement sont la commissure antérieure (flèches jaunes, image 1), la capsule interne (flèches blanches, image 2), le stria terminalis (flèches roses, image 2), le corps calleux (flèches jaunes, images 2 et 4), le gyrus denté (flèches blanches, image 3), le pédoncule cérébral (flèches jaunes, image 3) et la substance blanche cérébelleuse (image 5). Les bulbes olfactifs continuent d'être sensibles à l'irradiation à des stades ultérieurs de développement. (D-E) A partir d'IRM T2 réalisées ex vivo chez des souris irradiées à différents âges, les modifications de volumes ont été analysées par approche VBM – Représentation statistique des modifications de volumes les plus importantes entre les souris irradiées et témoins selon l'âge des souris (D) ou selon la structure étudiée, ici la substance blanche (E) ($p < 0,05$) (De Guzman et al., 2015).

Dans les modèles précliniques, l'irradiation est réalisée sur cerveau entier ou dans une région cérébrale localisée suivant un schéma d'irradiation unique ou fractionné et avec des doses très variables d'une étude à l'autre (Li et al., 2017; Yang et al., 2017). Néanmoins, la dose d'irradiation, le fractionnement et le volume ciblé ou encore le débit de dose jouent un rôle clef dans les lésions radio-induites. A noter que le principal effet du débit de dose s'observe entre 1 Gy/minute et 0,1 Gy/heure. Les dommages induits par les rayons X diminuent continuellement à mesure que le débit de dose diminue dans cette plage (Yang et al., 2017). La réduction des dommages en fonction d'une réduction du débit de dose s'explique par deux processus : (1) la réparation des lésions intracellulaires et (2) la prolifération cellulaire en mesure de se poursuivre pendant l'irradiation (Yang et al., 2017).

Grâce aux différents modèles animaux de radiotoxicité cérébrale, les différents mécanismes conduisant aux atteintes du tissu cérébral et, *in fine*, aux déficits cognitifs sont de mieux en mieux compris. Les études précliniques sur la neurotoxicité radiative ont permis de mettre en évidence des changements épigénétiques et histopathologiques ou encore l'apoptose cellulaire, l'altération de la prolifération et de la différenciation cellulaire, la présence d'une neuroinflammation ainsi que d'autres événements déclenchés par l'exposition aux rayons X, lesquels peuvent être étudiés à la fois aux niveaux moléculaire, cellulaire et tissulaire (**Figure 37**) (Yang et al., 2017). Certains de ces mécanismes seront présentés et discutés dans le paragraphe « III-2.3 Physiopathologie de la radiotoxicité cérébrale, page 104 ».

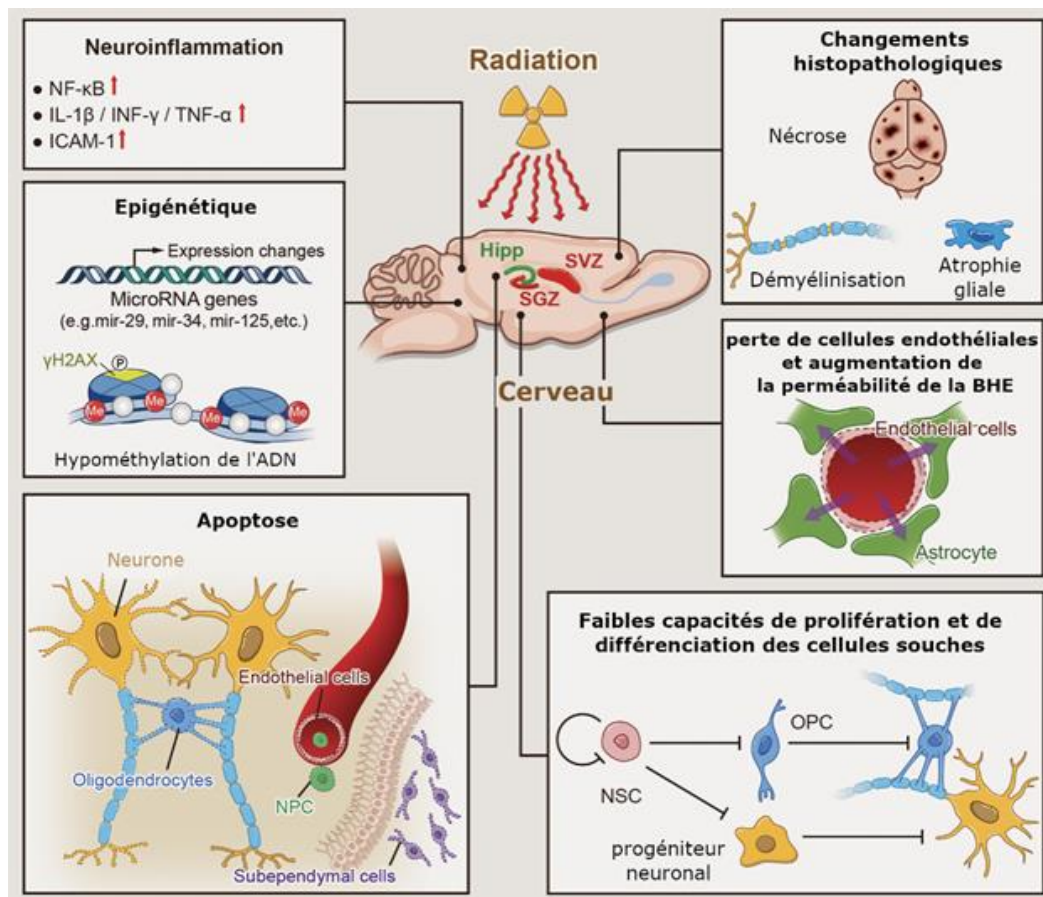


Figure 37 : Représentation schématique des principales réponses cérébrales physiopathologiques induites par l'irradiation. (A) Neuroinflammation associée à une expression accrue du facteur de transcription, NF- κ B, ainsi que des cytokines IL-1 β , TNF- α , INF- γ et de la molécule d'adhésion, ICAM-1. (B) Altérations épigénétiques associées à des changements dans les niveaux d'expression des microARN, augmentation des niveaux de phosphorylation de γ H2AX et hypométhylation de l'ADN. (C) Apoptose radio-induite des oligodendrocytes, des cellules sous-épendymaires et de certains types de neurones. (D) Faibles capacités de prolifération et de différenciation des cellules souches et progéniteurs neuronaux. (E) Perte de cellules endothéliales et augmentation de la perméabilité de la BHE. (F) Modifications histopathologiques, notamment nécrose cellulaire, atrophie gliale et démyélinisation. Abréviations : NSC = cellule souche neurale ; OPC = cellule progénitrice d'oligodendrocyte (Yang et al., 2017).

III-2.2 Déficits comportementaux observés dans les modèles animaux

Comme vu précédemment, l'irradiation cérébrale induit, entre autres, des dommages hippocampiques pouvant être corrélés à l'observation d'un déclin neurocognitif. Ces troubles cognitifs peuvent être observés sans signe de démyélinisation ou de nécrose de la substance blanche. Néanmoins, ces déficits peuvent être détectés par la mise en place de diverses analyses comportementales, en particulier des tests cognitifs (Li et al., 2017). Il existe différentes manières d'évaluer les fonctions comportementales chez les rongeurs, y compris les fonctions cognitives, motrices ou encore l'anxiété et la dépression.

III-2.3.1 Etude des fonctions cognitives

Les fonctions cognitives peuvent être étudiées à travers différents tests comportementaux comprenant plusieurs critères d'évaluation (Li et al., 2017). Elles comprennent notamment la mémoire, l'attention, les fonctions exécutives (l'inhibition, la planification, ou encore la résolution de problème), les fonctions visuo-spatiales indissociables de la perception et enfin la cognition sociale. La mémoire représente l'ensemble des activités mentales, faisant intervenir des circuits neuronaux différents, permettant de capter, coder, stocker et restituer des informations. Tout comme chez l'Homme, différents types de mémoire se distinguent chez les rongeurs. Le processus de mémorisation débute avec la perception d'informations entrantes ce qui peut se traduire par une mémoire sensorielle (**Figure 38**). Ces stimuli vont alors pouvoir être encodés, c'est la mémoire à court-terme, puis ensuite être consolidés en mémoire à long-terme. Ils peuvent également être directement encodés/consolidés en mémoire à long-terme (**Figure 38**). L'encodage d'une information correspond à son acquisition. Les mémoires à court et long-terme vont ensuite pouvoir être soumises à un rappel (**Figure 38**). Les performances des individus lors d'une tâche de rappel peuvent être mesurées afin de quantifier les déficits ou gains de la fonction mnésique.

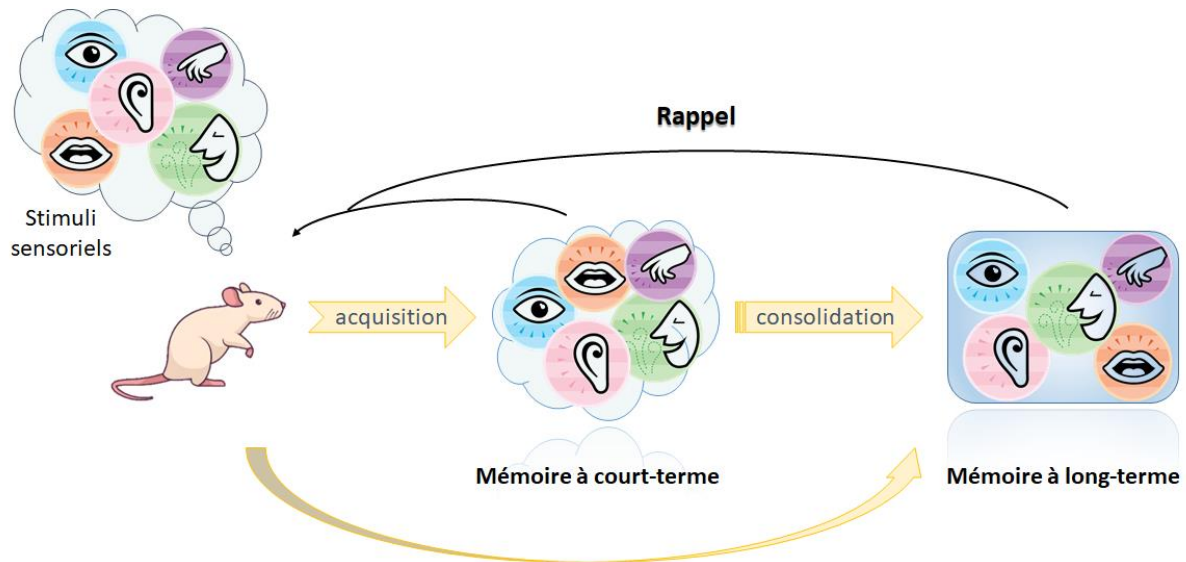


Figure 38 : Schéma du processus de mémorisation se mettant en place suite à différents stimuli (visuels, olfactifs, auditifs...)

La mémoire se subdivise en mémoire implicite et explicite :

- La **mémoire implicite** rend compte de la mémoire procédurale (habitudes, habiletés motrices). Elle peut être évaluée grâce à des tests faisant appel à un apprentissage associatif (conditionnement) ou non associatif (réflexes) (**Figure 39**).
- La **mémoire explicite** fait, elle, référence à la mémoire « de type épisodique » et à la mémoire « de référence ». Elle peut être évaluée à travers des tests avec des apprentissages « cognitifs » spatiaux ou non spatiaux. Ces apprentissages peuvent être réalisés sous forme d'une présentation en une seule épreuve (ex. test de reconnaissance d'objets) ou avec une répétition de la tâche (ex. piscine de Morris) (**Figure 39**).

Ces mémoires peuvent être évaluées par différents tests comportementaux qui sont décrits ci-dessous ainsi que les effets de l'irradiation cérébrale obtenus avec ces tests.

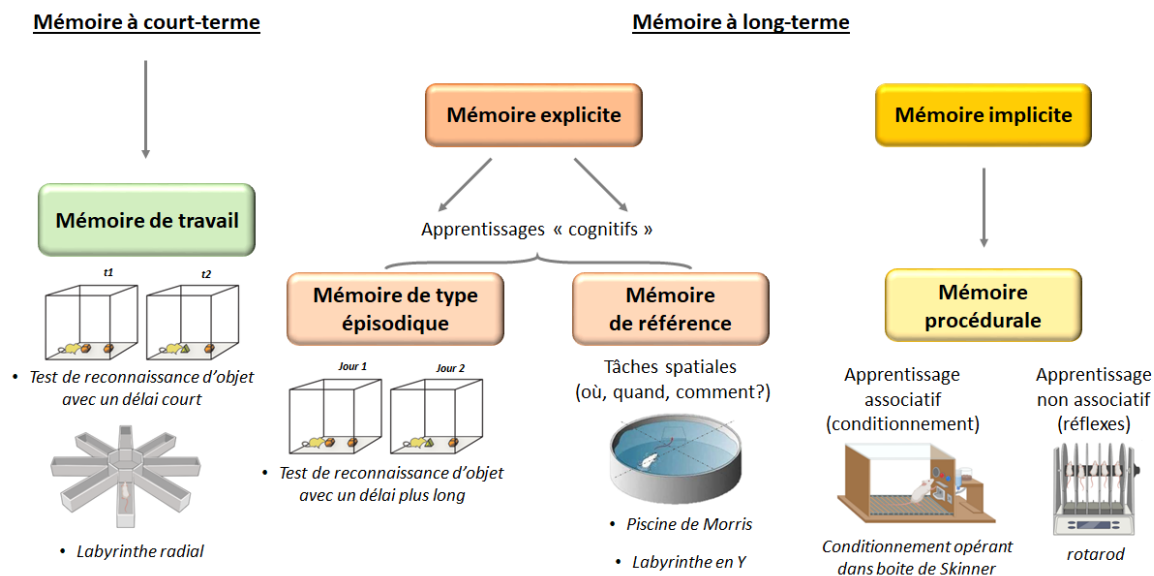


Figure 39 : Schématisation des différents types de mémoire retrouvés chez le rongeur et les tests comportementaux associés pour les évaluer.

• Evaluation de la mémoire implicite (apprentissage associatifs)

Test de conditionnement de peur

Le test de conditionnement de peur contextuel ou indicé est régulièrement employé dans les études évaluant les effets de l'irradiation. Dans cette tâche, les animaux apprennent à associer un stimulus conditionnel (le contexte environnemental ou un signal sonore discret) à un léger choc électrique au niveau des pattes (stimulus non conditionnel). Le conditionnement de peur contextuel est considéré comme dépendant de l'hippocampe et de l'amygdale tandis que le conditionnement de la peur à un signal est considéré comme dépendant de l'amygdale uniquement. Le *freezing* observé après l'exposition est défini comme l'immobilité somatomotrice, à l'exception de la respiration. Il est considéré comme une réaction de peur post-exposition et est un indicateur de la peur conditionnée largement utilisé (McGinnis et al., 2017).

En 2016, Ngen et son équipe ont évalué grâce à un conditionnement de peur la mémoire à court-terme d'une part et la mémoire à long-terme d'autre part. Ils ont ainsi montré en comparant les schémas de *freezing* des animaux testés qu'il y avait des atteintes significatives de la mémoire à court-terme deux semaines après irradiation. En effet, avant irradiation focalisée sur l'hippocampe, les schémas de *freezing* étaient plus importants dans la première minute du test (**Figure 40 A**), la mémoire à court-terme était donc bien préservée. En revanche, deux semaines après irradiation, les schémas de *freezing* observés étaient

significativement plus faibles (**Figure 40 A**). Néanmoins aucun changement significatif de la mémoire à long terme n'a été observé durant l'étude (**Figure 40 B**) (Ngen et al., 2016).

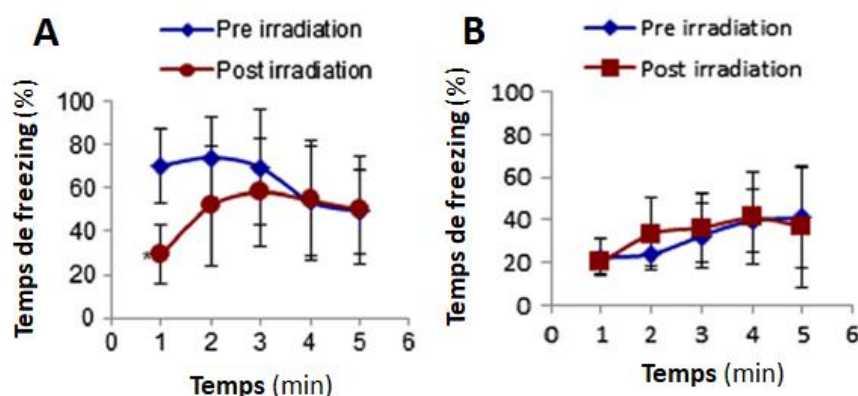


Figure 40 : Evaluation de la mémoire implicite chez la souris par le test de conditionnement de peur réalisé avant et deux semaines après irradiation focalisée de l'hippocampe (80 Gy). (A) Comparaison des changements de comportement de freezing des souris durant le test de mémoire contextuelle à court-terme avant irradiation et 2 semaines après irradiation ($n = 10$; $p < 0,05$). (B) Comparaison des changements de comportement de freezing des souris dans le test de mémoire contextuelle à long-terme avant et 2 semaines après irradiation ($n = 10$) (Ngen et al., 2016).

Evitement actif/passif

Le dispositif du test de l'évitement actif et passif est composé d'une chambre claire et d'une chambre sombre, toutes deux séparées par une porte à commande électrique. Ce dispositif permet d'évaluer la capacité de l'animal à associer un stimulus négatif (choc électrique au niveau des pattes) à un environnement spécifique vers lequel il va naturellement (compartiment sombre). La latence pour changer de compartiment, vers le compartiment sombre dans le cas de l'évitement passif ou vers le compartiment clair dans le cas de l'évitement actif, est le paramètre le plus utilisé. Une latence réduite pour entrer dans le compartiment sombre lors du test de l'évitement passif ou une latence accrue pour entrer dans le compartiment clair lors du test de l'évitement actif indiquent une altération de la mémoire associative (Ji et al., 2014; Li et al., 2017; Warrington et al., 2012).

Pour évaluer les effets de l'irradiation cérébrale sur la mémoire implicite, Warrington et ses collègues soumettent des souris à une tâche d'évitement actif un et trois mois après irradiation globale de cerveau (WBRT). Les résultats de l'étude montrent qu'un mois après irradiation, les animaux irradiés mettent plus de temps à s'échapper vers la chambre lumineuse traduisant une altération de la mémoire associative (**Figure 41 A**). Trois mois après RT, l'étude a montré qu'il n'y avait pas d'effet significatif de l'irradiation sur ces performances mnésiques (**Figure 41 B**). Ces résultats indiquent une récupération de l'apprentissage

contextuel 3 mois après une irradiation fractionnée du cerveau entier (Warrington et al., 2012).

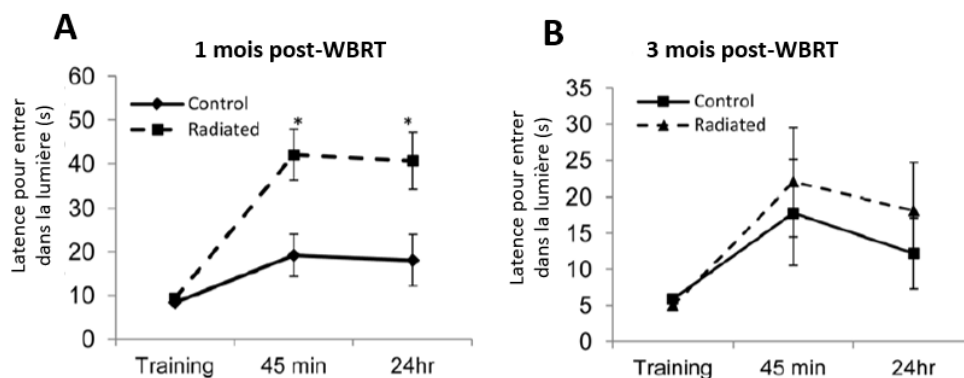


Figure 41 : Déficits mnésiques implicites transitoires dans l'apprentissage contextuel induits par l'irradiation cérébrale. (A) Un mois après irradiation du cerveau entier (36 Gy), les performances des animaux irradiés étaient significativement altérées par comparaison aux contrôles à 45min et 24h après l'entraînement. (B) 3 mois après irradiation, la récupération de la fonction d'apprentissage et de mémoire était évidente. Données en moyenne $\pm$ SEM. * $p < 0,0167$ vs contrôles (Warrington et al., 2012).

Dans le cas du test de l'évitement passif, le dispositif employé est sensiblement le même (il arrive que le compartiment sombre soit plus petit que le compartiment éclairé afin de renforcer l'attraction des rats ou souris pour celui-ci). Lors de la phase d'entraînement, chaque rat est placé dans le compartiment éclairé et reçoit un choc électrique punitif lorsqu'il pénètre dans le compartiment sombre. Puis, 24h plus tard, le rat est replacé dans la chambre claire du dispositif et les temps de latence pour entrer dans le compartiment obscur sont enregistrés. Une latence maximale autorisée dans la session de rétention est généralement appliquée.

Dans l'étude de Ji et collaborateurs, les effets de l'irradiation cérébrale ont été évalués sur la rétention de la mémoire. Pour cela, en utilisant le test de l'évitement passif, ils laissent 5 min à l'animal pour changer de compartiment. Ainsi, 24h après irradiation, les rats ayant reçus une irradiation cérébrale de 30Gy ont montré une latence d'entrée réduite, suggérant alors que l'irradiation du cerveau entier a entraîné une altération de la rétention mnésique. Néanmoins, aucune différence significative n'a été trouvée entre les rats contrôles et les rats irradiés à 2Gy ou 10Gy (**Figure 42**) (Ji et al., 2014).

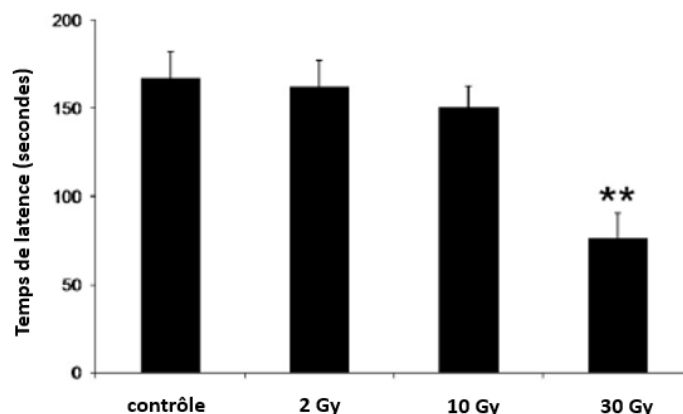


Figure 42 : Impact de l'irradiation cérébrale sur la mémoire de rétention évaluée à l'aide du test de l'évitement passif. Les données montrent que la mémoire de rétention, évaluée 24h post-irradiation, n'est pas altérée dans les groupes irradiés à 2 Gy et 10 Gy. Cependant, le comportement d'évitement passif est affecté de manière significative dans le groupe irradié à 30 Gy. Données représentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM ; $n = 8-10$ rats/groupe ; ** $p < 0,01$ vs contrôles (Ji et al., 2014).

- **Mémoire explicite : apprentissages « cognitifs » et fonctions visuo-spatiales**

Labyrinthe aquatique de Morris

Le labyrinthe aquatique, appelé aussi piscine de Morris, est un réservoir d'eau circulaire placé dans une salle faiblement éclairée. Des repères visuels sont placés autour de la pièce sur les murs comme points de référence externes. Le labyrinthe est divisé virtuellement en quatre quadrants. Une plateforme est placée dans l'une des quatre zones et immergée à 1 ou 1,5 cm sous la surface de l'eau (**Figure 43**) (Balentova et al., 2018; Ji et al., 2014). Le test se déroule en deux parties : (1) une phase d'apprentissage réalisée sur plusieurs jours consécutifs durant laquelle le rat doit apprendre à retrouver la plateforme immergée. Cette phase permet d'évaluer la navigation. (2) une phase d'évaluation de la mémoire de référence spatiale (*probe test*) durant laquelle la plateforme est retirée.

Dans les travaux de Ji et al., tous les animaux ont effectué 4 essais par jour pendant 4 jours pour le test de navigation. Le point de départ des animaux était différent d'un essai à l'autre et la durée maximale d'un essai était de 60s. Si l'animal trouvait la plateforme dans le temps imparti, il était autorisé à s'y reposer pendant 10s. Si l'animal ne parvenait pas à la trouver en 60s, les expérimentateurs le guidaient manuellement jusqu'à celle-ci et l'autorisaient à y rester également 10s avant l'essai suivant (Ji et al., 2014).

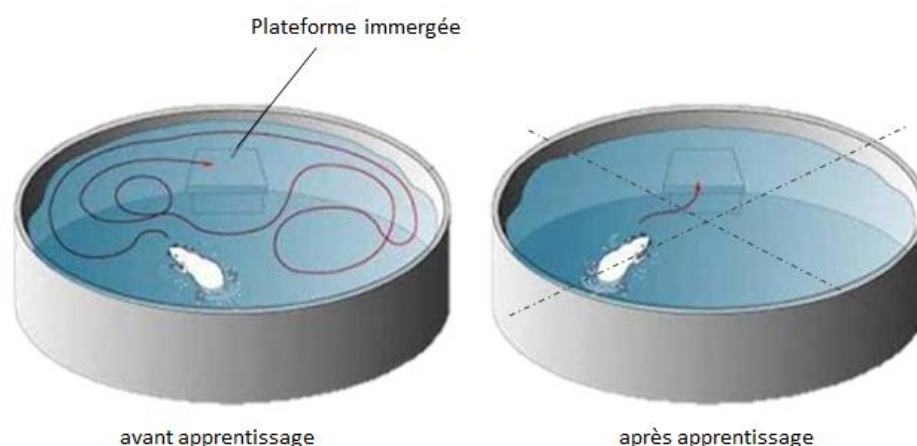


Figure 43 : Schéma du dispositif du labyrinthe aquatique de Morris. En rouge est représenté le tracé du chemin parcouru par le rat pour retrouver la plateforme avant apprentissage (à gauche) et après apprentissage (à droite).

Lors de l'évaluation de la navigation au cours de cette tâche, les trois paramètres couramment utilisés en recherche sont la latence pour rejoindre la plateforme, le chemin emprunté ainsi que la distance totale parcourue. La vitesse de nage est parfois également prise en considération. Chez les animaux sains, ces paramètres diminuent progressivement dans le temps car les animaux apprennent progressivement à trouver la plateforme cachée sous la surface de l'eau au cours de plusieurs essais réalisés pendant 4 à 5 jours consécutifs. Chez les rongeurs irradiés, ces items diminuent beaucoup plus lentement de façon moins importante ce qui nous indique que l'irradiation altère l'apprentissage spatial (Ji et al., 2014; Li et al., 2017).

Le probe test a lieu le 5^e jour. La plateforme est alors retirée et les animaux sont amenés à nager librement pendant 30s. Lors du test de mémoire de référence spatiale, les chercheurs notent le trajet total effectué jusqu'à la cible, le temps passé dans le quadrant cible et la distance parcourue jusqu'à la zone de la plateforme. Un plus faible ratio trajet jusqu'à la cible en fonction du trajet total et un faible temps passé dans le quadrant cible ainsi qu'une plus longue distance parcourue jusqu'à la zone de la plateforme indiquent une mémoire de référence altérée (Ji et al., 2014; Li et al., 2017). Dans l'étude de Ji et al., les auteurs ont mesuré des vitesses de nage similaires entre les groupes de rats irradiés et contrôles lors de la phase d'apprentissage. Néanmoins les rats irradiés à une dose de 30 Gy mettaient significativement plus de temps à s'extraire de l'eau en trouvant la plateforme par rapport aux rats contrôles. Les auteurs ont donc conclu qu'une irradiation du cerveau entier à une dose de 30 Gy induisait une altération significative de la mémoire de référence spatiale un mois après irradiation (Ji et al., 2014).

Labyrinthe radial aquatique

Le labyrinthe radial aquatique est constitué de 8 bras avec une plateforme refuge immergée à l'extrémité de l'un d'eux. Un colorant alimentaire est ajouté dans l'eau afin de la rendre opaque et dissimuler ainsi la plateforme. Des repères visuels distaux sont placés dans la pièce et des repères supplémentaires sont placés au bout des bras. Les mouvements des animaux sont enregistrés par un système de *video tracking* placé au-dessus du labyrinthe. À chaque essai lors de la phase d'apprentissage, les souris démarrent dans un bras ne contenant pas la plateforme et ont 1min pour trouver cette dernière. Toutes les souris passent alors 30s sur la plateforme après chaque essai avant de commencer l'essai suivant. Sur 3 jours d'entraînement, les souris améliorent progressivement leurs performances à mesure qu'elles apprennent les aspects procéduraux de la tâche. Une erreur est notée lorsqu'une souris entre dans un bras incorrect (les quatre pattes dans la moitié distale du bras). Lors du probe test, un taux d'erreur élevé traduit un déficit de la mémoire de référence spatiale.

L'apprentissage spatial et la mémoire de référence (mémoire à long terme) ont été étudiées chez la souris, en évaluant les performances dans le labyrinthe radial aquatique à 3 ou 6 mois après WBRT. Les résultats de cette étude suggèrent que l'irradiation altère les capacités d'apprentissage de façon précoce et tardive (**Figure 44**). De plus, les auteurs ont montré que la mémoire de référence était aussi négativement impactée sur le long court suite à la WBRT. L'étude souligne que ces données sont cohérentes avec le développement progressif d'une déficience cognitive induite par l'irradiation cérébrale (Ungvari et al., 2017).

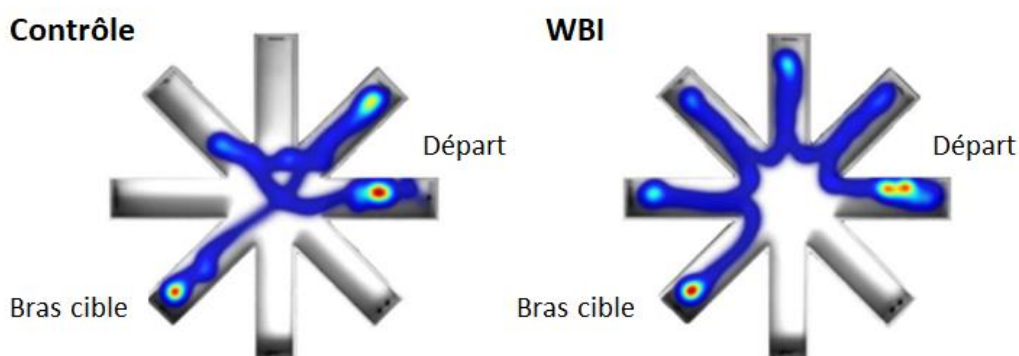


Figure 44 : L'irradiation du cerveau entier (WBI : whole brain irradiation) entraîne une altération des performances dans le labyrinthe aquatique radial chez la souris. Des souris traitées (WBI) et témoins (contrôle) d'âge comparable ont été testées dans ce dispositif 3 mois après irradiation (40 Gy). Les cartes thermiques ci-dessus représentent le pourcentage de temps passé dans les différents bras du labyrinthe pour un animal contrôle et un animal irradié sélectionnés au hasard au cours du 11^e jour de l'expérience (Ungvari et al., 2017).

Labyrinthe de Barnes

Le labyrinthe de Barnes est une version sans eau du labyrinthe aquatique de Morris. Il a été conçu pour atténuer le stress lié à la nage. Le dispositif se présente sous la forme d'une plateforme circulaire avec seize trous en périphérie. Un des trous conduit à une petite boîte qui représente un refuge pour l'animal. Lors de l'évaluation de l'apprentissage spatial, les souris sont habituées à la petite boîte permettant de s'extraire du labyrinthe. Lors du probe test, la boîte refuge est retirée et le nombre de coups de tête dans chaque trou est compté pendant 90s. Si les animaux se souviennent de l'emplacement où se trouvait précédemment la boîte, il faut s'attendre à ce que le nombre de coups de tête à cet endroit augmente.

En utilisant ce test, il a été montré que la RT cérébrale fractionnée (36 Gy répartis en 8 fractions de 4,5 Gy) induit des altérations transitoires de l'apprentissage contextuel et une détérioration progressive de l'apprentissage spatial chez la souris (Warrington et al., 2012).

Ces tests à l'aide des différents labyrinthes présentés font appel à la fois à la fonction mnésique et aux fonctions visuo-spatiales. Le terme de mémoire spatiale est parfois employé. Il existe cependant des tests permettant d'évaluer la mémoire de type épisodique sans composante spatiale comme le test de reconnaissance d'objet.

Test de reconnaissance d'objet

Lors du test de reconnaissance de l'objet nouveau, les animaux sont placés dans un *open field* contenant deux objets identiques et sont autorisés à les explorer librement pendant plusieurs minutes (3 à 15min selon les études). Après un temps de latence, souvent 24h, les animaux sont replacés dans l'enceinte mais cette fois, un des objets préalablement présenté (objet familier) a été remplacé par un nouvel objet. Le temps d'exploration de chacun des objets est alors mesuré. Un déficit cognitif est démontré par la diminution du temps d'exploration de l'objet nouveau et de l'indice de reconnaissance (temps d'exploration de l'objet nouveau/ temps d'exploration total des deux objets) (Li et al., 2017).

L'étude de Brown et collaborateurs publiée en 2016 indique que les rats irradiés présentent d'importantes déficiences lors du test de reconnaissance d'objet, et ce, quelle que soit la dose d'irradiation. Effectivement, chez le rat juvénile, les auteurs concluent que l'irradiation cérébrale avec des doses fractionnées cliniquement pertinentes (34 Gy répartis en plusieurs fractions de 1,8 Gy) induit peu d'anomalies de la mémoire de type épisodique

dans la phase subaiguë mais celle-ci est altérée tardivement, soit 7 mois après irradiation (Brown et al., 2016).

III-2.3.2 Etude de la fonction motrice

Tout comme les fonctions cognitives, il apparaît essentiel d'évaluer la fonction motrice, celle-ci étant susceptible d'être altérée par la RT. La fonction motrice peut être appréciée à travers deux paramètres : l'activité locomotrice et la coordination motrice.

- **Activité locomotrice**

L'*open field* peut être utilisé pour évaluer l'activité locomotrice. Ce dispositif se présente sous la forme d'une enceinte carrée dans laquelle le rat peut se déplacer librement pendant 10 à 15min. Les mouvements de chaque rat (ou souris) sont ensuite suivis automatiquement à l'aide d'un système de *video-tracking*. Les auteurs relèvent souvent la distance totale parcourue ainsi que la vitesse de déplacement (Ghafouri et al., 2016; Ji et al., 2014). Une diminution du nombre de déplacements ou de la distance totale parcourue représente une diminution de l'activité locomotrice. Dans certaines études, le nombre d'arrêts et de redressements sont également utilisés pour évaluer l'activité locomotrice (Li et al., 2017).

Dans un modèle de rat juvénile, âgés de 28 jours, exposés ou non à une dose d'irradiation de 27 Gy (répartie en 9 fractions quotidiennes de 3 Gy) ou une dose unique de 34 Gy, il a été montré que l'irradiation sur cerveau entier n'affecte pas la réponse motrice lors de la phase subaiguë (3 mois post-WBRT) (Brown et al., 2016) (**Figure 45**).

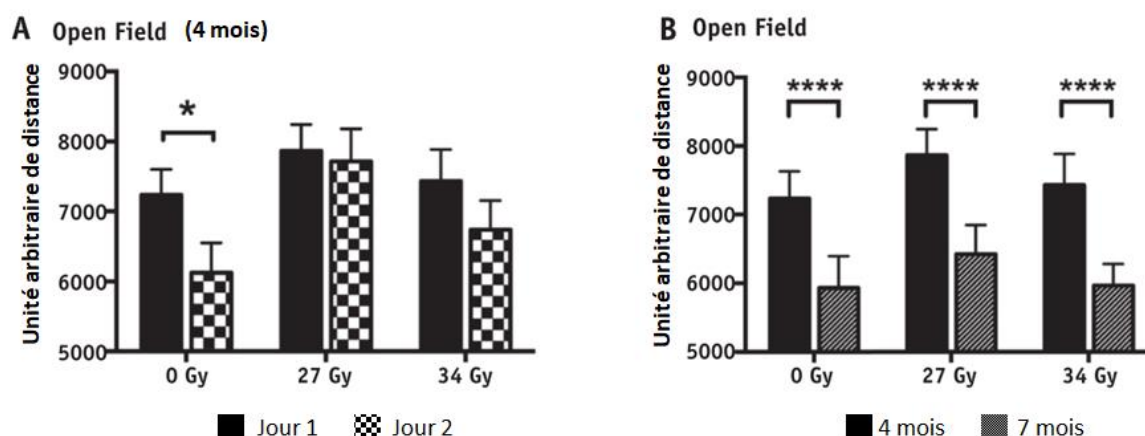


Figure 45 : Evaluation de l'activité locomotrice à l'aide de l'open field. (A) La distance totale parcourue lors de l'exploration de l'open field par des rats sham et irradiés au jour 1 (barres pleines) étaient équivalentes. Les animaux témoins (0 Gy) ont montré une réduction significative de l'activité exploratoire au jour 2 par rapport au jour 1 contrairement aux deux groupes irradiés. (B) Le comportement exploratoire au jour 1 était similaire entre les groupes à 4 mois (barres pleines) et 7 mois (barres rayées) après irradiation mais a diminué de manière significative, indiquant une familiarité avec l'arène (Brown et al., 2016).

• Coordination motrice

La coordination motrice est généralement évaluée à travers des tests d'équilibre ou grâce au rotarod (dispositif sous forme de barre rotative) (Tomé et al., 2015). Les performances des animaux lors de cette tâche, sur plusieurs jours d'entraînement successifs, peuvent être interprétées comme une mesure de l'apprentissage moteur. En 2017, McGinnis *et al.* placent les souris testées sur le rotarod tournant initialement à 5tr/min. Puis, le dispositif accélère de 1tr/min toutes les 3s. Les animaux sont soumis à 3 essais par jour pendant 3 jours consécutifs. La latence de chute est enregistrée automatiquement par une ligne de photo-faisceaux placés sous le dispositif. Aucune différence intra- ou inter- groupe n'a été observée (McGinnis et al., 2017). Ceci est corroboré par l'étude de Clark *et al.* qui ont montré que l'irradiation n'avait eu aucun effet sur les performances lors de ce test (Clark et al., 2008).

Afin d'évaluer comment l'irradiation globale du cerveau affecte la coordination lors de la marche, Ungavri *et al.* ont testé les animaux à l'aide d'un dispositif automatisé assisté par ordinateur : le CatWalk à 3 et 6 mois après irradiation (5 Gy deux fois/semaine pendant 4 semaines). Les auteurs ont constaté que les animaux ayant été soumis à l'irradiation cérébrale ne présentent aucune différence dans la coordination de la marche 3 mois après irradiation par comparaison à des animaux contrôles. Cependant, lors de l'étude réalisée à 6 mois post-irradiation, l'indice de régularité de la marche est significativement réduit chez les animaux irradiés par rapport au groupe contrôle. Ces données suggèrent que les anomalies de la

marche pouvant être associées à une sénescence cérébrale radio-induite apparaissent plus tardivement que les troubles de la mémoire (Ungvari et al., 2017).

III-2.3.3 Evaluation de l'anxiété/dépression

- Comportement de type anxiété

Open field

Le test de l'*open field* est également utilisé pour évaluer l'anxiété. Le nombre d'entrées ou le temps passé au centre de l'enceinte, évalués selon une carte de zones préalablement établies, sont alors utilisés comme des indicateurs quantitatifs du comportement anxieux (Ji et al., 2014; McGinnis et al., 2017). Ainsi, une diminution du nombre de passages ou du temps passé au centre ou encore le rapport entre la distance globale et celle au centre indiquent une augmentation du niveau d'anxiété chez un rongeur (Li et al., 2017).

Afin d'évaluer les niveaux d'anxiété après traitement par RT corps entier ou immunothérapie, McGinnis et son équipe ont soumis différentes souches de souris porteuses de différents types de cancers (carcinome colorectal ou carcinome pulmonaire) au test de l'*open field*. Les auteurs concluent alors que les souris porteuses de tumeurs recevant la thérapie combinée présentent une diminution de leurs niveaux d'anxiété vis à vis des souris sans tumeur ne recevant aucun traitement. Les souris recevant soit une RT, soit une immunothérapie seule n'ont montré aucune différence significative de leur niveau d'anxiété par rapport aux animaux ne recevant aucun traitement (**Figure 46**) (McGinnis et al., 2017).

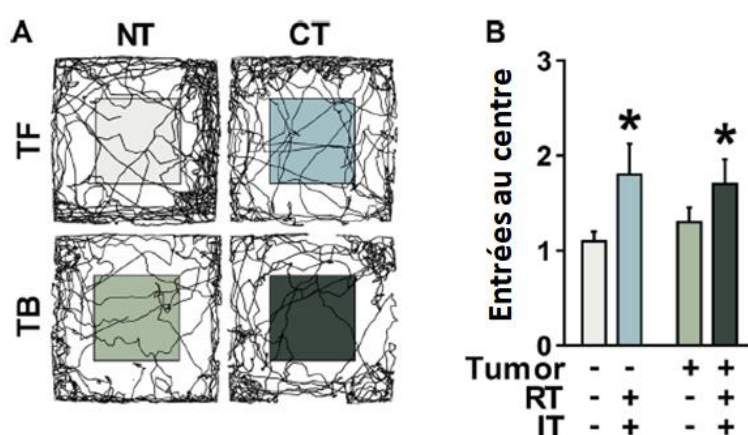


Figure 46 : Diminution des mesures de l'anxiété chez les souris recevant un traitement combiné (RT + immunothérapie) dans deux modèles de souris porteuses de tumeur. Le nombre d'entrées au centre de l'open field a été utilisé comme marqueur du comportement anxieux. (A) Tracés représentatifs des comportements dans l'open field enregistrés chez les souris Balb/c saines (TF) ou porteuses de tumeurs CT26(TB) non traitées (NT) ou traitées avec le traitement combiné (CT). (B) Les

souris sans tumeur (TF) et les souris porteuses de tumeurs (TB) traitées par traitement combiné (irradiation, RT + immunothérapie, IT) présentent une diminution des mesures d'anxiété (McGinnis et al., 2017).

Labyrinthe en croix surélevé

Ce test fournit également une mesure de l'anxiété pouvant être reliée à l'amygdale en quantifiant le temps passé et le nombre d'entrées dans un bras ouvert par rapport à un bras fermé (Parihar et al., 2016). En effet, dans le labyrinthe en croix surélevé, la souris doit se retourner dans les bras ouverts pour pouvoir revenir dans les bras fermés. Ce demi-tour est très anxiogène pour une souris (Rola et al., 2004). Dans leur étude sur les changements cognitifs chez le rat juvénile après irradiation du cerveau entier, Brown et ses collaborateurs ont réalisé le test du labyrinthe en croix surélevé 4 mois après irradiation. Les rats sont placés au centre du labyrinthe et peuvent l'explorer librement pendant 5 min. Le temps passé dans les bras ouverts a alors été chronométré. L'étude montre que les deux doses employées (27 ou 34 Gy) lors d'une irradiation du cerveau entier induisent une diminution du comportement exploratoire dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé, ce qui traduit une augmentation du comportement anxieux (Brown et al., 2016).

Labyrinthe en zéro surélevé

Le labyrinthe en zéro surélevé est une variante du labyrinthe en croix surélevé qui se présente sous la forme d'un labyrinthe circulaire composé de deux zones fermées et de deux zones ouvertes placées en alternance. Il a été imaginé pour contrer l'effet trop anxiogène du demi-tour nécessaire dans labyrinthe en croix surélevé qui pourrait constituer un comportement non naturel pour une souris. La conception circulaire du labyrinthe en zéro ne nécessite pas de changements de direction. La longueur des zones ouvertes et fermées est identique à celle des bras ouverts et fermés du labyrinthe en croix surélevé. Les souris sont placées dans une des zones du labyrinthe et peuvent accéder librement à l'ensemble du dispositif pendant 10min. Un système de *video tracking* est généralement utilisé pour calculer le pourcentage de temps passé dans les zones ouvertes. D'autres études évaluent également la distance parcourue (Olsen et al., 2017; Rola et al., 2004).

Rola *et al.* ont évalué les niveaux d'anxiété et d'activité de souris (sans tumeur) irradiées (1 dose unique de 5 Gy sur cerveau entier) versus des souris contrôles dans ce type de labyrinthe. Le pourcentage de temps passé dans les zones ouvertes, les plus anxiogènes,

n'était pas significativement différent entre les souris contrôles et irradiées, ce qui témoigne de l'absence d'effet de l'irradiation cérébrale sur l'anxiété (Rola et al., 2004). Ce résultat est également constaté par Olsen *et al.* en 2017. Cependant, dans cette étude, les souris irradiées présentent des niveaux d'activité globale, mesurés par la distance totale parcourue dans le labyrinthe, inférieurs à ceux des souris sham (**Figure 47**) (Olsen et al., 2017).

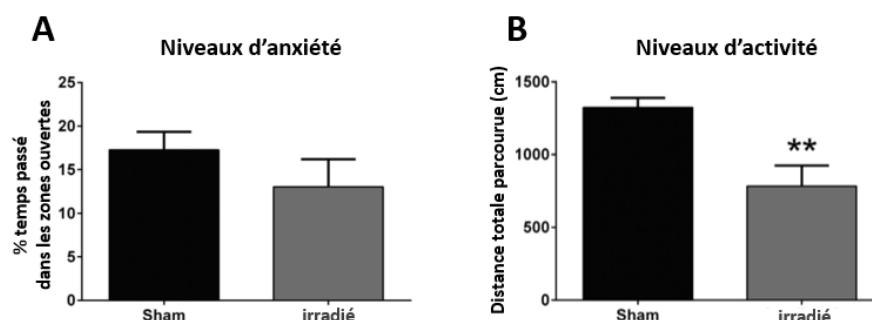


Figure 47 : Evaluation des niveaux d'anxiété et d'activité dans le labyrinthe en zéro surélevé. (A) Aucun effet de l'irradiation sur les niveaux d'anxiété mesurés dans le labyrinthe en zéro surélevé. (B) Effet de l'irradiation sur les niveaux d'activité globale mesurés dans le labyrinthe en zéro surélevé. ** $p < 0,01$ vs souris sham. $N = 10/\text{groupe}$ (Olsen et al., 2017).

- Comportement de type dépression

Le test de la nage forcée

Le test de nage forcée est couramment utilisé pour évaluer un comportement de type dépression chez les animaux. Il évalue le degré d'impuissance acquise ou d'un comportement de désespoir par la notation des comportements actifs (nage, escalade) vis-à-vis des comportements passifs (immobilité) dans un cylindre rempli d'eau et dont l'animal ne peut pas s'échapper.

Sur ce principe, McGinnis et collaborateurs ont placé des souris 6 minutes dans des cylindres remplis avec 15cm d'eau à 24°C. Bien que la dépression soit une constatation courante dans les dysfonctionnements neurologiques liés au cancer, les auteurs notent qu'il n'y a pas d'effets significatifs de la tumeur ou du traitement (RT et/ou immunothérapie) sur le pourcentage de temps d'immobilité lors de ce test (McGinnis et al., 2017).

III-2.3.4 Evaluation de la fatigue

Comme vu précédemment (partie III-1.1, page 78) la fatigue est un effet secondaire induit par la RT chez l'Homme. L'étude de ce phénomène chez l'animal est indirectement

évaluée par le suivi de la fonction motrice. Néanmoins, la fatigue est rarement prise en compte dans les études précliniques.

Toutefois, en 2016, Renner et collaborateurs se sont attachés à évaluer la fatigue radio-induite chez des souris mâles de 5 à 8 semaines. Ils ont pour cela mesuré l'activité de course volontaire grâce à l'utilisation d'une roue d'activité avant et après irradiation fractionnée aux rayons γ (800cGy x 3 jours consécutifs) au niveau du pelvis et du bas de l'abdomen (Renner et al., 2016). Les résultats présentés montrent que les souris irradiées ont parcouru une distance moindre après irradiation par rapport aux données obtenues avant irradiation. De plus, une diminution de la distance et de la vitesse de course quotidienne moyenne ont été observées chez les souris irradiées vis-à-vis des souris témoins au cours des quatre dernières heures du cycle d'obscurité et ce, durant deux semaines après irradiation (**Figure 48**).

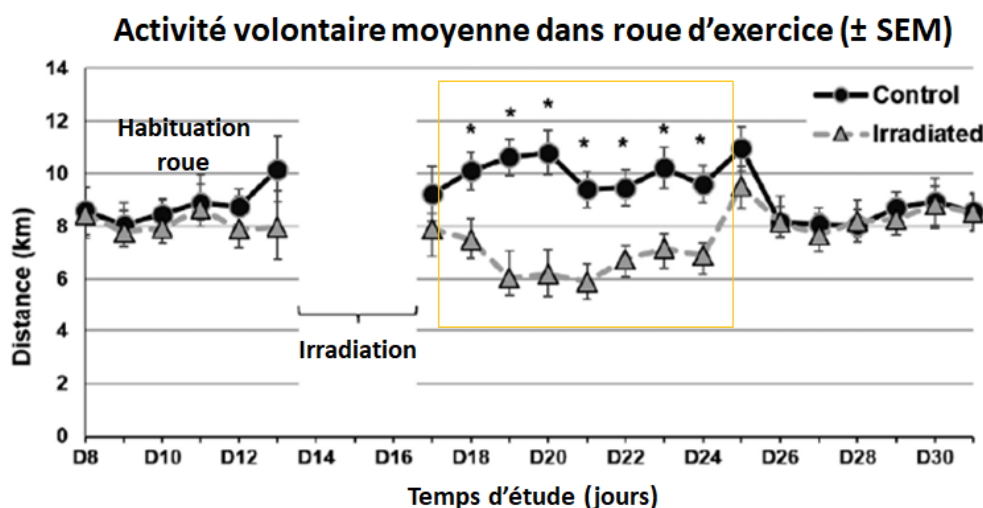


Figure 48 : Suivi du développement du comportement de fatigue après une irradiation pelvienne et abdominale (800 cGy x 3 fractions quotidiennes) via la course dans une roue d'exercice. La distance moyenne quotidienne parcourue sur la roue d'exercice avant irradiation (jours 13 à 15) reflète la distance parcourue lors de la période d'habituation à la roue. Les souris ont été autorisées à se reposer dans des cages d'hébergement lors de la phase d'irradiation. VWRA : voluntary wheel running activity ; RW : running wheel (Renner et al., 2016).

Cette étude illustre bien la caractérisation d'un modèle murin de fatigue induite par une irradiation périphérique à travers la pratique d'une activité physique volontaire (Renner et al., 2016). A ce jour, il n'existe cependant pas de test spécifique permettant de quantifier la fatigue radio-induite chez l'animal.

III-2.3 Physiopathologie de la radiotoxicité cérébrale

Le cerveau est principalement composé de neurones post-mitotiques et de cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes et microglie). Il héberge également un nombre limité de cellules souches neurales (NSC, *neural stem cells*) et de progéniteurs neuronaux qui sont principalement localisée dans deux zones neurogéniques chez l'adulte, à savoir le gyrus denté de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire. De plus, en conditions physiologiques, le cerveau est isolé du reste de la circulation sanguine du corps par la BHE qui est formée de jonctions hautement sélectives entre les cellules endothéliales. Bien qu'il soit difficile de mettre en évidence la contribution de chaque type cellulaire et leurs interactions à l'origine du dysfonctionnement neurocognitif qui survient en phase tardive (> 4 mois) après RT, il a été démontré que ces différents types cellulaires sont tous affectés par l'irradiation (Barazzuol et al., 2020). En effet, au cours des 20 dernières années, la recherche sur les effets tardifs des RI a révélé que ceux-ci résultent d'interactions dynamiques entre différents types de cellules et non simplement de la mort mitotique retardée des cellules vasculaires et parenchymateuses de l'organe cible. Ainsi, la réponse cellulaire aux lésions radio-induites au niveau cérébral implique à la fois les astrocytes, les oligodendrocytes, la microglie, les cellules endothéliales ainsi que les NSC et les neurones matures (**Figure 49**) qui déclenchent et/ou répondent à l'activation de cascades inflammatoires et contribuent ainsi aux dommages neurologiques progressifs (Greene-schloesser & Robbins, 2012; Turnquist et al., 2020).

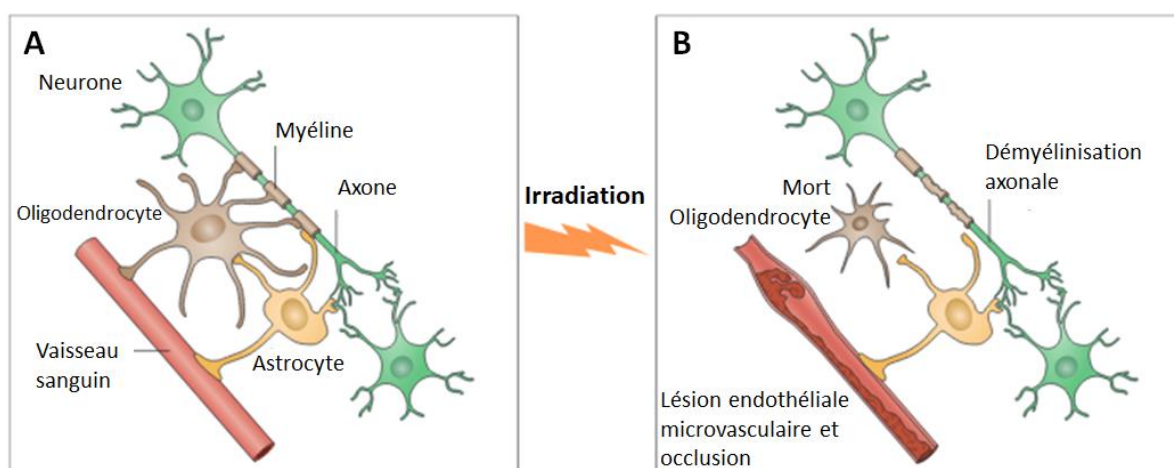


Figure 49 : La vasculopathie et l'épuisement des oligodendrocytes sous-tendent les dommages de la substance blanche induits par l'irradiation. (A) dans le cerveau sain, la substance blanche fournit une connectivité essentielle à la fonction corticale. Les oligodendrocytes établissent et maintiennent la myéline autour des axones. (B) La mort des oligodendrocytes radio-induite entraîne une perte de l'intégrité de la myéline. De plus, les dommages causés au niveau des microvaisseaux compromettent non seulement la substance blanche mais ont également des effets néfastes sur la perfusion et affectent

d'autres éléments clefs du SNC tels que les astrocytes qui fournissent un soutien métabolique et fonctionnel aux neurones (Makale et al., 2016).

III-2.3.1 Cellules endothéliales et perméabilité de la BHE

Les lésions cérébrales radio-induites sont en partie dues à des lésions du système vasculaire. En effet, la RT réduit le nombre de cellules endothéliales, mais aussi la densité et la longueur des vaisseaux. L'irradiation induit de manière dose-dépendante l'apoptose des cellules endothéliales (Yang, 2017). Dans un modèle murin, une raréfaction capillaire et une hypoxie tissulaire locale consécutive ont été observées dans l'hippocampe deux mois après l'irradiation cérébrale (36 Gy). Ces données semblent donc suggérer que les dommages au niveau de la microvascularisation peuvent conduire à des lésions cérébrales, y compris des troubles cognitifs (Hladik et Tapio, 2016). De plus, suite à l'apoptose des cellules endothéliales microvasculaires, une perturbation aiguë de la BHE a été observée chez des rats adultes après exposition aux rayons X (50 Gy) de la moelle épinière cervicale et une augmentation significative de la perméabilité de la BHE a été observée après une dose cumulée de 4 Gy chez des rats soumis à une irradiation cérébrale. Il a été suggéré que les altérations de la perméabilité de la BHE pourraient être responsables des lésions du tissu cérébral sain après RT. Les mécanismes cellulaires et moléculaires exacts par lesquels la perturbation de la BHE est induite restent flous. Cependant, la régulation à la hausse du niveau de métalloprotéine matricielle-2 (MMP-2), la dégradation du collagène de type IV et la diminution de l'expression génique et protéique du facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF), de l'angiopoïétine-1 (Ang-1), ou encore des récepteurs spécifiques de la tyrosine kinase (Tie-2) et de l'angiopoïétine-2 (Ang-2) ont été observées après irradiation cérébrale (10Gy) et seraient impliquées dans la perturbation de la BHE (Hladik et Tapio, 2016).

III-2.3.2 Cellules souches neurales et neurogenèse

Les cellules souches neurales et leurs progéniteurs (NSCP, *neural stem cells and progenitors*) possèdent la capacité de proliférer et également de se différencier. Les NSCP sont connues pour être extrêmement vulnérables aux RI. La prolifération et la différenciation des NSCP se produisent tout au long de la vie dans la zone sous-granulaire (SGZ, *subgranular zone*) du gyrus denté hippocampique et, la zone sous-ventriculaire (SVZ, *subventricular zone*) tapissant les ventricules latéraux.

L'hippocampe étant une région importante en termes de processus cognitifs, la physiopathologie des lésions hippocampiques induites par la RT a été largement étudiée. Dans les études précliniques, l'inhibition de la neurogenèse hippocampique suite à l'irradiation par rayons X a été suggérée comme une raison possible des altérations des performances des animaux lors de tests de mémoire. Rola et ses collaborateurs ont montré que la diminution de la neurogenèse suite à l'irradiation cérébrale globale à une dose comprise entre 2 et 10 Gy, entraînait un risque significatif de troubles cognitifs chez les jeunes souris (Rola et al., 2004). Plus précisément, les travaux de Monje *et al.* visant à évaluer les effets de l'irradiation sur la neurogenèse hippocampique chez le rat ont démontré que, alors que la production de nouveaux neurones était diminuée de plus de 95% après une unique dose de 10Gy sur cerveau entier, le nombre de progéniteurs neuronaux viables un mois après irradiation était similaire à ce qui était observé dans le groupe contrôle non-irradié (**Figure 50**) (Monje et al., 2002).

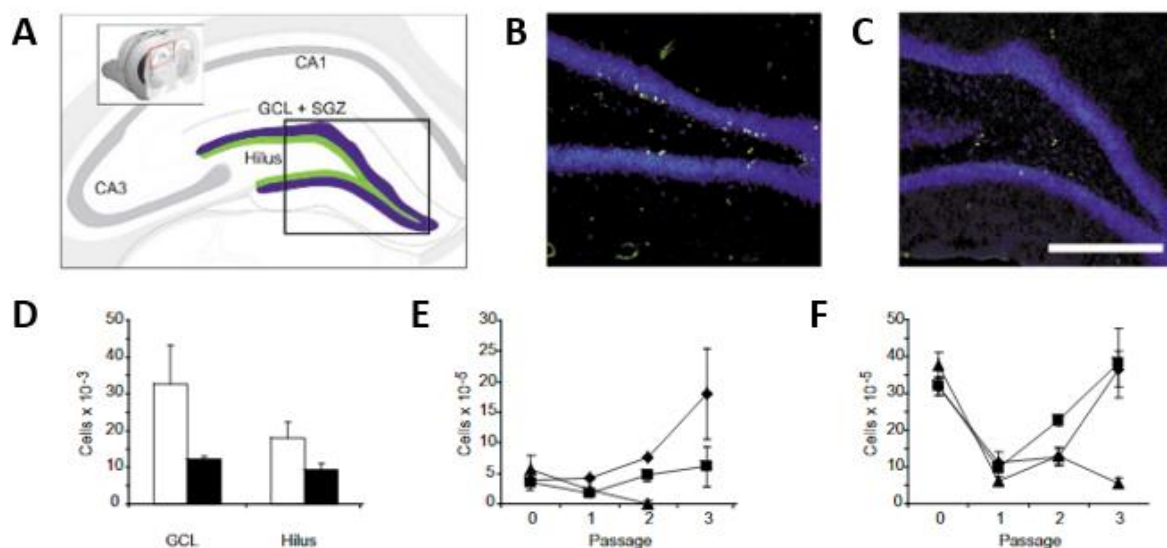


Figure 50 : L'irradiation diminue la prolifération des cellules souches et précurseurs neuronaux. (A) Schéma de l'hippocampe dorsal chez le rat. Les régions de l'hippocampe évaluées dans cette étude comprennent le hile, la couche de cellules granulaires (GCL, bleu) et la zone sous-granulaire (SGZ, vert). Les comptages cellulaires ont été effectués dans la zone encadrée sur le schéma (B-C) Images obtenues par microscopie confocale (x10) du gyrus denté chez un animal témoin (B) et un animal irradié (C). Les neurones matures (marquage NeuN) sont représentés en bleu ; les cellules souches neurales et progéniteurs (NSCP) (marquage BrdU) sont en vert. Echelle : 200 μm. (D) Quantification du nombre total de cellules positives BrdU⁺ dans le GCL et le hile localisés dans le gyrus denté de l'hippocampe chez les animaux témoins (□) et deux mois après irradiation globale du cerveau (■). Les données sont représentées en moyennes ± s.e.m ; n = 4/groupe. (E-F) Quantifications du nombre de NSCP prélevés sur les rats puis cultivés *in vitro*. Des rats adultes ont été euthanasiés un mois après exposition à 0 Gy (◆), 2 Gy (■) ou 10 Gy (▲) puis les cellules des hippocampes (E) ou du cerveau entier (F) ont été prélevées puis entretenues *in vitro* pour établir des cultures hautement enrichies en NSCP (n = 3 animaux/groupe) (Monje et al., 2002).

Ces résultats suggèrent que la réduction du nombre de NSCP après irradiation ne peut pas expliquer à elle seule l'importante réduction de la neurogenèse. Il y a bien un épuisement des NSCP au fil du temps reflétant les catastrophes mitotiques radio-induites au cours de

plusieurs divisions cellulaires. Ceci ayant été démontré *in vitro* et confirme la prolifération des NSCP après irradiation (Monje, 2008; Monje et al., 2002). De plus, la RT aurait un effet hétérogène sur la formation de nouveaux neurones selon les structures cérébrales. En effet, bien que la neurogenèse soit initialement diminuée de manière équivalente dans la SGZ et la SVZ, il a été démontré que la SVZ présentait une récupération tardive alors que la neurogenèse hippocampique restait inchangée (Wilke et al., 2017). En outre, il semblerait que le processus de neurogenèse soit altéré par l'effet de l'inflammation radio-induite sur les NSCP (Rola et al., 2004).

Enfin, la neurogenèse dépend fortement du microenvironnement spécifique des niches neurogéniques. L'inhibition de la neurogenèse radio-induite s'accompagne de changements significatifs dans le microenvironnement de la niche neurogénique tels que la perturbation de l'angiogenèse microvasculaire associée à la neurogenèse adulte et une augmentation marquée de l'inflammation. Les NSCP sont connues pour être radiosensibles même à faible dose, tandis que des doses de RI modérées et élevées vont être responsables de dommages également au niveau d'autres types cellulaires tels que les neurones, les cellules gliales et endothéliales (Hladik et Tapio, 2016).

III-2.3.3 Neurones

Auparavant les neurones étaient considérés comme résistants à l'irradiation en raison de leur incapacité à se diviser. Bien que les effets des RI aient été davantage étudiés sur les NSCP, à l'heure actuelle il est établi que l'irradiation crânienne entraîne également des altérations de la fonction des neurones matures reflétées par des altérations de leur morphologie dendritique et de leur fonction physiologique (Wilke, 2017). Ces troubles de l'activité neuronale ne semblent pas être liés aux modifications du nombre de neurones, ni aux processus de myélinisation dans les extensions des cellules nerveuses (Puskinov, 2015). En effet, Limoli et ses collaborateurs ont observé une diminution significative, dose-dépendante, de 20 à 35% du nombre de dendrites et de 40 à 70% de la densité des épines dendritiques des neurones localisés dans le gyrus denté de l'hippocampe. Les filopodes immatures, petites protubérances éphémères situées le long des dendrites, présentent une plus grande sensibilité à l'irradiation par rapport aux épines dendritiques matures. Leur

nombre est considérablement diminué après une exposition aiguë aux RI (**Figure 51**) (Parihar & Limoli, 2013 ; Wilke, 2017).

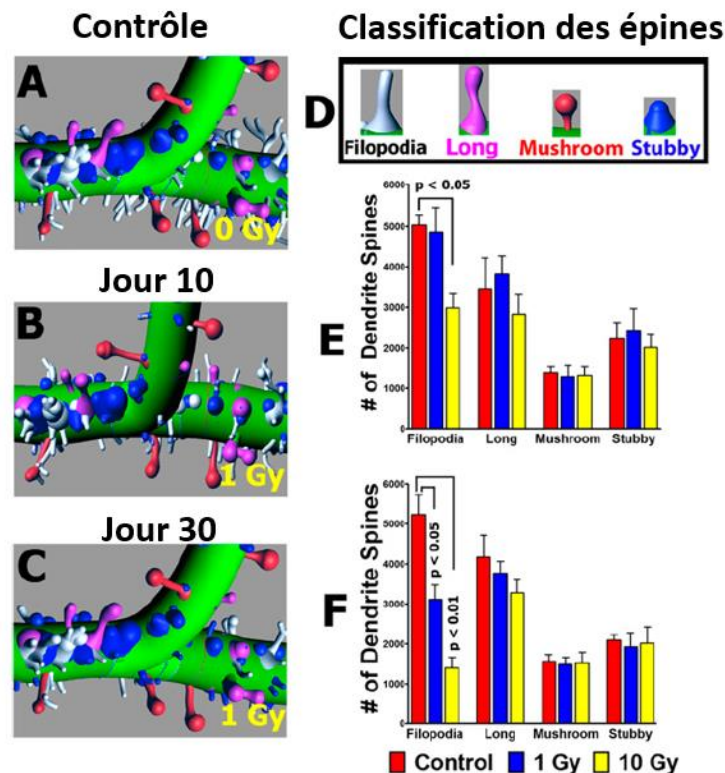


Figure 51: Impact de l'irradiation sur les épines dendritiques des neurones hippocampiques. (A-D) Images des reconstructions des segments dendritiques permettant d'identifier des filopodes (en blanc) et d'autres types d'épines dendritiques (classifiées selon un code couleur) observées 10 ou 30 jours après irradiation. (E-F) Les différents types d'épines dendritiques quantifiées, y compris les filopodes immatures ainsi que d'autres morphologies les plus matures (long), en forme de champignon (mushroom) et trapues (strubby) ont été quantifiées au 10^e (E) et 30^e (F) jour après irradiation (1 ou 10 Gy) (Parihar & Limoli, 2013).

De manière intéressante, il a été montré que l'irradiation cérébrale modifie les signalisations intracellulaires dans les neurones et modifie les niveaux de neurotransmetteurs et de leurs récepteurs. En effet, une étude publiée récemment a évalué chez le rat exposé à une irradiation globale du cerveau (11 Gy), les taux d'acide gamma-aminobutyrique (GABA), de glycine, de taurine, d'aspartate, de glutamate et de glutamine dans l'hypothalamus, le cortex préfrontal et le tronc cérébral selon une méthode de chromatographie liquide haute performance (HPLC). Les résultats de cette étude mettent en évidence qu' 1 mois post-irradiation, les niveaux de GABA, glycine, taurine, aspartate et du récepteur GABA_A sont significativement réduits dans l'hypothalamus. De plus, dans l'hypothalamus, un rapport glutamate/GABA plus élevé a été trouvé après irradiation. Dans le cortex préfrontal, l'irradiation cerveau entier induit des augmentations significatives de la glutamine et du glutamate, du rapport glutamine/glutamate et une expression accrue du récepteur GABA_A et

de la sous-unité NR1 du récepteur NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique). Dans le tronc cérébral, aucun changement statistiquement significatif n'a été observé après irradiation quel que soit le neurotransmetteur. Ainsi, cette étude montre que l'irradiation cérébrale diminue les neurotransmetteurs et récepteurs inhibiteurs dans l'hypothalamus et, à l'inverse, augmente les neurotransmetteurs et récepteurs excitateurs dans le cortex préfrontal. Des augmentations de glutamate/GABA dans l'hypothalamus et de glutamine/glutamate dans le cortex frontal indiquent un déséquilibre neurochimique (Franco-Pérez et al. , 2020).

En résumé, les neurones différenciés peuvent être affectés par l'irradiation comme en témoigne les dysfonctionnements neuronaux décrits précédemment mais cela ne se traduit pas directement par une perte neuronale radio-induite (Makale, 2016).

III-2.3.4 Oligodendrocytes et substance blanche

La démyélinisation est un des processus observés plus tardivement après RT et qui contribue à la perte de substance blanche, laquelle est connue pour être corrélée aux déficits cognitifs consécutifs à la RT. La démyélinisation est souvent associée à la perte d'oligodendrocytes, qui produisent et maintiennent les gaines de myéline le long des axones. Les oligodendrocytes sont considérés comme le type de cellules gliales le plus radiosensible dans le SNC (Jacob et al., 2018). Dans une étude menée chez le rat, l'irradiation cérébrale (25 Gy) a réduit le nombre de cellules oligodendrogiales et provoqué une fragmentation de la myéline (Makale, 2016). Ainsi, il est supposé que les dommages causés aux cellules précurseurs d'oligodendrocytes (OPC, *oligodendrocyte progenitor cells*) entraînent une incapacité du tissu cérébral à remplacer les oligodendrocytes morts, ce qui provoque *in fine* une démyélinisation et peut aboutir à une nécrose de la substance blanche. En effet, il a été démontré que des doses uniques de plus de 3 Gy ou des doses fractionnées de plus de 4,5 Gy entraînent une diminution progressive du nombre d'oligodendrocytes dans le cerveau de rat au cours des 24h suivant l'exposition aux rayons X. Ces données correspondent à une démyélinisation transitoire précoce et à un syndrome d'irradiation aiguë observés en pratique clinique. Cependant, ces résultats n'expliquent pas le développement d'une nécrose radio-induite tardive survenant quelques mois après le traitement. Ainsi, la corrélation entre les dommages causés par les oligodendrocytes et le développement de lésions cérébrales radio-induites n'est pas aussi claire que ce qui était avancé auparavant (Puskinov, 2015).

III-2.3.5 Neuroinflammation

Des études ont démontré que les RI stimulent fortement la neuroinflammation dans le SNC des rongeurs, avec un nombre significativement accru de cellules microgliales activées dans la zone neurogénique du gyrus denté de l'hippocampe. Ainsi, les facteurs pro-inflammatoires tels que le facteur de transcription nucléaire kappa B (NF- κ B), diverses molécules d'adhésion cellulaire et cytokines (IL-1 β ; INF- γ et TNF- α) sont régulés à la hausse dans les heures suivant l'irradiation. Ces facteurs affectent la perméabilité de la BHE, l'adhésion des leucocytes, le diamètre des microvaisseaux et induisent une astrogliose réactive. Le NF- κ B régule la production de cytokines, y compris celle d'IL-1 β et d'INF- γ , qui à leur tour induisent une démyélinisation et un œdème (Hwang et al., 2006; Wilson et al., 2009).

Au cours de la phase aiguë, une irradiation du cerveau entier avec des particules de ^{56}Fe à 0,5 Gy ou à 15 Gy avec des rayons X augmente également de manière aiguë le nombre de cellules microgliales activées et affecte négativement la survie cellulaire des NSCP. Tandis que lors de la phase chronique, l'irradiation cérébrale à 10 Gy augmente le taux de TNF- α jusqu'à 6 mois après exposition. Il semble donc que ces phénomènes inflammatoires puissent contribuer aux effets tardifs des lésions radio-induites, y compris les troubles cognitifs (Yang, 2017).

De plus, la neuroinflammation médiée par les macrophages/microglie est bien présente après irradiation cérébrale comme en témoigne l'augmentation des expressions géniques de CD68, marqueur spécifique des macrophages/microglie, et de CCL2 qui est un chimio-attractant macrophagique (**Figure 52**). Les auteurs de cette étude concluent donc que le remodelage cérébrovasculaire, la neuroinflammation et les altérations de la neurotransmission induits par l'irradiation fractionnée du cerveau entier contribueraient à des lésions cérébrales radio-induites tardives chez le primate non-humain (Andrews et al., 2017).

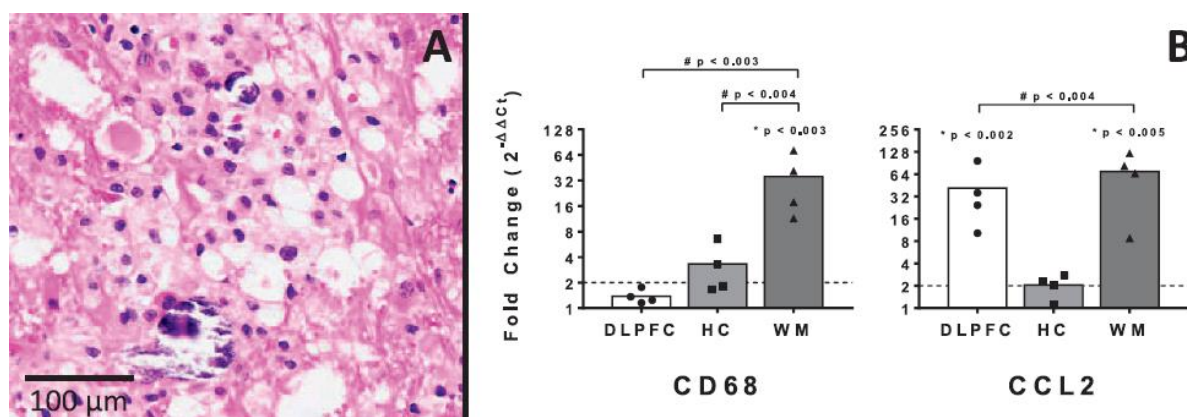


Figure 52 : Preuve de la neuroinflammation induite après irradiation cérébrale et médiée par les macrophages/microglie chez le primate non-humain (macaque) (A) Image d'une histologie éosine/hématoxyline à fort grossissement obtenue sur un cerveau de macaque 6 mois après irradiation globale du cerveau (40 Gy). Il est observé une nécrose focale de la substance blanche avec une dégénérescence axonale qui est associée à des infiltrats de macrophages/microglie. (B) Quantification par RT-PCR des expressions géniques de CD68 et de CCL2 dans le cortex préfrontal dorsolatéral (DLPFC), l'hippocampe (HC) et la substance blanche temporelle (WM). * p indique l'effet de l'irradiation cérébrale sur l'expression des gènes étudiés et # indique les différences d'expression génique régionale, c'est-à-dire par comparaison des structures cérébrales étudiées (Andrews et al., 2017).

En 2016, Han et collaborateurs ont étudié, dans un modèle murin, les effets d'une irradiation cérébrale à dose unique de 8Gy administrée soit 10 jours après la naissance (juvénile) soit 90 jours (adulte) sur la neuroinflammation. Les résultats montrent que l'activation de la microglie après irradiation était plus prononcée, plus prolongée et de nature pro-inflammatoire dans les hippocampes des animaux juvéniles par comparaison aux animaux adultes. Une inflammation de longue durée et l'absence de macrophages dérivés de monocytes étaient cette fois retrouvées dans les deux groupes (Han et al., 2016). Ces processus dynamiques liés à l'inflammation et au stress oxydatif semblent être impliqués dans l'apparition des toxicités tardives (Jacob et al., 2018).

Plusieurs études soulignent également une activation de la microglie concomitante à une réaction astrocytaire, dénommée astrogliose. Ces phénomènes sont retrouvés à la fois dans des modèles de radiotoxicité cérébrale chez le rat et la souris (Balentova & Adamkov, 2015; Turnquist et al., 2020). Il a également été observé chez le rat que l'irradiation cérébrale focalisée sur le cortex somatosensoriel entraîne une activation de la microglie (cellules CD86+/Iba1+) et une augmentation des astrocytes réactifs (cellules GFAP+) qui sont accompagnés d'une infiltration leucocytaire (cellules CD45+) en particulier de lymphocytes T (cellules CD3+). L'ensemble de ces phénomènes façonne alors la réponse inflammatoire après irradiation cérébrale (Constanzo et al., 2020).

En conclusion, la physiopathologie des troubles cognitifs consécutifs à une RT cérébrale est un processus multimodal complexe impliquant des modifications marquées du microenvironnement cérébral et touchant différentes populations de cellules cérébrales (Wilke et al., 2017, Jacob et al., 2018; Pazzaglia et al., 2020). Les lésions cérébrales radio-induites entraînent donc une altération persistante du microenvironnement cérébral, le stress oxydatif et l'inflammation y jouant un rôle crucial. Malgré la mise en évidence de différents mécanismes impliqués dans la pathogenèse des atteintes neurologiques consécutives à la RT, il n'est pas établi à ce jour s'il existe des relations de cause à effet entre ces différents dommages cellulaires radio-induits (Makale et al., 2017). De même, il n'est pas démontré clairement qu'un mécanisme précoce soit à l'origine d'une cascade d'évènements cellulaires délétères conduisant à terme aux déficits cognitifs. Par conséquent, il est indispensable de continuer les recherches expérimentales sur la physiopathologie de la radiotoxicité cérébrale, notamment en menant des études longitudinales qui pourraient ouvrir la voie à l'identification de traitements précoces susceptibles d'améliorer ou de prévenir les lésions du SNC induites par la RT (Pazzaglia et al., 2020).

III-3 Biomarqueurs de la radiotoxicité cérébrale

Le biomarqueur est une caractéristique pouvant être mesurée et qui reflète une modification ou altération de toute substance, structure, processus ou fonction (biomarqueur de diagnostic). Celui-ci peut également prédire l'incidence d'un résultat ou d'une maladie, les effets des traitements, des interventions voire d'une exposition environnementale involontaire (biomarqueur prédictif). Le biomarqueur peut se présenter sous forme de cellule ou de molécule spécifique relevée dans un échantillon biologique prélevé mais il peut également s'agir d'un résultat obtenu grâce à une technique d'imagerie et qui souligne la fluctuation d'une substance ou une altération de la structure et de la fonction cérébrale (Sultana et al., 2020).

III-3.1 Biomarqueurs d'imagerie

Dans le parcours de soin des patients cancéreux l'imagerie par scanner et/ou IRM permet de mieux cibler la tumeur et d'affiner le protocole d'irradiation. Lors des études précliniques, des systèmes semblables au système de planification chez l'Homme ont été

développés chez le petit animal. La planification du traitement sur ces micro-irradiateurs se base sur des images de CT-scan (tomodensitométrie). Or le faible contraste des tissus mous obtenu par scanner rend difficile la localisation de certaines zones comme c'est le cas dans le cerveau. C'est pourquoi, l'imagerie par résonance magnétique (IRM), qui présente un meilleur contraste que la tomodensitométrie, permet une délimitation plus précise de la cible en prévision de l'irradiation (**Figure 53**) (Bolcaen et al., 2017).

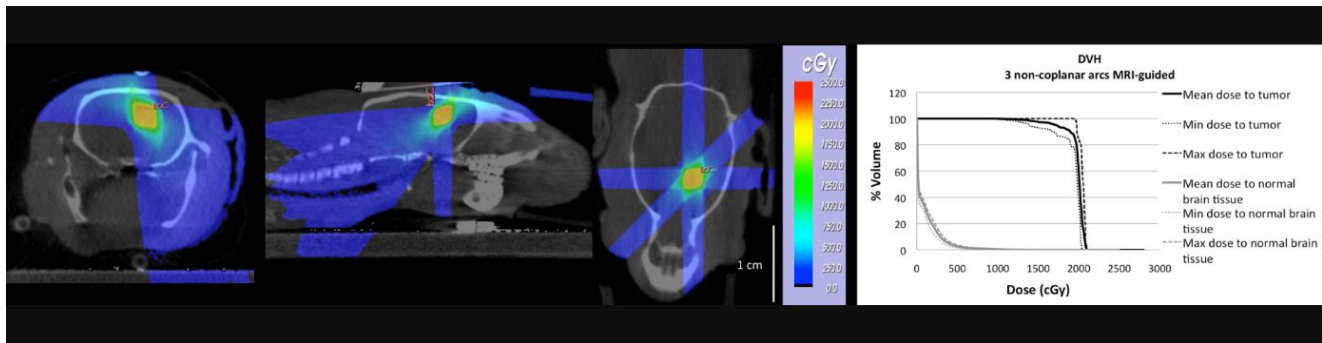


Figure 53 : Planification de traitement de radiothérapie utilisant l'IRM pondérée en T1 à contraste amélioré et trois arcs non coplanaires pour délivrer 20 Gy au volume tumoral cible chez le rat. À gauche, cartes de dépôt de dose issues de la planification du traitement et qui sont recalées sur les images IRM pondérées en T1. À droite, histogramme dose-volume (HDV) dans la tumeur et le tissu cérébral. Grâce à cette planification de traitement, 90% du volume cible a reçu la dose souhaitée, tout en minimisant la dose reçue par le tissu cérébral sain (Bolcaen et al., 2017).

III-3.1.1 Imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'imagerie préclinique *in vivo* pour petits animaux se base quasiment sur les mêmes technologies en termes de matériels, paramètres de séquences et logiciels que ceux utilisés pour les patients. Dans cette perspective, l'IRM pourrait être la technique la plus appropriée pour que de potentiels biomarqueurs d'imagerie identifiés dans des modèles animaux soient rapidement transposés à la clinique. De plus, le large éventail de séquences peut donner des informations très utiles sur l'anatomie et le fonctionnement de différents organes du corps, notamment le cerveau. Pour ces raisons, l'IRM représente une technique d'imagerie très intéressante et polyvalente (Fiordelisi et al., 2019).

- **IRM anatomique**

Les modalités conventionnelles de neuroimagerie anatomique ont démontré des changements structuraux dans un large éventail de maladies neurologiques, dont certains sont pathognomoniques pour des troubles neurodégénératifs spécifiques. De même, des modifications de l'anatomie cérébrale peuvent également être observées après une RT, bien que celles-ci aient tendance à être plus subtiles et pas nécessairement spécifiques. Des

réductions du volume de l'hippocampe après une RT partielle du cerveau à haute dose ont été démontrées chez des patients atteints de tumeurs cérébrales primitives (Wilke et al., 2017).

Un examen par IRM permet de mettre en évidence d'autres modifications anatomiques telles que des modifications de la substance blanche et un œdème dans la zone ayant reçu une distribution de dose d'irradiation élevée. La mesure volumétrique du cerveau au moyen de l'analyse VBM (*voxel based-morphometry*) est pertinente pour identifier l'atrophie globale du cerveau ou au niveau de régions cérébrales particulières. En 2015, Nieman et son équipe publient une étude notable par l'originalité de l'approche. En effet, les auteurs établissent un protocole IRM et un post-traitement des images par VBM leur permettant une comparaison directe entre un modèle animal murin et de jeunes patients traités par RT (Nieman et al., 2015). Les patients sont répartis en deux groupes : 7 ans et moins ou 8 ans et plus et sont ensuite soumis à un examen d'IRM pondérée en T1. Les résultats indiquent une diminution significative du volume de substance blanche (SB) après traitement et ce, dans les deux groupes de patients. Le volume de substance grise (SG) reste globalement inchangé mais l'épaisseur corticale apparaît légèrement plus importante dans le groupe 7 ans et moins au niveau des lobes frontaux, occipitaux et temporaux mais pas du lobe pariétal. Le volume de l'hippocampe a tendance à diminuer avec l'âge des patients après traitement. Cet effet n'est cependant pas observé dans l'hippocampe des souris mais est retrouvé au niveau du bulbe olfactif. Les résultats chez les souris reflètent malgré tout sensiblement les mêmes changements que dans les groupes de patients, à savoir une diminution de la SB et une augmentation de l'épaisseur corticale, mais ils permettent en plus de fournir une évolution dans le temps. Les données semblent indiquer des altérations précoces de SB et SG après traitement qui ne sont pas récupérées au cours du temps (**Figure 54**).

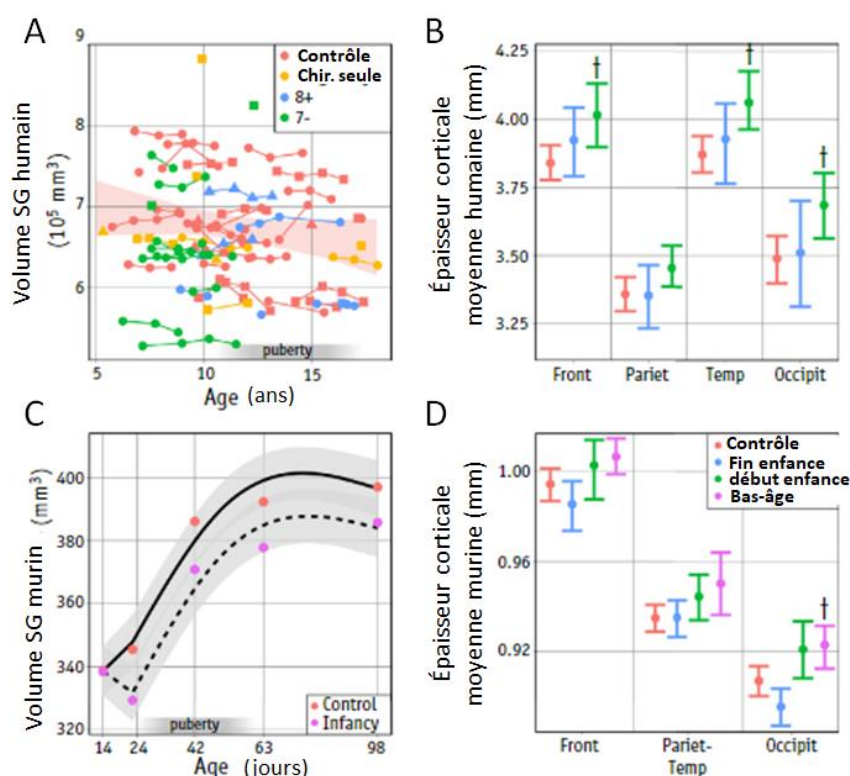


Figure 54 : Comparaison des atteintes volumiques de la substance grise après RT crânienne chez l'Homme et chez la souris. (A) Le volume total de substance grise (SG) n'est pas significativement différent entre les groupes d'enfants atteints de tumeurs cérébrales et traités ou non par RT. (B) Augmentation de l'épaisseur corticale dans le groupe âgés de 7 ans ou moins au niveau des lobes frontaux, occipitaux et temporaux ($p < 0.01$) mais pas dans le lobe pariétal. (C) Evolution du volume de SG totale au fil du temps après RT crânienne chez la souris. Baisse initiale de 5% mais la croissance ultérieure n'est pas différente de celle des témoins. (D) Augmentation de l'épaisseur corticale observée uniquement dans le lobe occipital après irradiation cérébrale chez la souris de « bas âge » (Nieman et al., 2015).

Les auteurs concluent que les changements survenant chez les souris traitées par irradiation cérébrale sont similaires à ceux observés chez l'Homme, y compris des altérations significatives des SB et SG (Nieman et al., 2015). A partir de données issues d'IRM anatomiques, plusieurs études précliniques soutiennent la présence d'une atrophie cérébrale globale après irradiation réalisée à différents moments du développement cérébral (*in utero* – juvénile – adulte) (De Guzman et al., 2015; Mouton et al., 2021; Pérès et al., 2018). Par exemple, Balentova et collaborateurs ont réalisé par IRM des analyses volumétriques après irradiation de l'ensemble du cerveau chez le rat adulte (5x 8 Gy). Les résultats de cette étude montre une réduction significative du volume cérébral total et une atrophie de l'hippocampe dorsal et des bulbes olfactifs (Balentova et al., 2019).

Il est admis que le traitement chimioradiothérapeutique chez les adultes atteints de tumeurs cérébrales peut entraîner une perte du volume cérébral. Cependant, les études n'ont à ce jour montré aucune association entre le volume cérébral et le dysfonctionnement

neurocognitif chez les survivants de tumeurs cérébrales pédiatriques (Ajithkumar et al., 2017). Les méthodes conventionnelles d'IRM comme l'IRM anatomique (imageries T1 ou T2) ne sont manifestement pas suffisamment sensibles pour identifier les changements prédictifs d'un dysfonctionnement neurocognitif. Le développement de nouvelles méthodes d'imagerie sensibles aux lésions du tissu cérébral pourrait permettre de mieux appréhender ces changements (Ajithkumar et al., 2017).

- **IRM de diffusion**

L'IRM de diffusion permet de sonder le mouvement des molécules d'eau et grâce à des séquences d'imagerie pondérées en diffusion (DWI, *diffusion weighted imaging*) ou d'imagerie du tenseur de diffusion (DTI : *diffusion tensor imaging*), il est ainsi possible d'étudier la microstructure d'un tissu ainsi que l'intégrité de la SG et de la SB. La diffusion de l'eau est importante le long des faisceaux de SB et faible perpendiculairement à cette dernière, ce qui entraîne un profil de diffusion anisotrope. Si le déplacement d'une molécule d'eau diffusant à travers le cerveau pouvait être tracé, il formerait une forme elliptique avec le grand axe décrivant l'axe principal de diffusion. Le calcul tensoriel peut alors être utilisé pour quantifier ce tenseur. La méthode la plus courante pour quantifier l'anisotropie utilise le paramètre nommé fraction d'anisotropie, noté FA (*fractional anisotropy*), qui a des valeurs comprises entre 0 et 1 ; 0 correspond à la diffusion isotrope (c'est-à-dire égale dans toutes les directions) et 1 correspond à la diffusion anisotrope maximale (c'est-à-dire préférentiellement orientée le long d'un axe). Le degré d'anisotropie dépend du diamètre et de la densité des fibres de matière blanche, de la gaine de myéline, d'autres structures macromoléculaires qui entravent la diffusion des molécules d'eau ainsi que la cohérence des faisceaux de SB. En reliant des « ellipses » adjacentes dans différents voxels avec l'utilisation de l'axe principal, il peut alors être créer une carte probabiliste des étendues de matière blanche appelée tractographie. Cette dernière est utile pour étudier les principales voies de la SB (Ajithkumar et al., 2017). Celle-ci peut être altérée après RT et/ou chimiothérapie. Des études ont ainsi montré une diminution de l'anisotropie fractionnelle (FA) après RT dans les lobes frontaux, temporaux et pariétaux, associée à un déclin neurocognitif (Ajithkumar et al., 2017). L'utilisation de l'imagerie DTI pour étudier les modifications de l'intégrité de la SB résultant de la RT est difficile car la chimiothérapie seule peut également entraîner une perturbation de la substance blanche. En effet, plusieurs études ont montré que les patients recevant une chimiothérapie seule présentaient une FA réduite au niveau de la substance blanche. Une

réduction de la FA dans le corps calleux était associée à un déclin neurocognitif alors qu'une réduction de la FA dans le faisceau fronto-occipital inférieur était associée à une réduction de la vitesse de traitement moteur (Ajithkumar et al., 2017).

A partir de l'IRM de diffusion, d'autres paramètres peuvent être quantifiés comme le coefficient de diffusion apparent (ADC, *apparent diffusion coefficient*), également dénommé diffusivité moyenne (MD, *mean diffusivity*). L'ADC permet de quantifier la vitesse de déplacement des molécules d'eau et ainsi d'étudier les changements cellulaires. Une augmentation de la densité cellulaire (une tumeur) entrave la diffusion des molécules d'eau et, par conséquent, réduit les valeurs d'ADC. En revanche, une diminution de la densité cellulaire (ex. nécrose radio-induite) provoque moins d'obstacles à la diffusion des molécules d'eau et, par conséquent, augmente les valeurs du paramètre ADC. Une thérapie anti-tumorale réussie conduit à une nécrose, à une perméabilité cellulaire via la modification des membranes et à une diminution de la densité des cellules tumorales. Ainsi, une augmentation des valeurs d'ADC reflète une diminution du nombre de cellules tumorales et indique donc qu'il s'agit d'une thérapie cytotoxique efficace (Garbow et al., 2018). Pour aller plus loin, il peut être aussi mesuré le coefficient de diffusion moyen de l'eau dans la direction perpendiculaire aux fibres axonales, paramètre nommé RD (*radial diffusivity ou diffusivité radiale ou perpendiculaire*). De même, il peut être quantifié le coefficient de diffusion moyen des molécules d'eau diffusant parallèlement aux fibres de SB dans un voxel d'intérêt, il s'agit du paramètre AD (*axial diffusivity ou diffusivité axiale ou parallèle*) (**Figure 55**) (Le Bihan & Lima, 2015; Winklewski et al., 2018). Ainsi, l'augmentation de la diffusion radiale ou perpendiculaire (paramètre RD) et la diminution de la diffusion axiale ou parallèle (paramètre AD) traduisent respectivement une démyélinisation et une dégénérescence axonale ou une astroglie (Basser et al., 1994; Chapman et al., 2016).



Figure 55 : Cartes paramétriques obtenues par l'imagerie du tenseur de diffusion (DTI) dans le cerveau : (A) diffusivité moyenne (MD), (B) diffusivité axiale (AD), (C) diffusivité radiale (RD) et (D) fraction d'anisotropie (FA) (Winklewski et al., 2018).

En 2016, une étude de Chapman *et al.* s'est intéressée aux modifications des paramètres DTI pour déterminer s'ils pourraient être prédictifs des changements cognitifs

après RT. L'étude démontre, par analyse univariée, que la diminution de l'AD et l'augmentation de la RD pendant la RT prédisent les atteintes de la mémoire verbale et de la fluidité verbale. Tandis que par analyse multivariée, le score neurocognitif de base était la seule variable clinique prédisant l'atteinte de la mémoire verbale alors qu'aucune variable clinique ne pouvait prédire de changements de fluidité verbale. Les auteurs ont alors conclu que dans un modèle multivarié, une augmentation de la RD à la fin du traitement par radiothérapie prédit de manière significative une baisse de la fluidité verbale 18 mois après RT. L'imagerie de diffusion semble donc intéressante pour élaborer des modèles prédictifs des atteintes cognitives après RT (Chapman et al., 2016). En parallèle, plusieurs études précliniques menées chez la souris et la rat jeune ou adulte ont montré que les paramètres obtenus en IRM de diffusion sont modifiés après irradiation cérébrale (Constanzo et al., 2020; Mouton et al., 2021; Pérès et al., 2018; Trivedi et al., 2012; Wang et al., 2009).

- **IRM vasculaire**

L'IRM dynamique à contraste amélioré par injection d'agent de contraste (DCE-MRI : *dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging*) représente une méthode d'imagerie fonctionnelle utilisée dans l'évaluation des changements de perméabilité vasculaire dans les tissus et les tumeurs, ainsi que dans la quantification de la perfusion cérébrale. La RT induit des lésions vasculaires et de nombreuses toxicités à long-terme sont liées à la dévascularisation des tissus sains. Ces lésions sont liées à des atteintes de la perméabilité de la BHE, lesquelles sont corrélées à la survenue de maladies neurodégénératives (Wong et al., 2016). Dans leur étude, Wong et collaborateurs suggèrent que le DCE-MRI permettrait de détecter les dommages vasculaires de la BHE induits par une irradiation sur cerveau entier et pourrait alors être utilisé comme biomarqueur du dysfonctionnement neurocognitif (Wong et al., 2016). Les diagnostics de routine et la surveillance du traitement des tumeurs cérébrales reposent généralement sur une IRM utilisant des agents de contraste. Cependant, la capacité de l'IRM conventionnelle à différencier le tissu tumoral des effets post-thérapeutiques après résection neurochirurgicale, chimio-radiothérapie, radiochirurgie et/ou immunothérapie peut être limitée. En effet, une IRM réalisée de façon précoce, 24 à 72h après chirurgie, peut fausser le diagnostic du fait de la présence d'ischémie ou de réactions cellulaires aiguës (Galldiks et al., 2017; Lescher et al., 2014).

Ainsi, les changements histopathologiques précoces radio-induits relevés au niveau des vaisseaux sanguins comprennent la dilatation des vaisseaux, l'élargissement des cellules endothéliales ou encore une hypertrophie périvasculaire des astrocytes pouvant entraîner une perturbation de la BHE et, une augmentation de la perméabilité, conduisant à un œdème. Une lésion vasculaire aiguë après irradiation peut potentiellement être détectée avant le développement d'une démyélinisation aiguë et d'une nécrose de la substance blanche. Le DCE-MRI utilisant l'imagerie pondérée en T1 permet alors une évaluation quantitative de la perméabilité vasculaire du tissu cérébral avant et après une courte injection d'un traceur IRM dans la circulation sanguine. En suivant, le déplacement de ce traceur dans le volume de l'image et par modélisation compartimentale, la constante de transfert K_{trans} peut être calculée. K_{trans} représente donc le transport passif du traceur de l'espace intravasculaire vers l'espace extravasculaire. Ces caractéristiques fonctionnelles du microenvironnement vasculaire vont alors fournir une indication précoce des changements radio-induits pouvant être corrélés à des troubles cognitifs tardifs (Robbins et al., 2012). A ce jour, il existe peu d'études cliniques qui étudient par IRM vasculaire les effets de l'irradiation sur la perméabilité de la BHE ou sur la perfusion cérébrale. De même, les seules études précliniques sur ce sujet s'intéressent uniquement aux effets de la RT sur la tumeur et n'évaluent jamais les effets radio-induits sur le tissu cérébral sain. Il serait donc pertinent de mener des études en IRM vasculaire avec injection d'agent de contraste sachant que les altérations vasculaires ont lieu précocement après RT.

- **IRM fonctionnelle**

L'IRM fonctionnelle (IRMf) est une technique d'imagerie qui permet d'identifier les structures cérébrales activées lors de l'exécution d'une tâche spécifique en fonction du taux d'oxygène dans le sang. Au cours de l'activation neuronale, une augmentation focale et transitoire du flux sanguin se produit. Celle-ci peut être mesurée par des différences dans les propriétés magnétiques de l'hémoglobine, en fonction de son état d'oxygénation. La désoxyhémoglobine est paramagnétique et raccourcit donc le signal $T2^*$ du sang et de son environnement. L'oxyhémoglobine est diamagnétique et donc l'augmentation de l'oxygénation sanguine augmente le signal $T2^*$. Ce contraste dépendant du niveau d'oxygène dans le sang est appelé signal BOLD (*blood-oxygen-level dependent* ou dépendant du niveau d'oxygène sanguin) et peut être détecté à l'aide de séquences fortement pondérées en $T2^*$ telles que l'écho de gradient ou l'écho planaire. L'augmentation transitoire du signal $T2^*$

pendant l'activation neuronale est faible et détectée grâce à une approche de modèle linéaire (Ajithkumar et al., 2017). L'intensité du signal BOLD est réduite avec l'âge, l'augmentation du grade de la tumeur, une proximité de la tumeur avec la région cérébrale activée et une intervention chirurgicale antérieure (Ajithkumar et al., 2017). La précision de l'IRMf dans l'identification de l'activation des régions motrices semble être similaire à celle du *gold-standard* de la stimulation corticale directe : l'IRMf présente une sensibilité de 88% et une spécificité de 87%. Cette précision diminue avec l'augmentation du grade tumoral. En revanche, la corrélation entre l'IRMf et la stimulation corticale dans l'identification de la fonction du langage est inférieure à celle pour l'identification de l'activation motrice, avec une sensibilité de 80% et une spécificité de 78%. Le signal BOLD pouvant être affecté par la proximité de la tumeur, la latéralisation de la fonction langagière peut être affectée par l'intensité réduite de l'effet BOLD s'il est proche de la tumeur et ainsi le signal peut être trompeur (Ajithkumar et al., 2017). Actuellement, quelques études cliniques ont été menées pour déterminer l'intérêt de l'IRMf pour améliorer la planification de la RT afin d'épargner les structures cérébrales à risque telles que le cortex moteur primaire et le faisceau cortico-spinal (Wang et al., 2015). Avec les développements récents en IRM fonctionnelle adaptée au petit animal, il paraît pertinent d'étudier l'intérêt de cette modalité d'IRM pour détecter les lésions cérébrales induites par l'irradiation et déterminer si des biomarqueurs d'imagerie prédictifs des troubles cognitifs pourraient être proposés.

III-3.1.2 Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM)

La spectroscopie par résonance magnétique (SRM) est une technique non invasive permettant (1) d'interroger les distributions métaboliques dans le cerveau, (2) différencier la radionécrose de la progression de la tumeur cérébrale et (3) servir d'indicateur de la neurotoxicité après irradiation cérébrale qu'elle soit expérimentale ou clinique. Plusieurs métabolites peuvent être détectés dans le tissu cérébral par SRM comme la choline, la créatine, le glutamate, le lactate, le N-acétylaspartate (NAA), le myoinositol (ml) et la taurine (Robbins et al., 2012). La concentration de chacun de ces métabolites peut être cartographiée en 2D ou 3D et quantifiée. Le NAA est principalement reconnu comme marqueur neuronal et les diminutions observées sont associées à des dommages neuronaux et à un dysfonctionnement induit par la RT. La choline est associée à la synthèse des membranes cellulaires et/ou à un renouvellement métabolique accru ; son taux est élevé dans les tumeurs

et les processus inflammatoires. La créatine est un marqueur du métabolisme énergétique avec des concentrations relativement constantes dans tout le cerveau, alors que le myoinositol est un marqueur des cellules gliales et est utilisé comme indicateur de la dégradation de la myéline (Robbins et al., 2012).

Avec cette approche, une étude réalisée chez 35 patients traités par WBRT pour des métastases cérébrales a rapporté une corrélation entre les diminutions des concentrations de NAA dans l'hippocampe (reflétant la densité neuronale) et les troubles cognitifs mesurés par le test auditif d'apprentissage verbal et le test révisé de mémoire visuo-spatiale brève après RT (**Figure 56**). Les auteurs suggèrent que la baisse des concentrations de NAA pourrait être un biomarqueur permettant d'évaluer la perte neuronale après traitement et prédire la radiotoxicité cognitive (Pospisil et al., 2017).

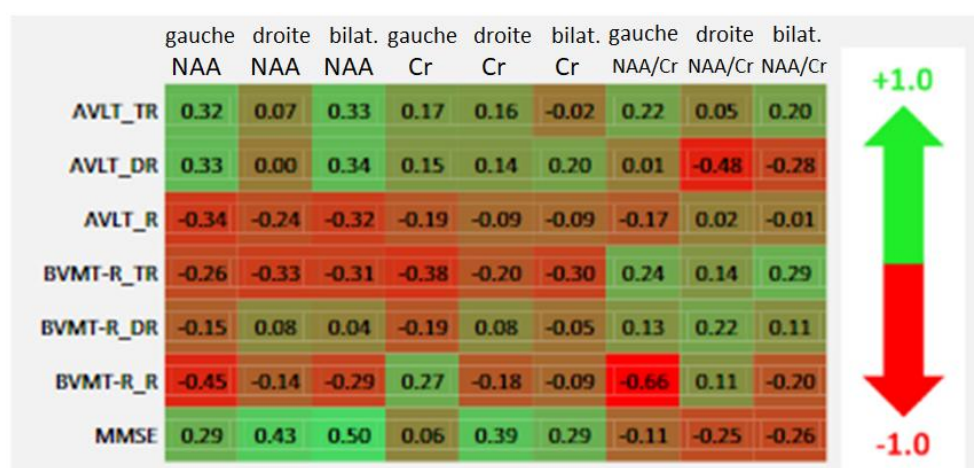


Figure 56 : Carte de corrélation de Heat Spearman entre les changements absolus observés dans les tests neurocognitifs et les changements relatifs dans les concentrations métaboliques mesurées par spectroscopie par résonance magnétique. La valeur du coefficient de corrélation est codée en couleur avec le vert représentant une corrélation positive et le rouge une corrélation négative. Abréviations : AVLT=test d'apprentissage verbal auditif; TR=rappel total; DR=rappel différé; R=reconnaissance; BVMT-R=bref test de mémoire visuo-spatiale révisé; MMSE=mini examen de l'état mental; NAA=concentration de N-acétylaspartate; Cr=concentration de créatine (Pospisil et al., 2017).

Des études sur des modèles animaux de radiotoxicité cérébrale ont aussi été menées par SRM. Par exemple, en 2017, Balentova et collaborateurs ont évalué chez le rat si les taux de métabolites cérébraux pouvaient être affectés par l'irradiation et s'ils pouvaient être corrélés aux altérations de la neurogenèse et aux réponses des cellules gliales au niveau du gyrus denté de l'hippocampe, de la zone sous-ventriculaire et des bulbes olfactifs (Balentova et al., 2017). Les auteurs ont alors noté une diminution significative du rapport N-acétylaspartate total/créatine totale (tNAA/tCr) dans le striatum et les bulbes olfactifs. Ceci était accompagné d'une baisse significative du ratio acide gamma-aminobutyrique (GABA)/tCr

au niveau de l'hippocampe et des bulbes olfactifs. Le métabolite tNAA est un marqueur neuronal prédominant qui diminue en cas de dommages neuronaux soit du fait d'un déclin fonctionnel soit par la réduction du nombre de neurones. La transmission GABAergique est, elle, impliquée dans la régulation de l'intégration synaptique, la génération d'un potentiel d'action et la plasticité neuronale. Le GABA est ainsi impliqué dans des processus tels que l'apprentissage et la mémoire ou des comportements agressifs-défensifs. La diminution de ces marqueurs des fonctions neuronales ou de neurotransmission (tNAA/tCr, GABA/tCr) est corrélée aux observations histologiques que sont la diminution ou l'absence de neurogenèse après irradiation et l'augmentation de la neurodégénérescence ainsi qu'une forte réponse astrocytaire. Ces changements métaboliques observés relativement tôt après irradiation (18-19 semaines après traitement) pourraient être des biomarqueurs prédictifs des changements cognitifs radio-induits observés tardivement (changements cognitifs radio-induits lors d'une tâche hippocampe-dépendante dont les données ne sont pas publiées dans l'étude mais mentionnées) (Balentova et al., 2017). Récemment, Pérès *et al.* ont également mis en évidence par SRM que l'irradiation tête entière chez la souris adulte (15 Gy) induit des diminutions de taurine associées à des atteintes de la neurogenèse rostro-caudale (NSCP depuis la zone sous-ventriculaire vers les bulbes olfactifs) (Pérès et al., 2018).

III-3.1.3 Tomographie par Emission de Positons (TEP)

L'imagerie métabolique utilisant la tomographie par émission de positons (TEP) permet de fournir des informations fonctionnelles comme le métabolisme de la tumeur, ce qui permet d'établir des diagnostics plus précis (Galldiks et al., 2017). La TEP permet par exemple la visualisation de la consommation de glucose, du transport des acides aminés ou de l'hypoxie présente dans la tumeur. Le ciblage de ces zones tumorales hautement prolifératives ou radiorésistantes avec une dose de RT plus élevée pourrait améliorer la survie des patients (Bolcaen et al., 2017). Les traceurs d'acides aminés comprenant la ^{11}C -méthionine, la ^{18}F -fluoroéthyltyrosine et la ^{18}F -L-3,4 dihydroxyphénylalanine offrent une sensibilité élevée, utile pour détecter les gliomes récurrents ou résiduels, y compris la plupart des gliomes de bas grade. L'intégration de la TEP et de l'IRM avec les systèmes de neuronavigation stéréotaxique permet de réaliser des biopsies stéréotaxiques pour obtenir un

diagnostic histologique plus précis ainsi qu'une meilleure planification de la RT conformationnelle et stéréotaxique (Herholz et al., 2012).

A partir d'un examen TEP [^{18}F] -FDG avec quantification de la consommation de glucose (CMRGlc), il a été montré chez des primates non-humains qu'une irradiation fractionnée du cerveau entier (5x8 Gy) induit 9 mois après traitement, une diminution de la consommation de glucose dans le cortex cunéiforme et préfrontal alors que celle-ci est augmentée dans le cervelet et le thalamus par rapport aux niveaux mesurés avant l'irradiation (**Figure 57**). De plus, ces modifications de métabolisme glucidique mesurées par TEP précèdent les atteintes cognitives détectées à 11 mois post-irradiation chez le primate non-humain (Robbins et al., 2011).

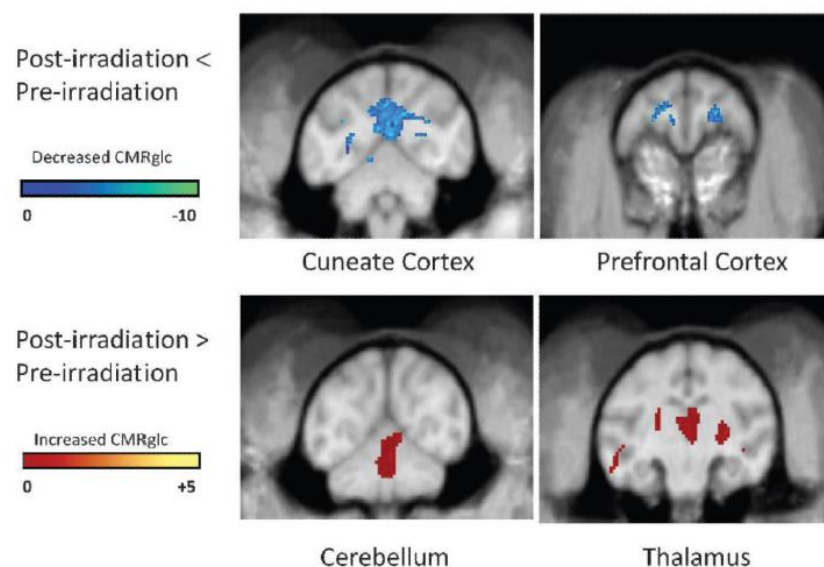


Figure 57 : Intérêt de la TEP- ^{18}F FDG pour évaluer les effets de la radiothérapie sur le métabolisme glucidique au niveau du cerveau. Des primates non-humains (singe Rhésus) ont subi une irradiation panencéphalique fractionnée d'une dose totale de 40 Gy, puis 9 mois après traitement le métabolisme glucidique au niveau du cerveau a été évalué par des examens TEP- ^{18}F FDG, pour quantifier la consommation de glucose (CMRGlc) dans les différentes structures cérébrales. Sont représentés dans cette figure les voxels qui ont des valeurs statistiquement différentes entre les mesures effectuées avant et après irradiation chez les mêmes animaux. En haut, les pixels bleus correspondent à des valeurs de CMRGlc significativement plus faibles après irradiation par comparaison aux valeurs obtenues avant irradiation. En bas, les pixels rouges correspondent à des valeurs de CMRGlc significativement plus élevées après irradiation par comparaison aux valeurs obtenues avant irradiation. La barre de couleur traduit le degré d'intensité de la différence sous forme de valeurs de t avec $p < 0,001$ (Robbins et al., 2011).

L'utilisation de l'imagerie multimodale TEP/IRM semble être une méthode adéquate et sensible pour le suivi de l'état de santé des patients soumis à une RT. Ainsi, l'approche présentée par l'équipe de Kovacs chez la souris Balb/c permet le dépistage simultané des effets de la RT sur le tissu cérébral sain (non-tumoral) et l'efficacité de la thérapie sur la tumeur. Pour cela, 3, 7, 30 et 60 jours après RT, des analyses IRM ont été réalisées par

« marquage de spins artériels » (ASL : *arterial spin labeling*), imagerie pondérée en diffusion (DWI) et TEP [^{18}F]-FDG du cerveau (Kovács et al., 2018). L'IRM de perfusion par ASL utilise l'eau du sang artériel marquée électromagnétiquement comme traceur diffusible pour mesurer le débit sanguin cérébral de manière non invasive (Monet et al., 2009). Des élévations des valeurs de captation du FDG ont été détectées en TEP dans l'ensemble du cerveau deux mois après irradiation. Les valeurs d'ADC obtenues par IRM de diffusion ont significativement diminué un mois après irradiation bien que l'ASL n'ait pas montré de changement significatif de perfusion au niveau cérébral (Kovács et al., 2018).

III-3.2 Biomarqueurs sanguins

La nécrose radio-induite et les troubles cognitifs sont les complications les plus graves de la RT. Leur développement est caractérisé par une évolution asymptomatique, une manifestation tardive, une irréversibilité et une variabilité interindividuelle. Il semble donc essentiel d'identifier des biomarqueurs diagnostiques, pronostiques et prédictifs pertinents. De ce fait, parallèlement aux différents outils d'imagerie, l'étude du compartiment sanguin peut aider à la surveillance du bon déroulement du traitement et l'apparition des toxicités liées à la RT. Ainsi en 2000, Richards et son équipe ont mesuré chez 33 patients souffrant d'un syndrome de fatigue chronique (SFC) et 27 témoins appariés selon l'âge et le sexe, la numération complète de la formule sanguine, la vitesse de sédimentation des érythrocytes, le taux de protéine C-réactive et les marqueurs de stress oxydatif. Les mesures effectuées ont alors révélé que les patients présentaient des augmentations de malondialdéhyde (MDA) (marqueur de l'oxydation des lipides, signe d'un stress oxydatif plus général de l'organisme), de méthémoglobine, du volume érythrocytaire moyen mais aussi de 2,3-diphosphoglycérate par rapport aux sujets témoins. La méthémoglobine s'est avérée être la principale composante associée à la variation de l'expression des symptômes de SFC comprenant fatigue, troubles musculosquelettiques, douleur et perturbation du sommeil. Les variations des taux de MDA et de 2,3-diphosphoglycérate ont, eux, été associés aux altérations cognitives et troubles du sommeil. Les auteurs soulignent que ces données suggèrent que le stress oxydatif dû à la formation excessive de radicaux libres contribue à la pathologie du SFC et est directement associé à l'expression des symptômes (Richards et al., 2000). Ces paramètres sanguins n'ont pour l'heure pas été étudiés pour évaluer les effets délétères de la

RT, notamment la fatigue radio-induite, mais laissent entrevoir des pistes pour de nouvelles études. D'autre part, les mécanismes de contrôle physiologique systémique impliquent le système endocrinien et celui-ci pourrait donc jouer un rôle important dans la neurotoxicité radique. Il a ainsi été proposé qu'il serait pertinent de réaliser des bilans biologiques hormonaux avec dosages sanguins de TSH, T3, T4, FSH, LH, PRL, Cortisol, GH, IGF1 et d'étudier si ces facteurs hormonaux pourraient être associés à la fatigue et aux déficits cognitifs radio-induits (Piskunov et al., 2015).

De plus, il est bien décrit dans la littérature que la RT induit du stress oxydatif par deux mécanismes : la radiolyse de l'eau due aux effets indirects des RI et également par la formation d'espèces réactives par les cellules irradiées, notamment à partir des mitochondries. Puis, les radicaux libres vont activer les cellules impliquées dans la neuroinflammation (microglie et astrocytes) qui à leur tour vont également générer des ROS qui vont maintenir ou augmenter le stress oxydatif (Azzam et al., 2012). Ainsi, les dosages des différentes espèces réactives et des enzymes antioxydantes à partir d'échantillons plasmatiques seraient très pertinents. Bien que plusieurs marqueurs plasmatiques du stress oxydatif aient été étudiés dans différentes maladies neurologiques, les données à ce sujet pour étudier les toxicités de la RT cérébrale sont fragmentaires (Malard et al., 2021).

En 2020, Sultana *et al.* ont publié une revue dans laquelle est synthétisée les études cliniques et précliniques ayant étudié de potentiels biomarqueurs sanguins, notamment en évaluant à partir d'échantillons plasmatiques des marqueurs des atteintes cellulaires impliqués dans la pathogenèse de la radiotoxicité cérébrale (activation et dommages cellulaires / inflammation / vascularisation). De même, à partir de lymphocytes prélevés dans du sang, des marqueurs des dommages à l'ADN et leurs réparations ont été investigués (**Tableau 5**).

Conditions physiologiques	Biomarqueurs
Inflammation (<i>plasma</i>)	TNF- α , Interleukines (IL-1 β , IL-4, IL-6 et IL-8) ICAM-1 Métalloprotéinase matricielle 9 (MMP-9) Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire I Protéine chimiotactique des monocytes I Cyclooxygénase 1 et 2
Activation et dommages cellulaires (<i>plasma</i>)	Protéine acide fibrillaire gliale Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) Molécule d'adhésion intercellulaire I (ICAM-I) anticorps anti-Aquaporine 4 Protéine basique de myéline Anticorps anti-NMDA Activation des monocytes endothéliaux
Angiogenèse (<i>plasma</i>)	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) Angiopoietine (Ang-1, Ang-2, Ang-3 et Ang-4) Tyrosine-protein kinase (Tie 2)
Dommages et réparation de l'ADN (<i>lymphocytes</i>)	P53-Binding protein I Protéine gamma de l'histone de la famille H2A (γ H2AX) Chromosomes dicentriques Micronoyaux

Tableau 5 : Biomarqueurs sanguins (*plasma ou lymphocytes*) des dommages cérébraux induits par la RT (Sultana et al., 2020)

Récemment, il a été développé un test réalisé à partir de lymphocytes de patients prélevés par prise de sang qui pourrait prédire les toxicités de la RT. Il s'agit d'un test basé sur la quantification de l'apoptose lymphocytaire radio-induite (RILA, *radiation-induced lymphocyte apoptosis assay*). Une première étude prospective a mis en évidence une corrélation significative entre l'apoptose des lymphocytes T CD4 et CD8 et la toxicité tardive radio-induite mais il n'y avait cependant aucune valeur prédictive de la toxicité aiguë. Des essais ultérieurs ont confirmé ces données dans différents types de cancer tels que le sein, la prostate, ou encore les cancers de la tête et du cou (Mirjolet et al., 2019; Talbot et al., 2019). Ce test semble donc un potentiel biomarqueur prédictif des toxicités de la RT et permet aussi d'évaluer la radiosensibilité individuelle. Toutefois, à ce jour, celui-ci n'a pas encore été testé chez des patients atteints de tumeurs cérébrales et traités par RT. Il serait donc très pertinent d'évaluer si le test RILA peut être un biomarqueur des toxicités de la RT cérébrale.

Pour conclure, les changements induits par la RT se développent lentement mais leurs conséquences anatomiques et fonctionnelles sur le cerveau sont très importantes et irréversibles. En effet, ces dommages cérébraux radio-induits affectent aussi bien l'état physique que mental des patients ce qui nuit considérablement à leur qualité de vie

(Balentova et al., 2019). Il est donc primordial d'une part, de mettre en place une stratégie thérapeutique visant à protéger ou réduire au maximum ces atteintes cérébrales induites par la RT et d'autre part de prendre en charge les dysfonctionnements cognitifs consécutifs à la RT afin d'améliorer la qualité de vie des patients traités.

IV – Stratégies thérapeutiques pour réduire les atteintes cérébrales radio-induites

IV-1 Les nouvelles modalités de RT

Les recherches se sont concentrées et se concentrent encore sur la réduction de la toxicité induite par la RT et l'amélioration des taux de survie ainsi que la gestion des rechutes locorégionales (Thompson et al., 2018). La prévention de la toxicité radio-induite dans le SNC s'est notamment focalisée sur des améliorations des techniques d'irradiation pour traiter efficacement la tumeur tout en minimisant la dose reçue par les structures importantes. Ainsi, de nouvelles modalités de RT ont récemment émergées pour répondre à ces problématiques.

IV-1.1 IMRT, SRS et SRT

L'IMRT (radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité), la SRS (radiochirurgie ou radiothérapie en condition stéréotaxique) et la SRT (radiothérapie conformationnelle en condition stéréotaxique) sont des traitements de haute précision guidés par l'imagerie dont les principes ont été détaillés précédemment dans la partie 2 du manuscrit (*voir page 69*).

L'IMRT permet de réduire la dose reçue par les structures saines avoisinant la tumeur et ainsi minimiser la toxicité (Thompson et al., 2018). L'intensité des photons variant sur chacun des faisceaux émis, cela permet une « peinture de dose » avec des distributions de dose hautement conformes même lorsque les volumes cibles ont des formes complexes (Choong et al., 2014).

L'IMRT a été développée pour éviter de manière spécifique l'hippocampe afin de préserver au maximum les CSN tout en délivrant une dose thérapeutique au parenchyme cérébral entier (**Figure 58**) (Brown et al., 2018; Smart, 2017). En effet, l'hippocampe est essentiel à la formation de la mémoire et à l'apprentissage. De plus, cette structure est

extrêmement radiosensible puisque même des faibles doses induisent une réduction significative de la neurogenèse associée à des déficits mnésiques (Wilke et al., 2017).

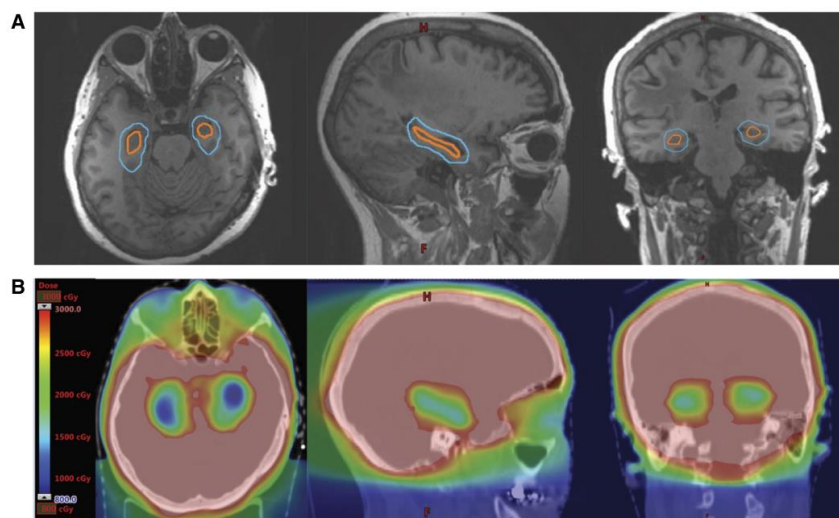


Figure 58 : Planification dosimétrique de l'épargne hippocampique réalisée par radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (IMRT). (A) La région d'évitement de l'hippocampe (en bleu) est générée en élargissant le contour de l'hippocampe (orange) de 5 mm. (B) Distributions de dose lors d'une irradiation panencéphalique (WBRT) avec épargne hippocampique représentées sur des images axiales, sagittales et coronales (Brown et al., 2018).

Ce type d'approche, souvent appelée WBRT d'évitement de l'hippocampe, a été évalué dans un essai clinique de phase II chez des patients présentant des métastases cérébrales (Brown et al., 2018; Smart, 2017). Cet essai a démontré que la préservation de l'hippocampe lors d'une irradiation du cerveau entier était associée à une préservation très prometteuse de la mémoire et de la qualité de vie en comparaison à des patients contrôles historiquement soumis à une RT photonique. Les patients ainsi traités présentaient un déficit moindre du rappel retardé (7% vs 30%) à 4 mois post- traitement (Brown et al., 2018; Smart, 2017; Wilke et al., 2017).

La SRS ou la SRT permettent d'irradier à haute dose de très petits volumes. Aujourd'hui, la RT est souvent administrée aux tumeurs cérébrales selon les principes stéréotaxiques et avec une dose plus élevée par fraction (Snider & Mehta, 2016). En divisant la dose entre plusieurs faisceaux, la région à dose élevée reste très conforme à la cible avec une diminution rapide de la dose à distance de la tumeur. Dans les contextes de ré-irradiation, ces techniques aident à minimiser les complications (Snider & Mehta, 2016). Ainsi, la réduction des volumes de traitement aux seules tumeurs visibles grâce à la SRS s'est également avérée bénéfique pour la mémoire à court-terme après le traitement par rapport à la WBRT (Smart, 2017). En effet, un essai contrôlé a comparé l'utilisation de la SRS seule à la

SRS associée à une WBRT chez des patients présentant 1 à 3 métastases cérébrales. Les patients survivants à long terme ont ensuite été évalués à 3 et 12 mois sur différents paramètres cognitifs tels que la fluidité verbale, la vitesse de traitement et la fonction exécutive. Les auteurs ont alors constaté une moindre détérioration cognitive à 3 mois après SRS seule (63,5% vs 91,3%) et à 12 mois (60% vs 94,4%). Par conséquent, l'épargne des tissus sains lors de l'irradiation diminue la toxicité fonctionnelle (Smart, 2017). Cette moindre atteinte de la fonction cognitive est restée significative 1 an après le traitement chez les patients ayant reçu la SRS seule et ce, sans compromettre les résultats de survie, établissant à présent la SRS comme la norme de soin pour cette population de patients. En outre, les auteurs ont relevé une meilleure qualité de vie chez les patients traités par SRS seule vis-à-vis de ceux traités par WBRT (Wilke et al., 2017).

IV-1.2 Protonthérapie

L'hadronthérapie qui consiste en une irradiation par faisceaux de protons ou par particules d'ions lourds (ions allant de l'hélium à l'oxygène en passant par le carbone) est une forme émergente de RT par faisceau externe qui suscite une attention croissante ces dernières années. En effet, ces particules présentent une précision balistique du fait de leur capacité à déposer de l'énergie sur une plage étroite, nommée le « pic de Bragg », permettant ainsi de cibler la tumeur tout en déposant une dose minimale en amont en aval du pic de Bragg. (**Figure 59**)

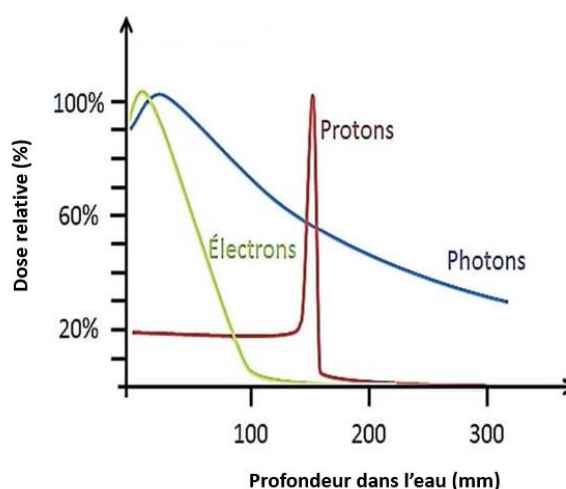


Figure 59 : Représentation graphique de la distribution de la dose relative de différents types de faisceaux d'irradiation (photons, électrons et protons) en fonction de la profondeur d'eau traversée (source : <https://www.protontherapie.fr/qu-est-ce-que-la-protontherapie/>).

De plus, la protonthérapie présente très peu de dispersion latérale. Cette technique est idéale pour l'administration du traitement dans des sites difficiles avec des OAR proches de la zone cible tels que la base du crâne ou la colonne vertébrale (**Figure 60**) (Choong et al., 2014; Snider & Mehta, 2016; Thompson et al., 2018).

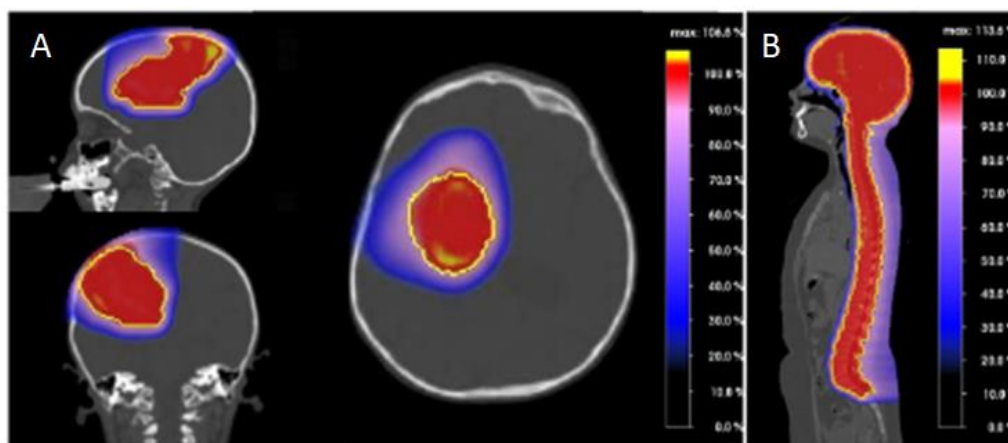


Figure 60 : Distribution de dose par protonthérapie. (A) Vues sagittale, axiale et coronale de la distribution de dose de protons pour une tumeur pariéto-frontale. Le PTV est affiché en jaune. (B) vue sagittale de la distribution de dose de protons pour l'irradiation crâniospinale. Le PTV est affiché en jaune. A noter que l'échelle de projection des couleurs affiche tous les niveaux de dose. Ainsi, l'absence de couleur équivaut à l'absence de dose (Weber et al., 2020).

La comparaison de l'utilisation de la protonthérapie par rapport à l'IMRT chez des patients atteints de gliomes de bas grade via une comparaison dosimétrique et une modélisation biologique des toxicités potentielles induites par les RI a permis d'explorer les potentiels avantages qu'offre la protonthérapie. La dose uniforme équivalente des protons pour la plupart des structures tissulaires saines à proximité immédiate était 10 à 20 Gy inférieure à celle délivrée par l'IMRT. De plus, le rapport moyen de risque carcinogène secondaire IMRT/protons est de 2,2, ce qui démontre que le risque de tumeurs secondaires est systématiquement plus élevé avec l'IMRT (Dennis et al., 2013).

Ainsi, la protonthérapie réduit efficacement la dose aux tissus sains avoisinant la tumeur et limite les effets secondaires. Cela permet de traiter davantage les tumeurs situées à proximité d'organes très sensibles (Dennis et al., 2013; Weber et al., 2020). Toutefois, des recommandations très spécifiques sont établies pour la prise en charge de tumeurs particulières puisque des études cliniques et précliniques sont encore nécessaires pour démontrer que les atteintes neuropathologiques induites par l'irradiation cérébrale sont moindre avec la protonthérapie que la RT photonique. Comme présenté sur la **Figure 61**, des modifications cérébrales ont été observées après exposition seulement de l'hippocampe droit de souris saines (non porteuses de tumeurs) à un faisceau de protons. Par des analyses

histologiques basées sur des colorations éosine/hématoxyline, des modifications tissulaires telles que des anomalies vasculaires, une gliose réactionnelle et une dispersion des cellules granulaires de l'hippocampe ont été observées dans l'hippocampe droit exposé à des doses importantes de protons et aussi, mais dans une moindre mesure dans l'hippocampe controlatéral qui n'a pas été irradié (**Figure 61**) (Suckert et al., 2021). Les auteurs ont également noté que tous les effets observés dépendaient fortement de la dose de protons (0 Gy, 45 Gy, 65 Gy ou 85 Gy et 0 Gy, 40 Gy, 60 Gy ou 80 Gy selon la souche de souris considérée).

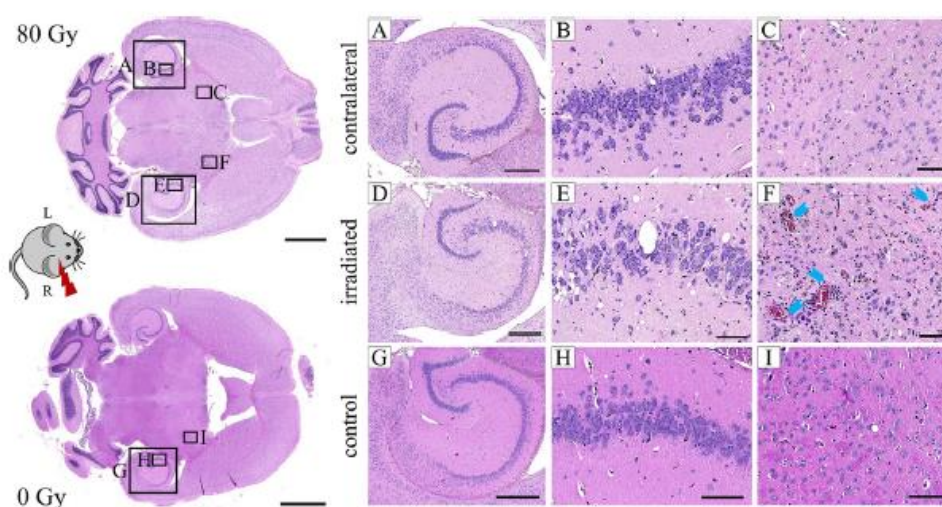


Figure 61 : Evaluation par histologie éosine/hématoxyline (HE) des effets de la protonthérapie ciblée sur l'hippocampe chez la souris. Images représentatives des marquages HE dans l'hippocampe de cerveau de souris irradiées par protons à 80 Gy (A–F) ou de souris témoins (G–I). Chez les souris irradiées, seul l'hémisphère droit a été irradié par protons (A–C), l'hémisphère gauche (D–F) n'a reçu aucune dose. Echelle (de gauche à droite) : 2 mm, 500 μ m, 100 μ m, 100 μ m (Suckert et al., 2021).

De plus, des études comportementales longitudinales chez le rat n'ont montré aucun dysfonctionnement moteur ou émotionnel significatif chez les rats irradiés par mini-faisceaux de protonthérapie par rapport aux rats témoins. En outre, des performances similaires ont été observées lors de l'évaluation de la fonction cognitive, bien que de légers retards d'apprentissage puissent être présents dans certains des tests réalisés à long terme après irradiation. Cette étude montre donc l'impact minimal de la protonthérapie au niveau du cerveau sain (Lamirault et al., 2020).

IV-1.4 Irradiation FLASH

La RT-FLASH consiste à délivrer de façon ultra-rapide des photons à des débits de dose généralement plusieurs milliers de fois supérieurs à ceux actuellement utilisés en pratique

clinique de routine (RT conventionnelle). Bien que la comparaison de la RT-FLASH à la RT conventionnelle ait initialement été caractérisée en utilisant un débit de dose moyen – c’est-à-dire 40 Gy/s pour la RT-FLASH *versus* 0,01 Gy/s pour la RT conventionnelle – la définition complète est plus complexe et implique plusieurs paramètres physiques interdépendants tels que le nombre de répétitions, les impulsions et la durée totale d’exposition (Bourhis et al., 2019). Ainsi la RT-FLASH utilise des débits de dose instantanés $\geq 10^6$ Gy/s soit 10 Gy délivrés en 1 à 10 impulsions de 1,8 μ s (Montay-Gruel et al., 2020) (**Tableau 6**). Il est important de souligner que la dose totale de RT est délivrée en une seule fraction. La principale observation faite après exposition des tissus biologiques à la RT-FLASH est une protection relative des tissus sains par rapport à la RT avec un débit de dose conventionnel (Bourhis et al., 2019).

WBRT à doses uniques		Paramètres de faisceau				
Mode	Dose prescrite	Fréquence (Hz)	SSD (mm)	Largeur d’impulsion (μ s)	Nb d’impulsions	Temps de traitement (s)
CONV	10 Gy	10	800	1.0	1,170-1,180	116.9-117.9
FLASH	10 Gy	100	369-370	1.8	1	$1.8 \cdot 10^{-6}$

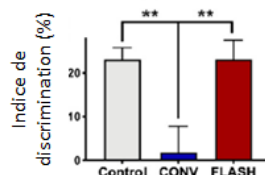
Tableau 6 : Paramètres d’irradiation selon la modalité choisie : radiothérapie conventionnelle (CONV) ou radiothérapie FLASH (FLASH). SSD = Source to Skin Distance (distance entre la source et la peau)

En effet, en 2019, Simmons et son équipe ont réalisé une irradiation de 30 Gy sur cerveau entier de souris C57BL6/J en moins d’une seconde. Cela correspond à une irradiation FLASH sachant que le temps de distribution lors d’une irradiation conventionnelle est de 240s ; les autres paramètres sont maintenus constants. Dix semaines après irradiation, les auteurs ont relevé que les animaux soumis à une irradiation conventionnelle ont une altération significative de leurs performances lors des tâches de reconnaissance et de localisation du nouvel objet contrairement à la même dose administrée cette fois de façon FLASH. En outre, l’irradiation conventionnelle était associée à une microglie activée significativement augmentée par rapport au groupe témoin, phénomène qui n’était pas observé avec l’irradiation FLASH. Les auteurs ont alors conclu que l’irradiation FLASH permettait de diminuer les troubles cognitifs et la neurodégénérescence associée vis-à-vis d’une irradiation conventionnelle. Ceci serait potentiellement dû à la diminution de la neuroinflammation et constituerait une approche prometteuse pour augmenter l’index thérapeutique de la RT des tumeurs cérébrales (Simmons et al., 2019).

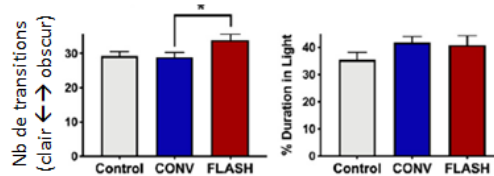
Afin de contourner les complications cliniques observées chez les survivants de médulloblastome, Alagband et son équipe ont étudié la capacité de la RT-FLASH à protéger

le cerveau de souris juvéniles, connu pour être très radiosensible, des toxicités. La RT-FLASH présente un effet protecteur vis-à-vis du tissu cérébral par comparaison à la RT conventionnelle puisqu'à dose équivalente (8 Gy), la RT FLASH entraîne des réductions marquées de plusieurs facteurs comportementaux affectés par la RT conventionnelle (test de reconnaissance de l'objet nouveau, test de reconnaissance de place, test d'extinction de la peur, dispositif avec un compartiment clair-obscur, interaction sociale) (**Figure 62**). De même, des analyses immunohistologiques réalisées 4 mois après irradiation cérébrale ont montré que le nombre de neurones immatures (doublecortine+) et matures (NeuN+) dans l'hippocampe était plus important après RT-FLASH par rapport à la RT conventionnelle et que l'activation microgliale (CD68+/Iba-1+) radio-induite était moindre avec la RT -FLASH (Alaghband et al., 2020). En conclusion, cette étude préclinique a démontré que la RT-FLASH s'avère en mesure d'améliorer les troubles cognitifs radio-induits dans plusieurs paradigmes comportementaux indépendants (**Figure 62**), de préserver les neurones à la fois en développement et matures, de minimiser la neuroinflammation et de limiter la réduction des taux plasmatique de l'hormone de croissance (Alaghband et al., 2020).

A Test de Reconnaissance d'objets



B Test boîte claire-obscur



C Test interaction sociale

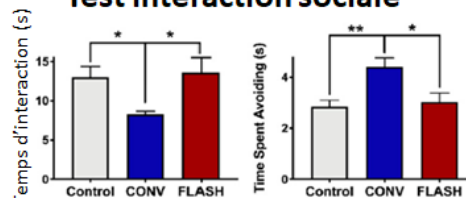


Figure 62 : La RT FLASH minimise les altérations mnésiques radio-induites ainsi que les comportements de type anxieux. Lors de cette étude, 3 groupes d'animaux ont été étudiés et comparés : des souris non-irradiées (groupe control), des souris irradiées par approche conventionnelle (8Gy) (groupe CONV) ou des souris irradiées par RT FLASH (8Gy) (groupe FLASH). La fonction cognitive des souris a été évaluée en utilisant la tâche de reconnaissance de l'objet nouveau (A) et le test de la boîte claire-obscur (B) à 4 mois post-RT accompagné d'un test d'interaction sociale (C). Tous les graphiques sont représentés en

moyenne $\pm$ SEM ($n = 14-16$ par groupe) ; les valeurs de p ont été comparées au groupe CONV et dérivées de l'ANOVA à un facteur suivi d'un test t avec la correction de Bonferroni pour comparaisons multiples : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Alaghband et al., 2020).

La protection constante du tissu sain chez différentes espèces (souris, chat, cochon, poisson-zèbre), l'ampleur du bénéfice et les excellents effets antitumoraux observés jusqu'à présent suggèrent que l'effet FLASH pourrait également être reproduit chez les patients humains. Ceci encourage l'évaluation de l'intérêt de la RT-FLASH pour préserver le tissu cérébral des effets délétères de la RT dans des essais cliniques (Bourhis et al., 2019).

En 2018, Montay-Gruel et collaborateurs ont apporté la preuve de concept que l'effet FLASH peut être obtenu à partir de rayons X. Les synchrotrons de 3^e génération sont les seules installations permettant de transposer l'irradiation FLASH par rayons X en clinique. Ils présentent néanmoins des limites du fait de leur taille et de leur coût. Cependant, cette problématique pourrait être contournée par l'utilisation de sources synchrotron compactes (ThomX, MAP) capables de produire des rayons X de haute énergie et de délivrer des débits de dose supérieurs à 100Gy/s. Des études ont ainsi démontré à l'échelle préclinique que la RT-FLASH minimise la toxicité radio-induite grâce à une production réduite de ROS toxiques (**Figure 63**) (Montay-Gruel, 2018 ; Montay-Gruel, 2019).

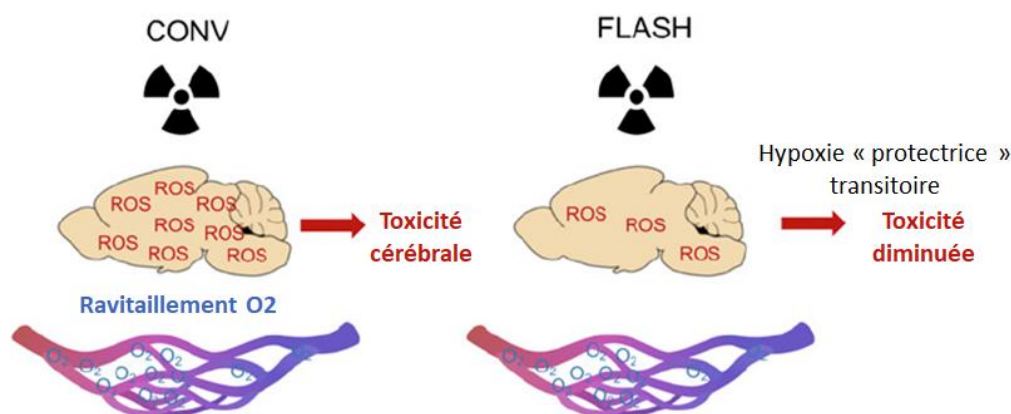


Figure 63 : Effets distincts de la RT FLASH de la RT conventionnelle (CONV). La RT FLASH induit une déplétion rapide de l'oxygène et une hypoxie locale transitoire, réduisant ainsi les taux de ROS et la radiotoxicité dans le tissu cérébral sain comparativement à une irradiation CONV (Montay-Gruel et al., 2019).

Il en résulte alors que la RT-FLASH permet d'augmenter la tolérance du tissu cérébral sain, ce qui offre la possibilité d'augmenter les doses d'irradiation tout en évitant les effets neurotoxiques tardifs (Montay-Gruel et al., 2019). Le bénéfice de la RT-FLASH, délivrée soit

par des électrons, soit par des rayons X, pourrait être important pour les patients atteints de tumeurs cérébrales. Cette approche pourrait alors être particulièrement intéressante pour les patients atteints de glioblastomes, de médulloblastomes ou encore de métastases cérébrales puisqu'elle donne l'opportunité d'augmenter la dose en toute sécurité en vue d'améliorer le contrôle de la tumeur (Montay-Gruel et al., 2018).

En conclusion, les progrès techniques réalisés au cours des dernières décennies ont transformé la RT en un traitement précis et puissant pour le traitement des patients cancéreux. Néanmoins, le traitement des tumeurs radio résistantes est toujours limité par la dose limite recevable par les tissus sains environnants (Bourhis et al., 2019). En effet, la RT encéphalique administrée à un débit de dose standard (0,1 à 2,0 Gy/min) provoque une grande variété de dommages temporellement distincts de la RT conventionnelle présentant invariablement des signes de neuroinflammation. Il a ainsi été démontré que les systèmes immunitaires inné et adaptatif étaient impliqués dans la modulation des atteintes du SNC observées en réponse à l'irradiation. Ainsi, l'activation astrocytaire et microgliale ainsi que la libération de cytokines pro-inflammatoires définissent un schéma complexe de toxicités du tissu cérébral sain qui ne se résolvent jamais complètement (Montay-Gruel et al., 2020). Ces nouvelles modalités, telles que l'hadronthérapie et la RT-FLASH, promettent la possibilité d'augmenter la dose dans la zone cible tout en diminuant significativement la dose au niveau des tissus sains. La RT restera un pilier, en particulier de la thérapie adjuvante, pour le traitement des tumeurs cérébrales et pourrait avoir un rôle croissant avec l'avènement de nouvelles technologies (Snider & Mehta, 2016).

La question de la préservation des fonctions cérébrales via la diminution de l'irradiation des structures saines reste prépondérante mais il est également fondamental de pouvoir proposer une (des) alternative(s) lorsque ces nouvelles modalités de RT ne peuvent être mises en place.

IV-2 Thérapies médicamenteuses

A mesure que le nombre de patients survivants à long-terme après RT cérébrale ait augmenté, il est apparu essentiel de prendre en charge cliniquement le déclin cognitif radio-induit. En effet, bien qu'une démence franche soit rare, les atteintes cognitives cliniquement

significatives sont courantes et sous-diagnostiquées. Une fois le déficit cognitif diagnostiqué, il existe peu d'options pour la prise en charge de ces troubles. C'est pourquoi, ces dernières années d'importants efforts sont réalisés pour identifier de nouvelles approches médicamenteuses permettant de limiter ou éviter le déclin cognitif après une irradiation cérébrale (Attia et al., 2014). A ce titre, différentes molécules ont été testées dans le cadre d'une prise en charge médicamenteuse des troubles cognitifs consécutifs à la RT.

Plusieurs molécules ont été étudiées pour leur potentiel neuroprotecteur. La mémantine, antagoniste voltage-dépendant non compétitif des récepteurs NMDA, serait neuroprotectrice en empêchant le remodelage synaptique radio-induit chez la souris (**Figure 64**) (Duman et al., 2018).

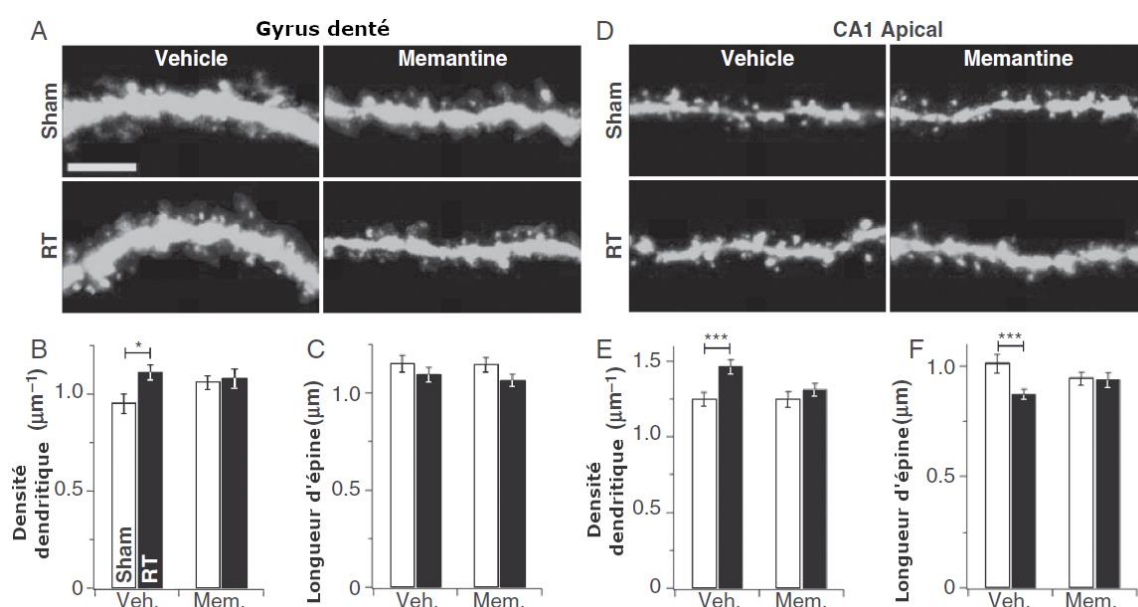


Figure 64 : Effet neuroprotecteur de la mémantine dans un modèle de radiotoxicité cérébrale chez la souris. (A) Images représentatives des segments dendritiques des cellules granulaires du gyrus denté chez des souris irradiées (RT, 10 Gy) ou non (sham) et traitées par la mémantine (Mem) ou son véhicule (Veh). **(B)** Quantification de la densité d'épines dendritiques. **(D-E)** Mêmes données qu'en A et B mais analyses réalisées sur les dendrites apicales secondaires proximales des neurones pyramidaux CA1 (Duman et al., 2018).

Par ailleurs, le donépézil qui est déjà utilisé dans le traitement de la maladie d'Alzheimer pour une démence légère à modérée, pourrait être également une molécule neuroprotectrice vis-à-vis de la neurotoxicité radique (Attia et al., 2014; Shaw & Ball, 2013). En effet, l'utilisation de cet inhibiteur de l'acétylcholinestérase, permettrait de retarder la dégradation de l'acétylcholine dans les fentes synaptiques, améliorant ainsi la neurotransmission cholinergique et par conséquent réduisant les lésions cérébrales.

Enfin, il a été montré que l'effet neuroprotecteur du lithium permet de limiter les déficits cognitifs radio-induits (Khasraw et al., 2012). En effet, le carbonate de lithium, utilisé en psychiatrie comme stabilisateur de l'humeur depuis la fin des années 1940, pourrait limiter les atteintes cognitives induites par l'irradiation en améliorant la neurogenèse hippocampique (Khasraw et al., 2012). De plus, les NSCP répondent positivement au traitement au lithium, ce qui se traduit par une amélioration des performances cognitives (Khasraw et al., 2012 ; Shaw & Ball, 2013). Bien que le lithium présente des bénéfices cognitifs chez l'animal après irradiation, l'effet neuroprotecteur de ce traitement doit à présent être validé chez l'Homme (Shaw & Ball, 2013).

Il est important de noter qu'à ce jour aucune molécule n'a démontré une neuroprotection cliniquement significative. Ceci dit, de nombreux autres agents médicamenteux sont actuellement testés pour leur potentiel neuroprotecteur, régénératif, anti-oxydant ou pro-cognitif dans le but de réduire l'impact d'une irradiation cérébrale sur les fonctions neurocognitives.

Plus récemment, une autre approche thérapeutique a émergé. Il s'agit d'un ensemble de thérapies non-médicamenteuses visant à atténuer ou guérir les patients atteints de troubles cognitifs et se plaignant d'une fatigue après traitement par RT et dont la qualité de vie s'en trouve directement impactée.

IV-3 Thérapies non-médicamenteuses

IV-3.1 Remédiation cognitive

Le terme de "remédiation cognitive" fait référence à une prise en charge neuropsychologique pour prévenir ou soigner les déficits cognitifs (Coomans et al., 2019). La remédiation cognitive se base sur le concept de plasticité cérébrale qui permet en permanence à l'individu d'apprendre et va lui permettre d'améliorer ses aptitudes cognitives. Les patients vont tout d'abord être amenés à compenser leurs troubles cognitifs par l'apprentissage de nouvelles stratégies ou d'alternatives afin d'améliorer leur quotidien. Cela va passer par la gestion du rythme, la décomposition d'une tâche complexe en plusieurs étapes plus facilement atteignables et enfin par l'utilisation de moyens mnémotechniques. Dans un second temps, les patients pourront pratiquer des exercices visant à « ré-entraîner »

leurs fonctions cognitives comme l'attention, la mémoire et les fonctions exécutives afin de pouvoir à terme recourir d'avantage à ces aptitudes qui leur font défaut et impactent leur vie quotidienne (Coomans et al., 2019; Sacks-Zimmerman et al., 2015).

La remédiation cognitive peut se faire de façon individuelle ou en groupe, à la maison ou dans des centres de réhabilitation, avec une approche traditionnelle en face à face ou bien à l'aide de programmes sur ordinateur (Coomans et al., 2019). A l'heure actuelle, il n'y a pas de consensus sur le moment le plus opportun pour commencer cette thérapie. Cependant, pour minimiser ou prévenir les problèmes cognitifs dus aux traitements anticancéreux, la remédiation cognitive doit commencer le plus tôt possible. Ainsi, un programme d'entraînement cognitif entamé précocement après chirurgie chez des patients atteints d'une tumeur cérébrale a montré une amélioration des troubles cognitifs après quelques semaines lors d'un essai clinique randomisé mené en 2012 (Coomans et al., 2019; Zucchella et al., 2013). Néanmoins, les patients souffrant de tumeurs cérébrales subissent généralement plusieurs schémas thérapeutiques intensifs faisant appel à une chimiothérapie et une radiothérapie concomitante. Il apparaît intéressant de proposer cette thérapie de remédiation cognitive après les traitements antitumoraux. Cette approche conviendrait alors davantage aux patients ayant un pronostic plus long. En effet, à ce moment, les patients tentent de reprendre leurs activités quotidiennes et leur travail. Ils vont alors ressentir de façon importante leurs troubles cognitifs, c'est pourquoi des programmes flexibles et informatisés pouvant s'ajuster aux besoins spécifiques de chacun et pouvant se faire à domicile devraient particulièrement leur convenir (Coomans et al., 2019). C'est en faisant cette constatation que l'équipe de Sacks-Zimmerman publie en 2015 une étude préliminaire sur l'efficacité d'un programme de remédiation cognitive informatisé (disponible en ligne). Cette étude se base sur les données obtenues à partir de 3 patients ayant été traités pour des gliomes de bas grade et ayant achevé ce programme de formation informatisé. Les premiers résultats de cette étude pilote suggèrent qu'à la fin du programme la mémoire de travail et l'attention sont améliorées par rapport aux scores initiaux obtenus avant la réalisation du programme de remédiation cognitive (Sacks-Zimmerman et al., 2015). Yang et collaborateurs ont mis en place un programme de remédiation cognitive basé sur l'utilisation de la réalité virtuelle. Ce type d'entraînement, basé sur un environnement en temps réel et en trois dimensions, permet aux

patients de se confronter progressivement à certains aspects de la vie quotidienne (**Figure 65**) (Yang et al., 2014).



Figure 65 : Programmes de remédiation cognitive par utilisation de la réalité virtuelle à partir du système IREX (Vivid Group, Toronto, Canada). Ce type d'entraînement est basé sur un environnement en temps réel et en trois dimensions qui permet aux patients de se confronter progressivement à certains aspects de la vie quotidienne (Yang et al., 2014).

Les patients concernés par le programme ont reçu à la fois l'entraînement en réalité virtuelle et la remédiation cognitive assistée par ordinateur qui visait à améliorer la mémoire et l'attention. Les résultats ont montré une amélioration des fonctions mnésiques (mémoire spatiale, reconnaissance, rappel séquentiel, rappel verbal, catégorisation verbale, mémoire verbale et non-verbale) mais également de l'attention (discrimination, perception visuelle, perception auditive, attention continue, intégration et attention émotionnelle) et des compétences de la vie quotidienne (Bergo et al., 2016; Yang et al., 2014).

Bien que ce type de thérapie soit reconnu comme efficace et souvent intégré dans le protocole de soin des troubles cognitifs chez des patients atteints d'un AVC ou d'un traumatisme cérébral, cette démarche n'est pas encore proposée de façon systématique aux survivants de cancers et en particuliers de tumeurs cérébrales (Cherrier et al., 2013; Coomans et al., 2019). Les premières données cliniques sur le sujet permettent cependant aux auteurs de mettre en avant ce traitement, en espérant que celui-ci soit intégré dans la continuité des soins chez les patients survivants d'une tumeur cérébrale (Sacks-Zimmerman et al., 2015). L'accès à un programme de remédiation cognitive sous forme informatique apparaît comme plus flexible et moins contraignant pour le patient que des rendez-vous réguliers en face à face (Bergo et al., 2016).

IV-3.2 Activité physique

L'activité physique (AP) est décrite par l'OMS comme étant « tout mouvement produit par les muscles squelettiques, responsable d'une augmentation de la dépense énergétique ».

Dans la littérature scientifique, les auteurs parlent indifféremment et à tort d'activité physique, d'exercice physique ou encore d'entraînement physique. Il est donc nécessaire de bien différencier ces termes. Tel que définit plus haut, l'activité physique apparaît comme l'expression d'un large éventail d'AP menées de façon régulière ou irrégulière qui peuvent se faire de manière relativement non structurée et non planifiée. Les formes spécifiques d'AP qui sont planifiées et structurées sont appelées « exercices physiques ». Les exercices physiques se distinguent ensuite selon leur temporalité, ce qui permet de distinguer un exercice physique aigu d'un exercice physique chronique. Ces exercices physiques chroniques peuvent être qualifiés « d'entraînement physique » s'ils sont effectués de manière régulière, planifiée, structurée et raisonnée dans le but d'augmenter ou de maintenir les conditions physiques individuelles. Savoir distinguer et utiliser soigneusement ces termes permet une meilleure classification et interprétation des effets observés et mécanismes biologiques sous-jacents. Cependant, certaines confusions subsistent encore (Herold et al., 2019).

Le programme national nutrition santé (PNNS) a classé en 4 types les différentes pratiques d'AP en fonction des qualités physiologiques développées : cardio-vasculaire, les fonctions musculaires, la souplesse et l'équilibre. L'AP peut être pratiquée aussi bien au travail qu'à la maison (montée et descente d'escaliers, travaux ménagers, bricolage...), dans les transports ou lors des loisirs (sport ou autre activité pratiquée sans encadrement : promenade, parcours santé aménagés...). De plus, le Plan cancer 3 (2014-2019) intégrait la promotion de l'activité physique encadrée et ajustée (APA : activité physique adaptée) dans ses objectifs.

IV-3.2.1 Effet de l'activité physique sur le cerveau

La recherche préclinique a montré que la pratique d'un exercice physique après une lésion cérébrale acquise permet d'augmenter les facteurs de croissance au niveau cérébral, réduire les processus liés à l'apoptose, favoriser la neurogenèse, la survie neuronale et la régénération. De plus, cela permet également de réduire la taille des lésions, moduler les réponses inflammatoires, réduire l'astroglie et améliorer le flux sanguin cérébral

(Wogensen et al., 2015). De plus, en augmentant la neurogenèse (**Figure 66**) et l'expression de protéines associées à la plasticité synaptique, l'exercice physique influence positivement les fonctions mnésiques chez la souris saine (Hwang et al., 2016).

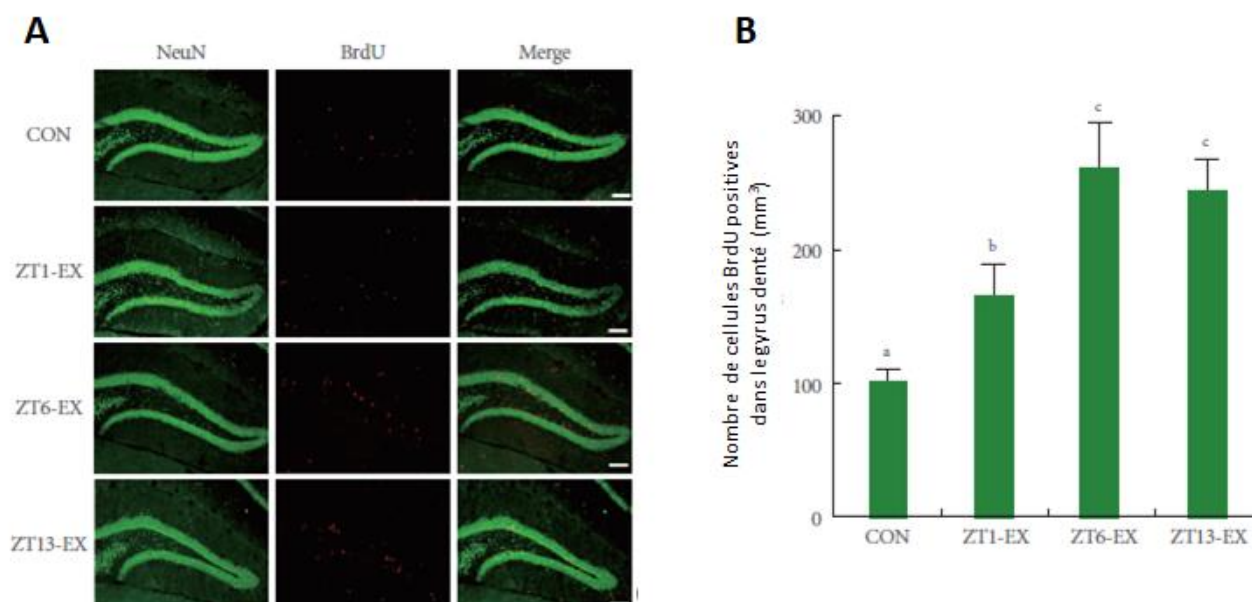


Figure 66 : Effets de l'exercice physique réalisé à l'aide d'un tapis roulant sur la neurogenèse dans le gyrus denté de l'hippocampe chez la souris. (A) Images représentatives d'immunomarquages des cellules BrdU+ dans le gyrus denté. Echelle : 200 μ m. **(B)** Nombre de cellules BrdU+ dans chaque groupe expérimental. Abréviations : CON, groupe contrôle ; ZT1-Ex, groupe exercice sur tapis roulant au zeitgeber 1 ; ZT6-Ex, groupe exercice sur tapis roulant au zeitgeber 6 ; ZT13-Ex, groupe exercice sur tapis roulant au zeitgeber 13 ; NeuN, noyaux neuronaux ; BrdU, 5-bromo-2'-désoxyuridine. Les lettres (a-c) indiquent des différences statistiquement significatives (Hwang et al., 2016).

Chez l'Homme, les résultats d'études épidémiologiques et interventionnelles suggèrent que l'AP améliore toute une variété de processus cognitifs, en particulier ceux liés aux fonctions exécutives contrôlées par le lobe frontal telles que la mémoire de travail, la planification ou la flexibilité cognitive. De plus, la pratique d'une AP permettrait de réduire le déclin cognitif associé au vieillissement à la fois normal et pathologique, notamment dans des conditions neurodégénératives (Jacotte-Simancas et al., 2013). En effet, les études sur le vieillissement cérébral ont montré que l'exercice physique a un effet réparateur remarquable en stimulant les régions et structures atrophiées telles que les structures de substance blanche et l'hippocampe améliorant ainsi la cognition de l'individu. Ces effets sont particulièrement encourageants pour le cerveau irradié qui présente de nombreuses similitudes avec le cerveau âgé : diminution de la prolifération cellulaire, diminution du taux d'hormone de croissance et augmentation de l'inflammation (Rodgers et al., 2013).

C'est pourquoi, l'AP apparaît de plus en plus comme un moyen non-pharmacologique intéressant pour combattre les effets négatifs des traitements anticancéreux (Tang et al., 2016).

IV-3.2.2 Prévention

D'après l'OMS, la pratique d'une AP régulière et adaptée chez l'adulte améliore certaines fonctions de l'organisme et prévient de nombreuses pathologies chez un individu sain. Dans ce contexte, l'AP a souvent été étudiée dans la lutte contre la surcharge pondérale ou les maladies cardiovasculaires (Hwang et al., 2016).

En 2010, De Lisio et son équipe s'intéressent aux effets de l'exercice physique préventif sur le muscle squelettique dans un contexte d'irradiation. En effet, une surproduction de ROS peut être à l'origine d'un stress oxydatif qui peut endommager les macromolécules présentes dans la cellule et conduire à un dysfonctionnement ou à la mort cellulaire. Dans cette étude, les souris sont réparties en deux groupes principaux : souris entraînées à l'exercice (EX) ou non entraînées (NT). Chaque groupe est alors sous-divisé en deux : un sous-groupe est soumis à une irradiation corps entier avec des rayons gamma tandis que le deuxième sous-groupe est un groupe *sham* qui est placé dans le dispositif d'irradiation mais qui ne reçoit aucune dose d'irradiation. L'équipe a alors pu démontrer que le pré-conditionnement du muscle squelettique (ici le quadriceps) par la pratique d'une AP avant un protocole d'irradiation améliore la réponse des enzymes anti-oxydantes et mitochondriales. Ainsi, les activités de la superoxyde dismutase totale (tSOD) et de la superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD) ont respectivement augmenté de 41 et 51% chez les souris irradiées ayant suivi le protocole d'AP en comparaison des souris irradiées non entraînées (**Figure 67**) (De Lisio et al., 2010).

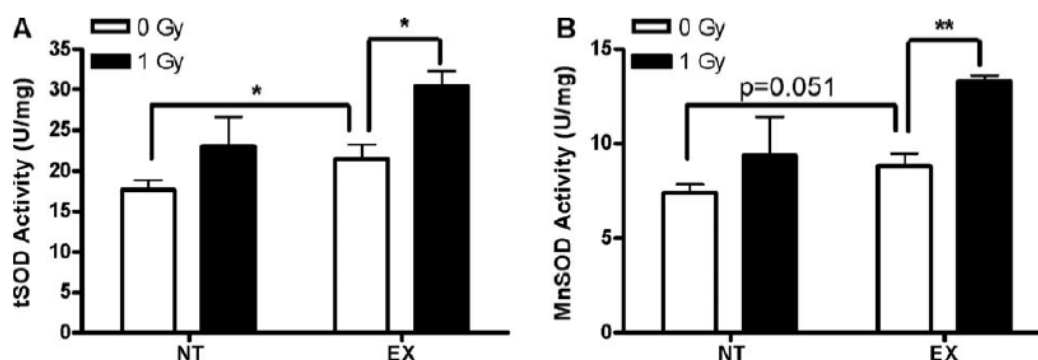


Figure 67 : Evaluation des effets de l'activité physique sur l'irradiation du muscle squelettique (quadriceps) chez la souris. Quantifications des activités des enzymes anti-oxydantes : (A) superoxyde dismutase totale (tSOD) et (B) superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD). Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM, avec $n = 12-13$ respectivement chez les souris contrôles (NT, non trained) ou les souris soumises à un exercice physique (EX), que ce soit dans la condition non-irradiée (0 Gy) ou la condition irradiée (1 Gy). $n = 3$ souris dans les groupes NT et EX irradiés ou non. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (De Lisio et al., 2010).

En outre, il a également été démontré que l'AP peut réduire les déficits cognitifs induits par la chimiothérapie. En effet, Winocur et ses collaborateurs (2014) ont apporté des résultats suggérant l'avantage de la pratique d'une AP à la fois dans la prévention et/ou le traitement des troubles cognitifs associés à la chimiothérapie. Ces effets seraient médiés, au moins en partie, par l'inhibition de la suppression de la neurogenèse hippocampique induite par la médication (Winocur et al., 2014). En 2016, Moore et collaborateurs publient une importante étude clinique basée sur 12 cohortes provenant des Etats Unis et d'Europe relative à la pratique d'une AP comme moyen de prévention en oncologie. L'étude conclue que l'AP de loisir est associée à de plus faibles risques de développer 24 des 26 cancers étudiés, et ce, indépendamment de la masse corporelle ou des antécédents de tabagisme. Ceci nous permet d'oser généraliser les résultats sur les bienfaits de la pratique d'une AP de loisir régulière comme moyen efficace de prévention de nombreux cancers. Dans cette étude, les AP de loisir sont définies comme étant les activités pratiquées par un individu lui permettent d'améliorer ou de maintenir sa forme physique et sa santé. L'étude comprenait des activités de loisirs d'intensité modérée (3 équivalents métaboliques) ou forte (6 équivalents métaboliques ou plus). Ces niveaux d'intensité correspondent à ceux qui sont recommandés pour les américains dans les directives du gouvernement des USA (Moore et al., 2016).

En France, pour encourager chacun à être plus actif, le Ministère des Solidarités et de la Santé a fait des recommandations visant à ce que chaque personne intègre l'AP dans son quotidien. Et cela passe notamment par le choix de son moyen de transport pour de courtes distances. Ainsi le vélo, le roller ou la marche à pied, ou tout autre mode déplacement faisant

appel à la seule énergie humaine, est encouragé en regard des transports motorisés. En effet, ils constituent une alternative bénéfique à la fois pour la santé et l'environnement.

IV-3.2.3 Rééducation

L'AP a longtemps été étudiée et utilisée comme moyen de rééducation après une perte fonctionnelle aussi bien chez l'Homme que l'animal dans le cadre d'une blessure, après une opération ou comme moyen de récupération fonctionnelle après un AVC. En décembre 2016, un décret précise qu'un médecin traitant peut prescrire une AP dispensée par un professionnel (Légifrance – Journal officiel). Ce décret, rentré en application le 1^{er} mars 2017, est une petite révolution dans le domaine car il va à l'encontre des recommandations historiques de repos pour le patient.

Pour arriver à ce changement de cap dans la prise en charge des patients, de nombreuses études à la fois chez l'Homme et l'animal ont étudié les bienfaits de la pratique d'une AP régulière. Dans le cadre du parcours de soin des patients cancéreux, et en particulier les patients atteints d'une tumeur cérébrale ayant reçu une chimiothérapie et une radiothérapie concomitante, le but de l'AP est de leur permettre de récupérer sur le plan cognitif et contrer la fatigue ressentie.

Les premières études précliniques ont montré que l'AP a la capacité de favoriser la prolifération des NSCP ainsi qu'un environnement neuronal propice à la plasticité cérébrale post-irradiation. L'AP apparaît alors comme une thérapie potentielle de façon indépendante ou adjuvante pour contrer les déficits cognitifs radio-induits. Néanmoins, les auteurs affirment que des études supplémentaires seront nécessaires pour déterminer si les perturbations du microenvironnement induites par l'irradiation pourraient limiter les effets bénéfiques de l'AP (Rodgers et al., 2013). En 2008, Naylor et son équipe vont plus loin et démontrent chez la souris que la course exercée de façon volontaire permet de restaurer de manière significative le niveau des NSCP et la neurogenèse hippocampique après une dose d'irradiation de 6 Gy chez la souris jeune (**Figure 68**). Les auteurs de l'étude ont également constaté que l'irradiation cérébrale perturbait l'intégration des neurones immatures dans l'hippocampe mais que cela était contré par l'exercice physique. Les auteurs concluent alors sur l'utilité de l'exercice physique pour la récupération fonctionnelle et structurelle après une lésion radio-

induite du cerveau juvénile. Ils suggèrent que l'exercice devrait être intégré dans la thérapie de réadaptation des survivants d'un cancer infantile (Naylor et al., 2008).

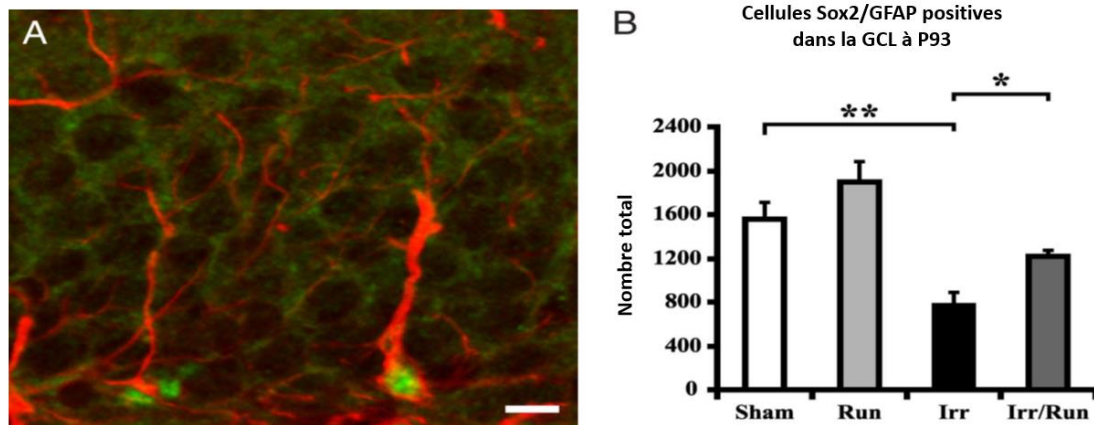


Figure 68 : La course volontaire améliore les altérations de la neurogenèse hippocampique induite par l'irradiation cérébrale (6 Gy). (A) Image obtenue par microscopie confocale : cellules GFAP+ (rouge) et cellules Sox-2+ (vert). dans le gyrus denté des souris irradiées non-coureur. Echelle : 10 μm. (B) Quantification du nombre de cellules SOX2+/GFAP+ dans la couche granulaire (GCL) du gyrus denté chez les souris non-irradiées et non-coureur (groupe Sham) ou coureur (groupe Run) et chez les souris irradiées et non-coureur (groupe Irr) ou coureur (groupe Irr/Run). La course volontaire entraîne une augmentation significative de nombre de cellules double positives (Sox2+/GFAP+) par rapport aux souris irradiées ne courant pas. Moyenne des groupes ± SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Naylor et al., 2008).

Puis en 2015, Wogensen et son équipe publient une revue sur les effets de l'AP sur la récupération cognitive après l'acquisition de différentes lésions cérébrales (lésion cérébrale traumatique, ischémie cérébrale ou irradiation cérébrale) dans des modèles animaux. Il est néanmoins précisé que dans les études basées sur un modèle animal, il faut différencier deux paradigmes d'AP : l'AP volontaire ou l'AP forcée (Wogensen et al., 2015). Cette dernière est la plus courante mais ne reflète pas ce qui se passe en clinique où la motivation du patient est la clef du suivi du programme. En plus de ce paradigme, les études prises en compte dans cette revue notifiaient si l'exercice était précoce ou tardif ainsi que les facteurs associés tels que l'intensité, la durée, etc. Les études présentées dans cette revue indiquent que l'AP, dans la plupart des cas, favorise la récupération cognitive après une lésion cérébrale. Cependant, les auteurs de cette revue insistent sur l'hétérogénéité des protocoles mis en place affirmant alors que les paramètres optimaux permettant de garantir une réhabilitation cognitive efficace nous échappent encore du fait de ces variations méthodologiques. Il faut donc prendre en compte les différents types d'AP mais également le moment auquel elle est initiée.

Par exemple, un exercice volontaire initié une semaine après l'atteinte cérébrale induit une récupération fonctionnelle et favorise la survie cellulaire. Les activités physiques initiées 14 jours ou plus après la lésion semblent avoir les effets les plus constants sur la récupération cognitive. Il faut, cependant, d'avantage de données sur les effets de l'AP débutée tardivement après une lésion cérébrale afin de déterminer si ce type d'intervention non-médicamenteuse pourrait, même si administrée trop tard, améliorer les déficits cognitifs. Parallèlement, les études utilisant une forme d'AP forcée ont montré que la pratique de ce type d'exercice d'intensité faible à modérée amorcé de façon particulièrement précoce pouvait conduire à une amélioration cognitive chez les animaux. Par contre, seules deux études ont mis en place un protocole d'AP forcée initiée plus d'une semaine après la lésion, ce qui constitue des connaissances limitées sur les effets de l'AP forcée initiée plus tardivement (Wogensen et al., 2015).

En 2014, Ji et collaborateurs développent chez le rat un modèle de réhabilitation cognitive après une irradiation du cerveau entier (20 Gy). Dans un premier temps, les rats sont soumis à un protocole d'AP forcée (roue d'exercice) de différentes intensités 2 fois par jour, à raison de 5 jours par semaine pendant 3 semaines. Cette étude démontre alors que la pratique d'une AP forcée modérée améliore significativement l'apprentissage et la mémoire chez les rats sains. Dans un deuxième temps, ce protocole d'exercice physique a été soumis à des rats irradiés à une dose de 20Gy. Les résultats montrent alors que la pratique d'une AP forcée après irradiation cérébrale permet de pallier les déficits cognitifs radio-induits. En effet, l'AP forcée augmente la neurogenèse et active la signalisation BDNF-pCREB qui est altérée dans l'hippocampe des rats irradiés. Ces changements moléculaires seraient liés aux effets neuroprotecteurs induits par l'AP (Ji et al., 2014). Ainsi, les résultats des études précliniques, principalement chez le rongeur, indiquent clairement que l'AP, qu'elle soit forcée ou volontaire, représente une méthode efficace pour contrer les troubles cognitifs liés au cancer et ses traitements aussi bien au niveau structurel que fonctionnel. Cela est particulièrement vrai pour les fonctions dépendantes de l'hippocampe (Wogensen et al., 2015; Wong-goodrich et al., 2010; Zimmer et al., 2016).

Cependant chez l'Homme, les troubles cognitifs associés au cancer et ses traitements ne se limitent pas aux fonctions dépendantes de l'hippocampe. Les cortex préfrontaux des humains et des rongeurs étant difficilement comparables, les résultats des études précliniques

doivent être soigneusement transposés chez l'Homme. Les premières études chez le patient atteint de tumeurs cérébrales montrent des effets positifs de l'activité physique. Néanmoins, le type, l'intensité et la durée de l'exercice varient fortement d'une étude à l'autre. Les études sur les effets de l'AP utilisent aussi bien des exercices d'aérobie, de résistance, d'équilibre ou encore des programmes d'exercices avec une influence asiatique comme le yoga (Danhauser et al., 2019). L'activité et l'exercice physique sont connus pour avoir des effets positifs sur les adaptations structurelles du SNC (Zimmer et al., 2016). En effet, plusieurs études non-contrôlées, notamment chez des patients atteints de gliomes et de méningiomes, ont démontré les bienfaits de l'adhésion à un programme d'AP sur la récupération fonctionnelle et la diminution des symptômes de dépression et d'insomnie, ce qui se traduit par un impact positif sur la qualité de vie ressentie par les patients (Coomans et al., 2019). Deux patientes diagnostiquées avec un GB multiforme et un oligodendrogliome ont participé à un programme d'exercice structuré et supervisé de 12 semaines. Ce programme consistait en deux séances d'exercice de résistance et d'aérobie d'1h/semaine et de séances d'aérobie autogérées supplémentaires. Les données sur la force, la forme cardiovasculaire et plusieurs indicateurs psychologiques (dépression, anxiété) ainsi que sur la qualité de vie ont été mesurées au départ, puis après 6 semaines et à la fin de l'intervention. Les résultats de cette étude préliminaire indiquent que l'AP était bien tolérée puisque les deux participantes ont terminé les 24 séances et la composante à domicile sans effets indésirables. De plus, il semble que cela a eu un impact positif sur la morbidité et les résultats psychologiques. En effet, les scores de l'échelle d'anxiété et de dépression ont montré des améliorations cliniquement significatives (Levin et al., 2016).

Dans l'ensemble, il est difficile de tirer des conclusions fermes du fait de l'absence de groupe témoin et de la petite taille des échantillons. Néanmoins, ces résultats fournissent des preuves préliminaires du fait que malgré les difficultés associées aux traitements du cancer du cerveau et à la survie limitée des patients, l'AP peut être sûre et bénéfique et devrait à ce titre être prise en compte dans la prise en charge globale des patients atteints d'un cancer du cerveau (Levin et al., 2016; van Lonkhuizen et al., 2019).

OBJECTIFS

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, les tumeurs cérébrales touchent toutes les tranches d'âge et font partie des tumeurs malignes les plus agressives. Elles peuvent également se présenter sous forme de tumeurs secondaires (métastases cérébrales) issues d'un cancer périphérique. Les traitements proposés font toujours appel à la radiothérapie, qu'elle soit ciblée ou sur cerveau entier. Cependant, de nombreuses études mettent en lumière les effets délétères des rayonnements ionisants sur le tissu cérébral sain avoisinant la tumeur. Ceci entraîne notamment des altérations cérébrales accompagnées d'une fatigue et de déficits cognitifs dont les patients survivants au cancer se plaignent. La prise en charge des patients cancéreux doit donc prendre en compte ces dommages tissulaires et cognitifs radio-induits et tâcher de les minimiser afin de limiter leur impact sur la qualité de vie.

Dans l'objectif de pouvoir diagnostiquer et/ou prédire les atteintes neuropathologiques induites par la RT, nous nous sommes tout d'abord attardés à caractériser de manière multiparamétrique et longitudinale la radiotoxicité cérébrale dans un modèle de rat à l'aide de méthodes complémentaires : (1) évaluation de l'état général et comportementale de l'animal, (2) différentes modalités d'imagerie IRM (IRM anatomique, IRM vasculaire et IRM de diffusion) et (3) étude du stress oxydatif réalisée au niveau cérébral et plasmatique (espèces réactives de l'oxygène - ROS, de l'azote -RNS, du carbone -RCS et du soufre -RSS). Cette première étude avait donc pour but le développement d'un modèle préclinique présentant des symptômes similaires à ceux observés en clinique (fatigue, troubles cognitifs) et la mise au point d'outils non-invasifs pour détecter les dommages cérébraux et identifier des biomarqueurs d'imagerie et sanguins.

Lors de la deuxième partie de ces travaux de thèse, nous avons souhaité utiliser le modèle animal de radiotoxicité cérébrale que nous avons développé et caractérisé pour évaluer la pratique de l'activité physique comme potentielle stratégie thérapeutique pour atténuer les lésions cérébrales et les déficits cognitifs induits par l'irradiation sur cerveau entier. Nous avons fait le choix d'une activité physique forcée sur tapis de course et régulière dont le protocole débutait dès trois jours après la fin de l'irradiation cérébrale et était maintenue pendant 6 mois.

MATÉRIELS et MÉTHODES

I - Animaux

Les recherches que nous avons menées sur les animaux ont été réalisées selon la directive européenne actuelle (2010/63/UE) dans un laboratoire agréé (B14118001) et avec l'autorisation du comité régional d'éthique (CENOMEXA, APAFIS # 19932). Ces travaux ont été réalisés avec des rats Wistar mâles âgés de 6 mois au moment de l'irradiation cérébrale et pesant approximativement 500g (fournisseur : JANVIER Lab). Les animaux étaient hébergés dans une animalerie conventionnelle avec des conditions contrôlées : une température comprise entre 22 et 24°C et un cycle jour/nuit de 12h-12h. Chaque cage hébergeait 2 rats appartenant au même groupe expérimental.

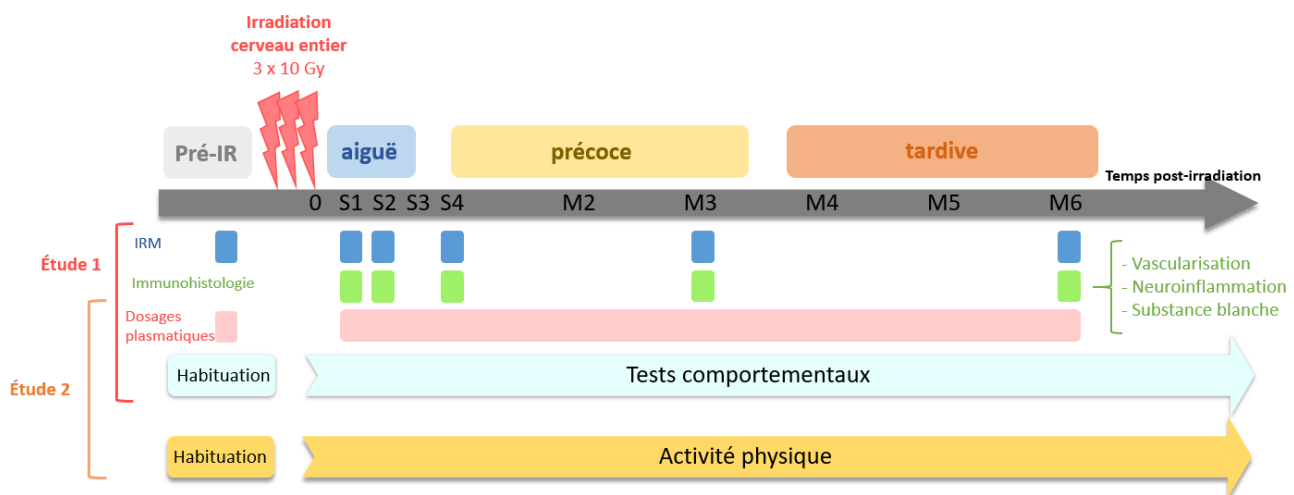


Figure 69 : Frise temporelle des différentes analyses effectuées au cours de cette thèse. Le modèle développé est défini comme longitudinal (étude sur plus de 6 mois) et multiparamétrique car il fait appel aussi bien à des techniques d'imagerie, d'analyses d'échantillons sanguins ou d'études comportementales (étude 1) afin de se rapprocher au mieux des troubles observés en clinique selon trois phases distinctes : aiguë, précoce et tardive. Une fois le modèle bien caractérisé, nous avons souhaité évaluer l'intérêt de l'activité physique comme outil thérapeutique. L'activité physique était réalisée 3 fois/semaine durant 6 mois à partir d'un programme établi sur tapis de course.

Lors de l'étude sur la caractérisation du modèle de radiotoxicité cérébrale chez le rat adulte, nommée **Etude 1** dans la (**Figure 69**), les rats ont été assignés de façon aléatoire au groupe contrôle (CTL) ou au groupe irradié (IR) et ont été soumis durant 6 mois de façon séquentielle à une batterie de tests comportementaux afin d'évaluer d'une part différentes modalités de mémoire (mémoire à court-terme, mémoire à long-terme, mémoire spatiale) et la fatigue après irradiation panencéphalique (30 Gy). En parallèle, des analyses longitudinales

par imagerie IRM (IRM anatomique, IRM vasculaire et IRM de diffusion), par immunohistologie ainsi que des analyses biochimiques sur le stress oxydatif à partir d'échantillons cérébraux et plasmatiques ont été réalisées. Toutes ces procédures expérimentales ont été effectuées au centre Cyceron CYCERON (Caen, France). Quelle que soit l'approche méthodologique utilisée, tous les paramètres ont été étudiés à plusieurs temps post-irradiation pour avoir une vision séquentielle et globale des différentes phases post-RT bien identifiées chez les patients : 1 semaine avant irradiation (phase « *baseline* »), 1 et 2 semaines après irradiation (phase aigüe), 1 à 3 mois post-irradiation (phase précoce) et 6 mois post-irradiation (phase tardive).

Après avoir développé et caractérisé notre modèle animal de neurotoxicité radique, nous avons cherché à déterminer si l'activité physique pouvait être une thérapie pertinente pour atténuer/contrer les dommages cérébraux et déficits cognitifs observés après irradiation cérébrale : il s'agit de l'**Etude 2** dont le protocole expérimental est présenté sur la (**Figure 69**). Ainsi, les rats ont été répartis en 4 groupes selon qu'ils soient irradiés ou non (30 Gy) et soumis à un protocole d'activité physique ou non (tapis de course, 3 séances/semaine) : groupe contrôle (CTL), groupe irradié (IR), groupe activité physique (CTL AP), groupe irradié + activité physique (IR AP). Comme pour la 1^{ère} étude, les rats ont été suivis jusqu'à 6 mois après irradiation pour évaluer leur fatigue et leurs capacités mnésiques. Une étude longitudinale en IRM a également été menée à 1, 3 et 6 mois post-irradiation cérébrale.

Face à la contrainte du nombre d'animaux nécessaire pour les Etudes 1 et 2, plusieurs cohortes de rats ont été réalisées pendant la thèse, puis les résultats obtenus pour chacune d'elles ont été moyennés pour chaque groupe d'animaux étudiés. Il peut être noté que les rats CTL et IR de l'Etude 2 ont également été incorporés dans les analyses de l'Etude 1 quand cela était possible. Il est aussi important de souligner que la complexité du protocole expérimentale nous a conduit à mener les études comportementales, d'IRM et immunohistologiques sur des rats distincts.

II - Procédure d'irradiation cérébrale

Avant de débiter l'irradiation, les rats sont anesthésiés à l'isoflurane 5% dans un mélange O₂/N₂O 30-70% et maintenus durant l'irradiation à 2% d'isoflurane. Les animaux ont été soumis à une irradiation du cerveau entier (WBRT) à une dose de 30 Gy répartie en 3 fractions de 10Gy sur trois jours consécutifs. Le protocole de WBRT utilisé cible tout le cerveau,

y compris les bulbes olfactifs mais épargne le cervelet. La dose d'irradiation a été choisie pour se rapprocher des doses utilisées en clinique, notamment pour les métastases cérébrales. De plus, cette dose est connue pour être non-létale, engendrer des lésions de la substance blanche mais sans induire de nécrose (Yang et al., 2017)

L'irradiation a été réalisée grâce à un irradiateur dédié aux petits animaux (X-RAD 225Cx, Precision X-ray) (**Figure 70 A**) en utilisant un collimateur cylindrique (diamètre : 25 mm), une filtration cuivre (épaisseur : 1 mm) et un monofaisceau de rayons X orienté du haut vers le bas du cerveau. Les autres paramètres caractérisant le protocole WBRT utilisés sont : voltage=225kV, intensité=13 mA, énergie=80 keV, débit de dose=3,3 Gy/min. Le protocole d'irradiation a été établi par un système de planification de traitement (TPS, logiciel SmART-Plan) dans le but d'assurer une précision spatiale de la dose déposée et une irradiation homogène dans l'ensemble du cerveau (**Figure 70 B**). A la fin de l'irradiation cérébrale, les animaux ont été surveillés quotidiennement jusqu'à la fin du protocole.

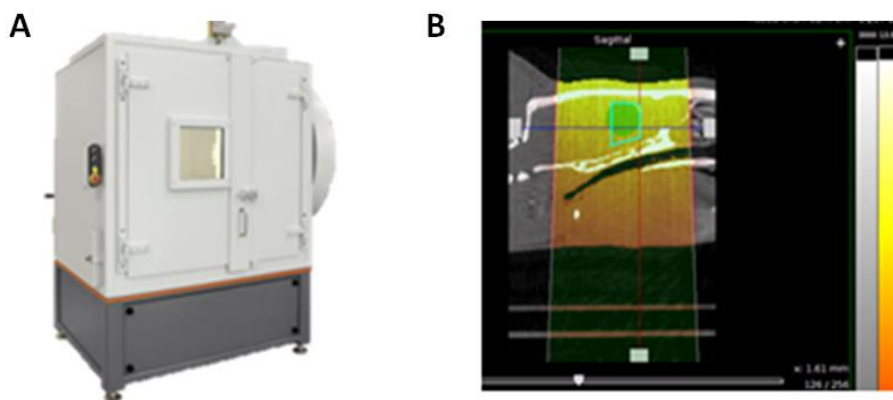


Figure 70 : Images des instruments utilisés pour réaliser l'irradiation cerveau entier chez les rats adultes. (A) Irradiateur préclinique X-RAD 225Cx (Precision X-ray). (B) Vue sagittale d'un cerveau de rat obtenue par scanner permettant de déterminer avec précision la zone d'irradiation (cerveau entier en épargnant le cervelet) ainsi que le dépôt de dose grâce à une planification du traitement (TPS) réalisée par le logiciel SmART-Plan.

III - Etudes comportementales

III – 1 Evaluation de l'état général des animaux

L'état général des animaux a été suivi tout au long du protocole en mesurant régulièrement le poids des animaux. Les rats sont ainsi pesés deux fois par semaine tout au long du protocole. En parallèle, nous avons établi un score d'état général basé sur le principe d'un score neurologique sur 30 points au total pour évaluer l'état des animaux au cours du

protocole pour l'ensemble des groupes (**Tableau 7**). Chaque critère étudié est scoré avec des points allant de 0 à 2 : 0 = absence, 1 = présence ou 2 = forte présence. Différents aspects physiques sont ainsi évalués comme la posture (dos vouté, tête baissée), les poils (saleté des poils, pellicules, poils ébouriffés), la tête (pelades, saignements), les yeux (porphyrine, yeux fermés), le nez (porphyrine, nez gonflé, autres sécrétions) ainsi que les pattes avant (porphyrine, pelades) et enfin l'isolement de l'animal. Ce dernier point étant plus délicat à évaluer dans la mesure où les animaux étaient hébergés uniquement par paire.

	Posture		Poils			Têtes		Yeux		Nez			Pattes avant			
individu	Dos vouté	Tête baissée	Sales	Pellicules	Ebouriffés	Pelades	Saignements	Porphyrine	Yeux fermés	Porphyrine	Nez gonflé	Sécrétions	Porphyrine	Pelades	Isolement	TOTAL
R21																
R22																
R23																

Tableau 7 : Tableau de suivi de l'état général des rats en cours de protocole. Score sur 30 basé sur le principe d'un score neurologique : 0 = absence, 1 = présence et 2 = forte présence du critère évalué.

III – 2 Evaluation de la fatigue

Dans le but de quantifier la fatigue des animaux, nous avons développé un test original au laboratoire, dénommé « le Fatest », qui a été associé à une étude de l'activité locomotrice spontanée des animaux par le test de l'*Open field*.

Evaluation de la fatigue : Fatest

Le Fatest a été développé pour étudier l'état de fatigue des animaux sans faire appel à un exercice physique intense. Dans ce test, les rats doivent escalader une planche en bois (longueur = 2 m et largeur = 25 cm), inclinée de 30° par rapport au sol, permettant à l'animal d'accéder à un coin sombre situé à une hauteur de 1 mètre du sol (**Figure 71**). La planche est divisée en 10 segments égaux : le segment le plus bas a un score de 1 et le coin situé en haut du dispositif a un score de 10.

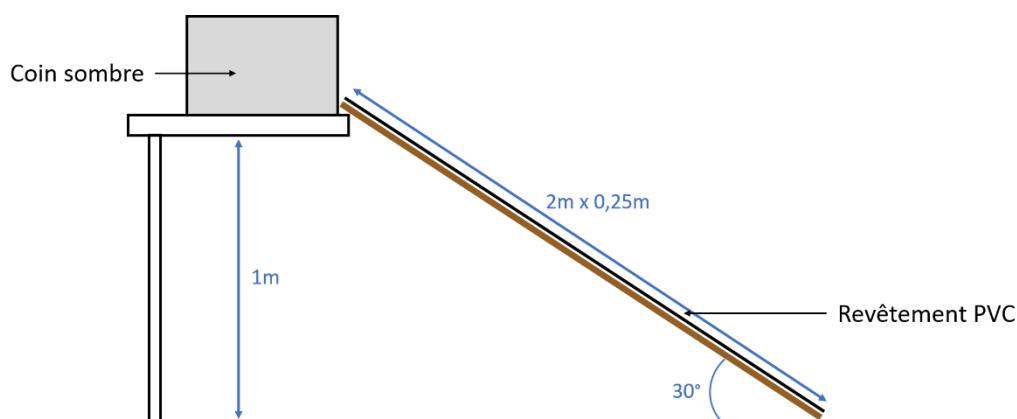


Figure 71 : Schéma du dispositif expérimental Fatest permettant d'évaluer l'état de fatigue des rats. Hauteur 1m, longueur 2m et 0,25m de large. La planche forme un angle à 30° et est munie d'un revêtement antidérapant. Les 10 paliers sont signalés par des bandes adhésives.

Plusieurs paramètres sont mesurés lors de ce test. Un score de fatigue est établi à partir du niveau où se trouve le rat sur la planche au bout de 5 secondes et le temps mis par l'animal pour atteindre le coin sombre situé sur la plateforme en haut de la planche inclinée est également mesuré. Le rat dispose de 30 secondes, maximum, pour atteindre le sommet.

Chaque rat réalise 3 essais par session. La phase d'habituation consiste à entraîner les animaux à escalader la pente en 10 secondes maximum. Cette phase se déroule pendant les deux semaines précédant l'irradiation cérébrale, à raison d'une session par jour. Les rats sont ensuite testés une fois la veille de l'irradiation puis 1 semaine, 2 semaines, 3 semaines, 4 semaines, 2 mois, 3 mois, 4 mois, 5 mois et 6 mois après traitement.

Evaluation de l'activité locomotrice spontanée : test de l'Open field

Le comportement spontané de l'animal a été évalué par le test de l'*Open field* qui permet d'étudier l'activité locomotrice des animaux ainsi que leurs capacités exploratoires et leur comportement de type anxieux. Lors de ce test, chaque rat est placé 10 minutes par session dans une enceinte ouverte, appelée *Open field*, avec les dimensions suivantes : 1m (longueur) x 1m (largeur) x 0,6m (hauteur) et disposant d'un plancher infra-rouge avec un système de *video tracking* (Viewpoint) (**Figure 72**). Il est ainsi possible de quantifier différents paramètres dont le temps passé en inactivité, la distance parcourue lors des grands déplacements ou de petits déplacements et la vitesse de déplacement des animaux (Ghafouri et al., 2016). Lors des études 1 et 2, les rats ont été testés une fois la veille de l'irradiation puis 1 semaine jusqu'à 6 mois après traitement.

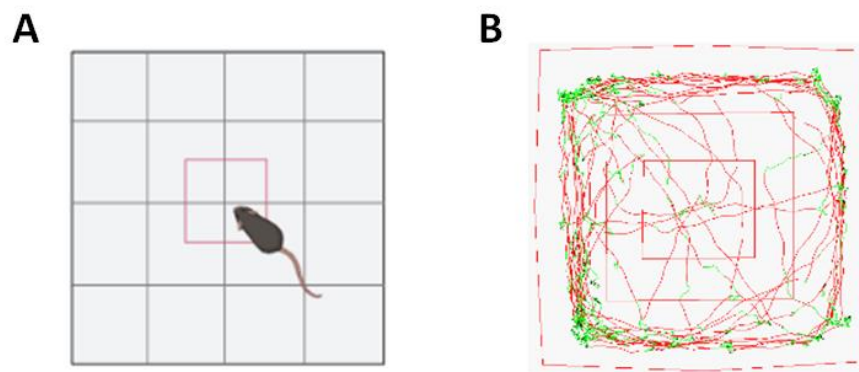


Figure 72 : Test de l'Open field. (A) Dispositif expérimental avec une enceinte ouverte de dimensions 1m x 1m x 0,6m. (B) Exemple de tracé obtenu par le système de video tracking représentant l'ensemble des déplacements effectués par l'animal mis dans l'enceinte pendant 10 minutes.

III – 3 Evaluation de la mémoire

Afin d'étudier les déficits cognitifs consécutifs à l'irradiation, nous avons fait le choix d'évaluer la mémoire à court-terme (mémoire de travail) avec une tâche de reconnaissance d'objets, la mémoire à long terme avec le test de l'évitement passif et la mémoire spatiale avec une tâche d'orientation dans un labyrinthe en Y.

Evaluation de la mémoire à court terme : test de reconnaissance d'objets

Une étude préliminaire a permis d'établir une liste de paires d'objets à présenter ensemble lors du test afin d'éviter un potentiel « effet objet ». La nature des objets est très variée (**Figure 73**). Ils sont soit en plastique soit en métal afin de faciliter leur nettoyage à l'alcool.

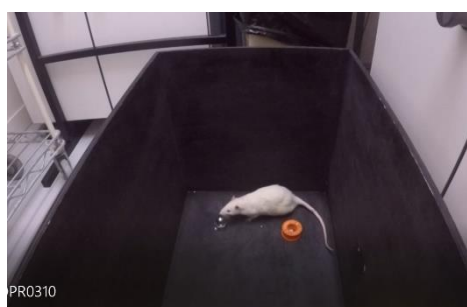


Figure 73 : Test de reconnaissance du nouvel objet permettant d'évaluer la mémoire à court terme des animaux, en particulier la mémoire de travail. Rat explorant un objet dans l'enceinte de test.

Le protocole du test de reconnaissance de nouvel objet est basé sur les travaux princeps d'Ennaceur et Delacour de 1988 (Ennaceur & Delacour, 1988). Les rats sont placés 2 min dans un *Open field* vide ayant les dimensions suivantes : 65cm (longueur) x 45cm (largeur)

x 46cm (hauteur) (**Figure 74**). Deux objets identiques sont alors déposés dans l'*Open field* pendant 5min pour la phase d'exploration. Après quoi, les rats sont replacés 2 min dans leur cage d'hébergement : c'est le temps de rétention. Les objets sont nettoyés et nous plaçons alors dans l'enceinte deux objets : un des objets présentés précédemment, considéré comme familier, et un nouvel objet que l'animal n'a jamais vu. Les rats sont alors testés durant 3 min dans l'*Open field* (**Figure 74**).



Figure 74 : Schéma du protocole expérimental du test de reconnaissance du nouvel objet pour évaluer la mémoire de travail (mémoire à court-terme) des rats. Après avoir exploré pendant 2 min l'*Open field* vide, deux objets identiques sont présentés au rat pendant 5min, puis l'animal retourne 2min dans sa cage d'hébergement (temps de rétention). Les objets sont ensuite nettoyés et un des objets précédemment montrés est représenté avec un nouvel objet pendant 3min. Le temps d'exploration de chacun des objets (objet familier et objet nouveau) est alors mesuré.

La phase de test est filmée en continue et le temps que passe l'animal à explorer chacun des deux objets est mesuré *a posteriori* à partir des vidéos. Un rat sain est naturellement curieux et devrait passer plus de temps à explorer le nouvel objet plutôt que l'objet familier. En revanche, un animal qui présente un léger déficit passera autant de temps à explorer les deux objets ou plus de temps sur l'objet familier. Les résultats sont présentés sous forme de 2 indices (Ennaceur & Delacour, 1988) :

- Indice de reconnaissance de l'objet nouveau = temps d'exploration de l'objet nouveau / temps d'exploration globale (objet nouveau + objet familier). Cet indice a donc des valeurs comprises entre 0 et 1.
- Indice de discrimination : temps d'exploration (nouvel objet – objet familier) / temps d'exploration globale (nouvel objet + objet familier) x100. Cet indice est exprimé en %.

Lors de nos études, le test de reconnaissance du nouvel objet a été répété sur les mêmes animaux à plusieurs temps d'étude (jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale) et de nouvelles paires d'objets ont été utilisées à chaque temps étudié.

Evaluation de la mémoire à long terme : test de l'évitement passif

Le dispositif se présente sous la forme de 2 compartiments séparés par une porte coulissante : un compartiment blanc éclairé directement avec le néon de la pièce (dimensions = 32 x 32 x 27 cm) et un deuxième compartiment plus petit et fermé donc plus sombre (dimensions = 18 x 12 x 12 cm). Un rat a un attrait naturel pour les espaces sombres et exigus dans lesquels il se sent moins exposé et donc plus en sécurité.

La session d'acquisition se déroule uniquement lors de la semaine précédant l'irradiation. Le rat est placé, de façon arbitraire, 30 secondes dans le compartiment éclairé pour qu'il explore son environnement. Après ce délai, la porte séparant les deux compartiments s'ouvre et le rat a alors accès au deuxième compartiment. Si l'animal pénètre dans le petit compartiment sombre, la porte se referme et l'animal reçoit, via le plancher, un choc électrique de 0,6 mA durant 1 seconde (**Figure 75**). Pour toutes les autres sessions, il n'y a plus aucun choc électrique. Il s'agit alors de mesurer le temps de latence de chaque rat avant d'entrer dans le compartiment sombre (le rat dispose de 180sec maximum par session) afin d'évaluer la mémoire à long-terme.

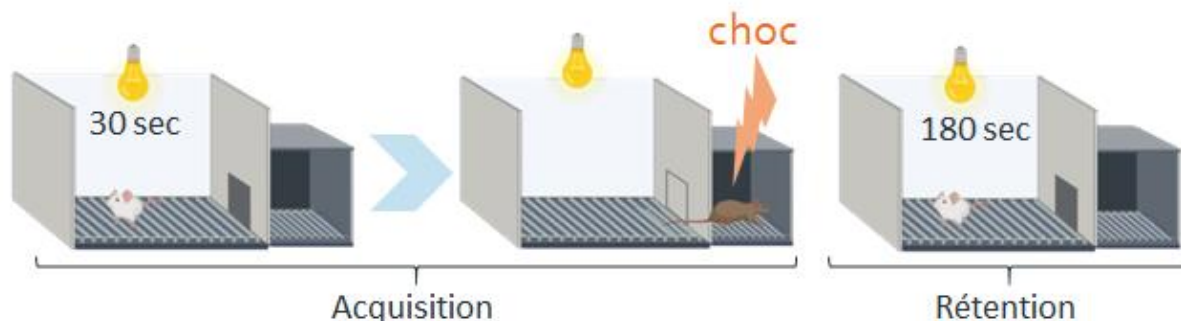


Figure 75 : Schéma du protocole utilisé pour le test de l'évitement passif. Lors de la session d'acquisition (1^{ère} session), le rat est placé 30s dans le compartiment éclairé sans accès au compartiment sombre. Après quoi, la porte du deuxième compartiment (plus petit et sombre) s'ouvre. Lorsque l'animal pénètre dans ce plus petit compartiment, la porte se referme et l'animal reçoit un choc électrique de 0,6 mA pendant 1s par le plancher. Lors de la phase de rétention (toutes les autres sessions), le rat est de nouveau placé dans le compartiment éclairé et le temps de latence mis pour changer de compartiment est mesuré (180s maximum). Le choc n'est pas réitéré.

Evaluation de la composante spatiale de la mémoire à court terme : test du labyrinthe en Y

Le labyrinthe en Y est une tâche de mémoire spatiale hippocampe-dépendante qui demande aux rats d'utiliser des indices externes pour s'orienter dans le labyrinthe composé de 3 bras identiques (Ghafouri et al., 2016). Le protocole utilisé ici est librement inspiré de différents travaux de la littérature. Le dispositif est constitué d'un labyrinthe en bois peint en

noir avec trois bras disposés en Y avec des angles de 120°. Chaque bras du Y présente les dimensions suivantes : 50cm de long, 32cm de hauteur et 16 cm de largeur. Comme décrit initialement par Dellu et son équipe, ce test se déroule en deux phases. Au début du test, le rat est placé au bout du « bras de départ » et peut se déplacer librement durant 10min dans ce bras de départ ainsi que dans un deuxième bras. Le troisième bras étant pour le moment inaccessible. A la fin de ce premier essai, l'animal est replacé 3 min dans sa cage d'hébergement et le dispositif est nettoyé avec de l'alcool. Après cet intervalle de temps, le rat est redéposé dans le même bras de départ et peut à présent explorer l'ensemble des trois bras durant 3 min. Le bras qui était préalablement inaccessible est considéré comme le « bras nouveau », tandis que le 2^e bras, autre que le bras de départ, est le « bras ancien ». Les déplacements au sein du labyrinthe sont alors filmés et les vidéos analysées *a posteriori*. Les variables mesurées lors de ce 2^e essai sont : le pourcentage de temps passé au niveau distal de chaque bras ainsi que le nombre d'entrée dans chaque bras (les quatre pattes de l'animal devant être à l'intérieur de la zone pour que l'entrée soit considérée comme valide) (Conrad et al., 1996; Dellu et al., 1992; Ghafouri et al., 2016). Les bras nouveau, ancien et de départ sont randomisés entre chaque rat et d'une séance à l'autre afin de minimiser un éventuel biais (Conrad et al., 1996).

Lors de nos études, le test de reconnaissance du nouvel objet, le test de l'évitement passif et celui du labyrinthe en Y ont été répétés sur les mêmes animaux à plusieurs temps d'étude : avant irradiation puis 1 semaine, 2 semaines, 3 semaines, 4 semaines, 1 mois, 2 mois, 3 mois, 4 mois, 5 mois jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale.

III – 4 Evaluation des comportements de type anxieux et dépressif

En plus des effets de l'irradiation sur la mémoire, nous avons étudié son impact sur le comportement de type anxieux chez le rat en utilisant le test de l'*Open field*. Quant au comportement de type dépression, celui-ci a été étudié par le *Splash test*. Ces évaluations comportementales ont été répétées sur les mêmes animaux plusieurs fois lors des études expérimentales (avant irradiation puis 1 semaine, 2 semaines, 3 semaines, 4 semaines, 1 mois, 2 mois, 3 mois, 4 mois, 5 mois jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale).

Evaluation de l'anxiété : test de l'Open field

Le niveau d'anxiété des animaux au cours du protocole a été évalué en utilisant l'analyse de leurs déplacements dans l'*Open field* lors de l'étude de l'activité locomotrice (session de 10min/rat). En effet, le temps passé au centre du dispositif est susceptible d'être un indice de l'anxiété de l'animal puisqu'un rat anxieux traversera difficilement toute l'enceinte en passant par les diagonales du dispositif et passera ainsi moins de temps au centre du dispositif qu'un rat non anxieux (Ghafouri et al., 2016; Hsiao et al., 2012).

Evaluation de la dépression : Splash test

En parallèle, nous avons réalisé le *Splash test* afin d'évaluer l'anhédonie des animaux. Ce test consiste à asperger le bas du dos d'un rat avec une solution de sucrose à 10% et à mesurer ensuite le temps que l'animal passe à se toiletter. La session dure 5min par rat et se déroule dans la cage d'hébergement de l'animal pour limiter le stress lié à l'environnement.

IV - Activité physique

Dans de notre étude, nous avons fait le choix d'étudier l'intérêt d'une AP d'endurance réalisée sur un tapis de course. En effet, dans les modèles animaux, l'AP est souvent différenciée en deux catégories : AP volontaire ou AP forcée. Avec des paradigmes d'AP volontaire, les animaux ont le choix entre le mouvement et l'inactivité ce qui sous-entend qu'ils ont un accès libre au dispositif d'exercice physique (roue d'activité dans la cage d'hébergement). En revanche, dans le cas d'une AP forcée, le temps et les niveaux d'activité sont mieux contrôlables par l'expérimentateur (Wogensen et al., 2015). Le dispositif de tapis de course qui a été utilisé dans notre étude est adapté au modèle rat (Bioseb) et le système est piloté grâce au logiciel SeDaCom (**Figure 76**).



Figure 76 : Tapis de course pour rongeur en configuration rat. 4 couloirs distincts en plexiglas permettent à 4 individus de courir en parallèle.

Une phase d'habituation de 10 jours au total est indispensable avant d'entreprendre tout protocole d'AP afin d'habituer les animaux au dispositif. Un seul paramètre est modifié à la fois et suit le schéma présenté dans le **Tableau 8**.

Jours	Vitesse (cm/s)	Durée	Choc
1	6	10	0.2 mA
2	10	10	0.2mA
3-5	10	15	0.1mA
6-7	10	30	0.1mA
8-10	12	30	0.1mA

Tableau 8 : *Tableau descriptif de la phase d'habituation des rats au tapis roulant. Un seul paramètre est modifié à chaque session.*

A noter que tous les rats des différents groupes (CTL, IR, CTL AP et IR AP) ont suivi cette phase d'habitation pour ne pas biaiser les résultats avec un éventuel effet préconditionnant de l'AP. Le comportement de chacun des rats sur le tapis de course est scrupuleusement noté et permettra de repérer les « bons coureurs » et les individus à écarter absolument du protocole d'AP (ces individus pouvant être inclus dans les groupes CTL ou IR ne réalisant pas d'AP après l'irradiation cérébrale). Le dispositif présente une grille traversée par un courant au bout de chacun des couloirs de course. Lors de la phase d'habituation les rats ont été incités à courir en recevant de légers chocs lorsqu'ils atteignaient cette zone (**Tableau 8**). Néanmoins, une fois le concept du tapis roulant bien intégré, il n'a plus été nécessaire d'induire de chocs électriques aux animaux au cours du protocole AP.

Le protocole d'AP que nous avons mis en place est basé sur les travaux de Ghodrati-Jaldakhan qui miment une activité de haute intensité (Ghodrati-Jaldbakhan et al., 2017). Le protocole d'AP réalisé après irradiation cerveau entier est le suivant : 5min à une vitesse de 13cm/s (marche lente) suivi de 5 min à 18cm/s (marche rapide) et enfin 20 min à 36cm/s (course). Les rats des groupes CTL AP et IR AP débutent l'AP dès le 3^e jours post-irradiation, à raison d'une session de 30 minutes 3 fois par semaine (lundi, mercredi et vendredi matin), et ce, jusqu'à la fin du protocole (6 mois après irradiation).

V - Etudes par imagerie par résonance magnétique (IRM)

Des examens d'IRM cérébrale ont été réalisés avant irradiation puis à 1 semaine, 2 semaines, 1 mois, 3 mois et 6 mois après irradiation cérébrale grâce à un aimant 7T (Bruker, Ettlinger, Allemagne). Les signaux émis sont alors réceptionnés par une antenne de surface de 4 canaux dédiée au rat et positionnée au-dessus de la tête de l'animal. Les acquisitions et les reconstructions d'images ont été réalisées grâce au logiciel Paravision 6.0 et sont ensuite analysées avec différents logiciels (ImageJ, BrainSuite et ANTs), classiquement utilisés en post-traitement des images IRM obtenues chez l'Homme mais aussi en recherche préclinique.

Pour réaliser les examens IRM, une anesthésie gazeuse est pratiquée sur les rats avec de l'isoflurane 5% (apporté dans un mélange à 70% - 30% de N₂O/O₂) et maintenue à 2% d'isoflurane durant l'acquisition. La température corporelle est maintenue à 37° ± 1,5°C par un passage d'eau chaude sous le berceau tandis qu'un ballonnet est placé sous l'abdomen de l'animal pour assurer le suivi en temps réel de la respiration. Chaque animal est soumis à plusieurs séquences IRM, détaillées ci-dessous, ce qui représente un temps d'acquisition total de 1h par rat.

V- 1 IRM anatomique

Avant de lancer les acquisitions IRM d'intérêt, une séquence « Quadripilot » a été réalisée afin d'obtenir les repères anatomiques nécessaires au positionnement du Field Of View (FOV) correspondant au champ de vue où seront positionnées les coupes d'intérêt, c'est-à-dire dans notre étude sur l'ensemble du cerveau.

Acquisition T2 pondérée (T2w)

L'image anatomique du cerveau est acquise grâce à une imagerie T2 pondérée (T2w) avec une séquence Turbo-RARE (*Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*) dont les paramètres sont les suivants : TR/TE = 5000/30 ms, facteur RARE = 4, 64 coupes de 0,5 mm, moyenne = 1, répétitions = 4, matrice = 256x256 pixels et résolution spatiale = 0,125 x 0,125mm.

Analyses des images T2 pondérées

Les images obtenues par IRM anatomique (imagerie T2w) ont été traitées tout d'abord par le logiciel Brain Suite pour réaliser des masques du cerveau sur chaque coupe pour ensuite

extraire la surface des masques et ainsi déterminer le volume cérébral global. Ensuite, une analyse de type DBM (*deformation based-morphometry*) a été entreprise pour mettre en évidence d'éventuelles différences morphologiques après irradiation sur cerveau entier via l'analyse des déplacements de chaque voxel en 3D. Le choix de l'approche par DBM et non de la VBM, plus couramment utilisée dans les études précliniques, s'explique par le fait que les images obtenues avec les antennes de surface utilisées au laboratoire induisent un gradient de signal sur les images rendant impossible la segmentation de la SB, SG et des ventricules nécessaire à l'étape de normalisation dans l'approche VBM (Han et al., 2013; Hiraoka et al., 2016; Riyahi et al., 2018)

Avant de débiter cette analyse, une correction d'inhomogénéité du signal (visible sous forme d'un gradient de signal du haut vers le bas du cerveau du fait de l'utilisation d'une antenne de surface) a été appliquée avec le logiciel ANTs. Ensuite, toutes les images T2w de chaque rat sont soumises à un recalage rigide (mouvements de translation et rotation) puis un recalage de type élastique (mouvements de déformation dans l'ensemble de l'espace) sur un cerveau standardisé, nommé *Template*. Lors de ces recalages, il est possible d'extraire grâce à un script proposé dans le logiciel ANTs les déformations locales de chaque voxel sous forme d'un tenseur de déformation. Celui-ci peut être quantifié sous forme d'un déterminant jacobien (Jd) qui traduit le comportement général du champ de déformation pour chaque voxel. Si $\log Jd < 0$ (voxels noirs) cela représente une dilatation lors de l'analyse, ce qui sous-tend que le voxel étudié était atrophié (voxel de plus petit volume que celui du *Template*) avant de réaliser les recalages. En revanche, si $\log Jd > 0$ (voxels blancs) cela correspond à une contraction, ce qui signifie que le voxel étudié était hypertrophié (voxel de plus grand volume que celui du *Template*) avant de réaliser les recalages (**Figure 77**).

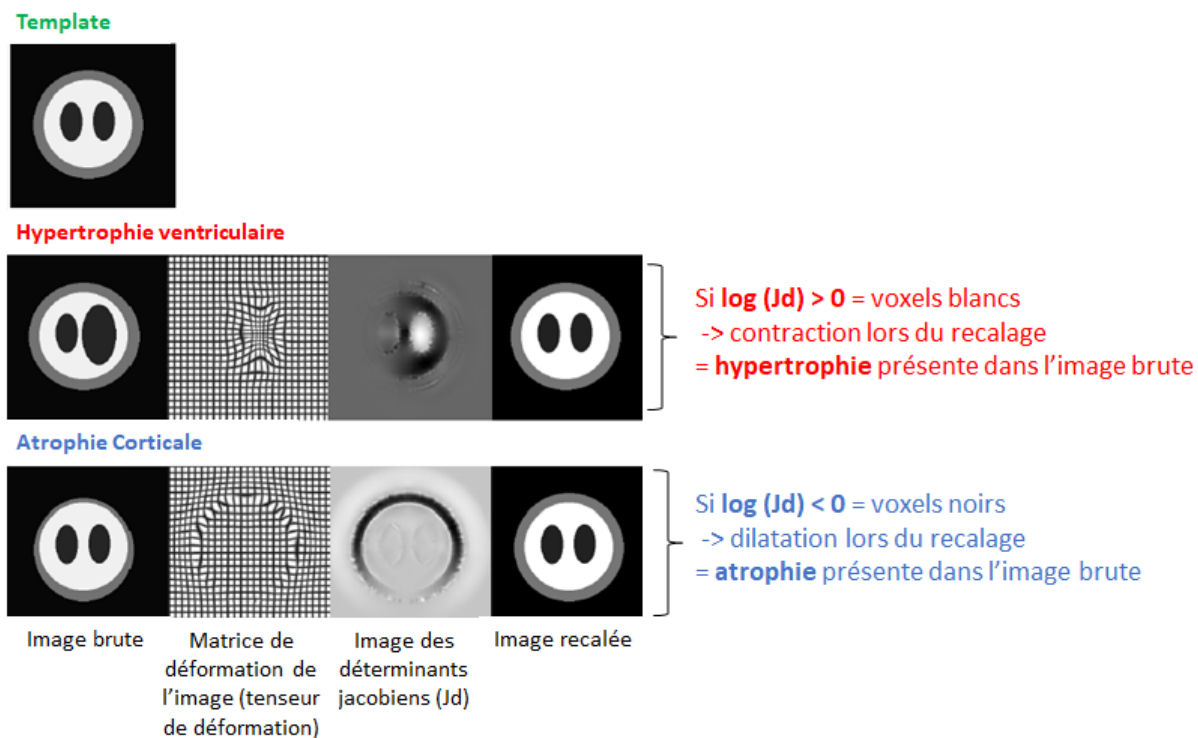


Figure 77 : Représentation schématique simplifiée de l'approche DBM (deformation based-morphometry) et son interprétation.

A l'issue de l'analyse DBM, il est alors possible de visualiser l'ensemble des parties du cerveau les plus significativement déformées. Ensuite, des analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel SPM. Les cartes de t obtenues sur l'ensemble du cerveau permettent alors d'identifier les voxels significatifs. Pour finir, il est possible en recalant les cartes de t sur un *Template* labellisé, sur lequel de nombreuses structures cérébrales ont été délimitées, d'identifier les régions cérébrales les plus impactées par l'irradiation. Les différentes étapes de l'analyse DBM sont synthétisées sur la (**Figure 78**).

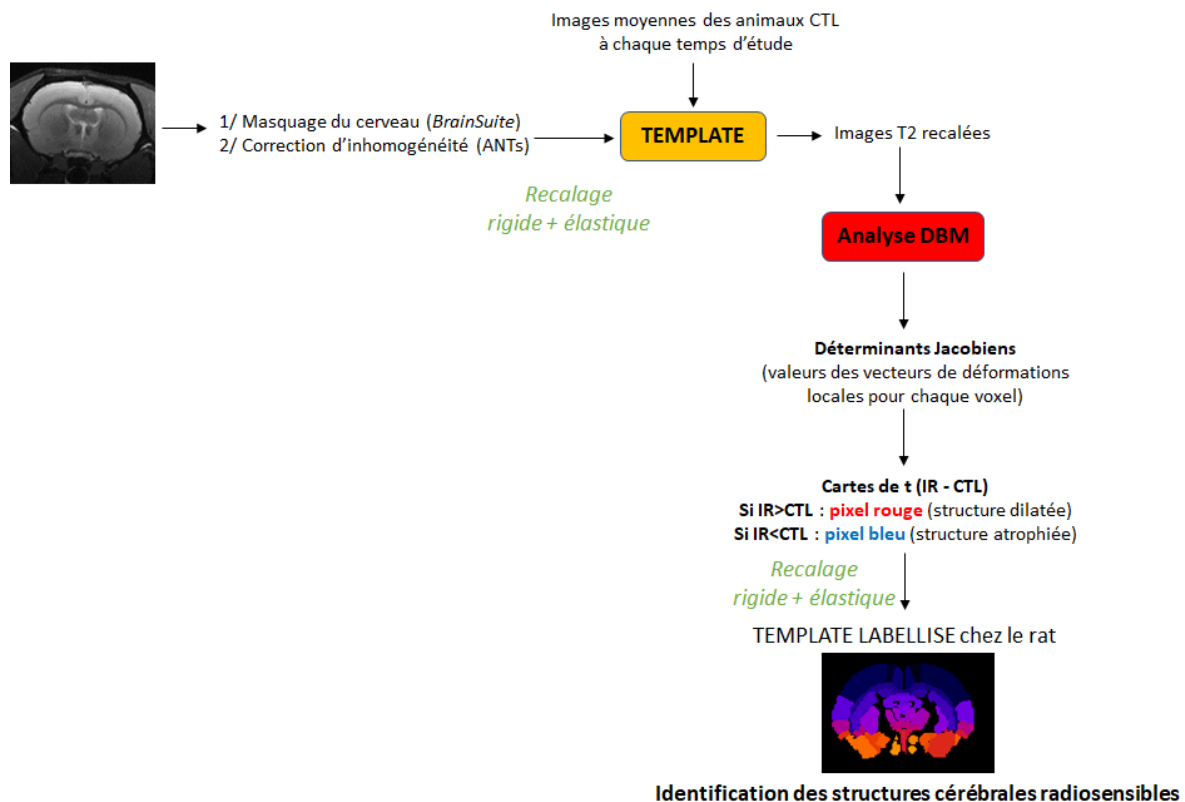


Figure 78 : Schéma des différentes étapes de l'analyse DBM (deformation based-morphometry) des images T2w. L'analyse DBM permet d'étudier les modifications structurelles locales chez les animaux irradiés par comparaison avec les animaux contrôles.

V- 2 IRM de diffusion

Pour étudier la microstructure cérébrale, tant au niveau de la substance grise que la substance blanche, des IRM de diffusion ont été réalisées grâce à une imagerie DTI qui permet de quantifier la vitesse des molécules d'eau dans un tissu ainsi que d'évaluer le caractère isotrope/anisotrope d'un tissu.

La mobilité spatiale des molécules d'eau est décrite grâce à un outil mathématique : le tenseur qui se représente sous forme d'une matrice 3x3 représentant les caractéristiques 3D de la diffusion. La résolution du calcul du tenseur permet alors de déterminer trois valeurs appelées « eigenvalues » λ_1 , λ_2 , λ_3 caractérisant la diffusion dans les trois directions orthogonales (X, Y, Z) (Le Bihan & Lima, 2015). A partir des valeurs numériques de λ_1 , λ_2 , λ_3 , il est possible de quantifier les paramètres de diffusion suivants : FA (*fractional anisotropy*), MD (*mean diffusivity*), RD (*radial diffusivity*) et AD (*axial diffusivity*) (pour plus de détails, voir les pages 116-118 de l'introduction).

Acquisition DTI

Les images d'IRM de diffusion sont acquises à partir d'une séquence SE-EPI reposant sur les paramètres suivants : TR/TE = 2192/37 ms, 32 coupes de 1mm d'épaisseur, moyenne = 1, répétitions = 3, résolution spatiale = 0,167 x 0,167 mm, 30 directions de diffusion et 2 valeurs de b (0 et 1000 s/mm²).

A l'issue de l'acquisition DTI, les images de diffusion ont été traitées par le logiciel Paravision 6.0 pour reconstruire des cartes paramétriques sur l'ensemble du cerveau des paramètres de diffusion suivants : FA, MD et les « eigenvalues » λ_1 , λ_2 et λ_3 . Puis, avec le logiciel Image J, les cartes paramétriques AD et RD sont générées selon les formules suivantes : $AD = \lambda_1$ et $RD = \left(\frac{\lambda_2 + \lambda_3}{2}\right)$.

Analyses des images obtenues en DTI : cartes paramétriques FA, MD, AD et RD

Les images de diffusion A0 (absence de gradients de diffusion, b= 0 s/mm²) ont été recalées sur un *Template* réalisé au laboratoire à partir d'images T2w de très haute résolution chez des rats Wistar âgés de 6 mois (âge identique aux rats des études réalisées pendant la thèse). Les recalages réalisés avec le logiciel ANTs consistent en des transformations rigides et élastiques. Ensuite, les matrices de recalage pour chaque rat ont été appliquées aux cartes paramétriques FA, MD, AD et RD.

A partir des cartes paramétriques recalées, des analyses ont ensuite été réalisées par une approche globale non-supervisée sur l'ensemble du cerveau avec le logiciel ANTs qui permet d'extraire les voxels significativement différents entre les groupes CTL et IR (cartes de t obtenues avec le logiciel SPM). En parallèle, les images recalées ont été analysées par une approche plus ciblée sur des régions d'intérêt (ROI, *region of interest*). Les régions choisies sont des structures de SG telles que le cortex, l'hippocampe, le thalamus, ainsi qu'une région de SB qu'est le corps calleux et une région mixte (région de SG traversée par des faisceaux de SB) qu'est le striatum. La délimitation de ces ROI a été réalisée manuellement sur le *Template* Rat Wistar du laboratoire. Avec cette approche par ROI, il a été possible d'extraire les valeurs numériques moyennes des paramètres FA, MD, AD et RD dans chaque structure cérébrale étudiée. Les différentes étapes de l'analyse globale et de l'analyse par ROI sont synthétisées sur la (**Figure 79**).

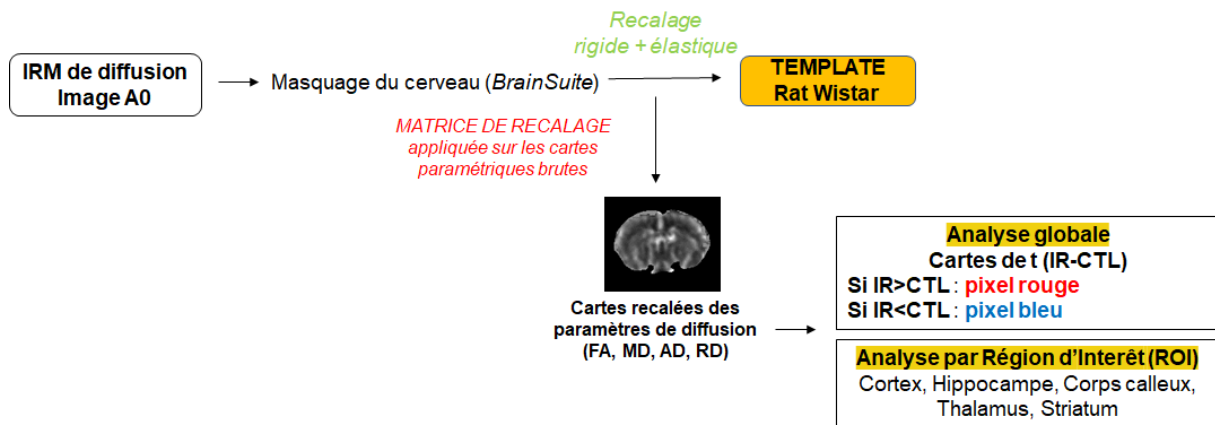


Figure 79 : Schéma simplifié des différentes étapes de l'analyse des images DTI et des cartes paramétriques FA (fractional anisotropy), MD (mean diffusivity), AD (axial diffusivity), RD (radial diffusivity). Tous ces paramètres de diffusion ont été étudiés puis comparés dans les différents groupes d'animaux par une approche globale non-supervisée sur l'ensemble du cerveau ou par une approche par régions d'intérêt (ROI) que sont le cortex, l'hippocampe, le thalamus, le striatum et le corps calleux.

V- 3 IRM vasculaire

L'imagerie vasculaire a été réalisée avec une séquence T2* acquise avant et après injection de P904 (Chematech). Le P904 est un agent de contraste à base d'oxydes de fer appartenant à la famille des USPIO (*UltraSmall SuperParamagnetic Iron Oxide*). Les USPIO ont une forte susceptibilité magnétique et une importante rémanence vasculaire ce qui leur confère la capacité à rester dans les vaisseaux sanguins et à ne pas fuir dans le parenchyme cérébral du fait de leur grande taille. L'injection de ce type de composé fait chuter le signal T2* mais de par l'importante rémanence vasculaire, il se forme un état d'équilibre quelques minutes après injection. C'est pourquoi, les USPIO (ici le P904) sont utilisés pour calculer le volume sanguin cérébral (VSC) à l'équilibre (Tropès et al., 2001).

Acquisition T2* avant et après injection d'agent de contraste (P904)

La séquence T2* utilisée dans ce protocole a été définie avec les paramètres suivants : TE/TR = 13/20000 ms, 32 coupes de 1 mm, moyenne = 1, répétitions = 6, matrice = 110x55 pixels, résolution spatiale = 0,290 x 0,290 mm. Pour pouvoir calculer le VSC, des acquisitions T2* ont été faites avant l'injection de 200µmol/kg de P904 dans la veine caudale du rat. Une seconde acquisition T2* est réalisée 4 minutes après injection. Les cartes de VSC sont ensuite générées à partir d'une macro développée au sein de l'équipe CERVOxy sous le logiciel ImageJ.

Le VSC est déterminé à l'équilibre selon la méthode de *Steady-State* (SS- $\Delta R2^*$), il est calculé selon la formule suivante :

$$VSC (\%) = \frac{3}{4\pi} \left(\frac{\Delta R2^*}{\gamma \cdot \Delta\chi \cdot B_0} \right)$$

Avec VSC : volume sanguin cérébral (%)

$\Delta R2^*$: différence de vitesse de relaxation induite sur le signal T2* par l'injection de l'agent de contraste

γ : rapport gyromagnétique du proton (rad.s⁻¹.T⁻¹)

$\Delta\chi$: effet de susceptibilité induit par la présence de l'agent de contraste dans le compartiment vasculaire

B_0 : champ magnétique de l'IRM exprimé en Tesla

Analyses des images obtenues en IRM vasculaire : carte paramétrique VSC

Pour analyser les images obtenues en IRM vasculaire et notamment les cartes de VSC, les mêmes approches méthodologiques que celles décrites pour les images d'IRM de diffusion ont été utilisées. Brièvement, les images T2 acquises à la même résolution que les images T2* pré- et post- injection de P904 (meilleure contraste T2 que T2*) ont été recalées (transformations rigides et élastiques) sur le *Template* Rat Wistar du laboratoire avec le logiciel ANTs, puis les matrices de recalage pour chaque rat ont été appliquées aux cartes de VSC.

A partir des cartes paramétriques recalées, des analyses ont ensuite été réalisées par une approche globale non-supervisée sur l'ensemble du cerveau avec le logiciel ANTs ainsi qu'avec une approche supervisée à partir de la délimitation des ROI correspondant aux structures cérébrales suivantes : cortex, hippocampe, thalamus, corps calleux et striatum. Les différentes étapes de l'analyse globale et de l'analyse par ROI sont synthétisées sur la (**Figure 80**).

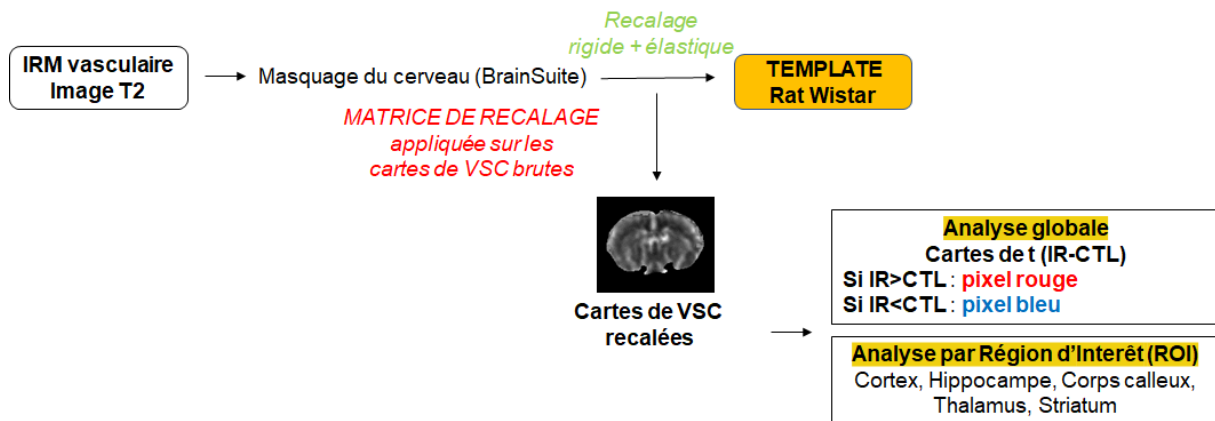


Figure 80 : Schéma simplifié des différentes étapes de l'analyse des images obtenues en IRM vasculaire et des cartes de volume sanguin cérébral (VSC). Les valeurs de VSC ont été quantifiées puis comparées entre les différents groupes d'animaux par une approche globale non-supervisée sur l'ensemble du cerveau ou par une approche par régions d'intérêt (ROI) que sont le cortex, l'hippocampe, le thalamus, le striatum et le corps calleux.

VI - Etudes immunohistologiques

Pour mieux appréhender les mécanismes sous-jacents aux dommages cérébraux induits par l'irradiation cérébrale et aider à l'interprétation ou conforter les résultats obtenus en IRM, des analyses immunohistologiques ont été faites sur des cerveaux de rats prélevés aux différents temps d'étude (1 semaine, 2 semaines, 1 mois, 3 mois et 6 mois après irradiation cérébrale). Les rats ont été mis à mort en réalisant une perfusion intracardiaque de sérum physiologique. Ensuite, les cerveaux des rats sont prélevés et congelés immédiatement dans de l'isopentane glacé avant d'être conservés à -80°C .

Immunomarquages par fluorescence

Les cerveaux congelés ont été coupés selon un plan coronal pour faire des analyses immunohistologiques. Des coupes sériées de $20\mu\text{m}$ ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica, Allemagne). Les coupes sont alors placées sur des lames et fixées dans un bain d'acétone froid (-20°C) pendant 10min. Les lames sont ensuite rincées 3 fois avec une solution de PBS (*phosphate buffered saline*) et placées 10min dans un bain de PBS - Tween 0,1% - Triton 0,5% pour perméabiliser les coupes. Puis, les coupes sont de nouveau rincées avec du PBS avant la phase de saturation qui consiste à immerger les lames dans un mélange de PBS - Tween 0,1% - Triton 0,5% - BSA 3% (*bovine serum albumin*) pendant 1h à température ambiante. La BSA est une protéine qui va permettre d'éviter le marquage non-spécifique engendrant un potentiel bruit de fond sur les images. Après saturation, les lames sont

incubées avec un anticorps primaire dilué dans une solution PBS - Tween 0,1% - Triton 0,5% - BSA 1% toute la nuit à 4°C. Les complexes antigène – anticorps primaire sont révélés en ajoutant un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, qui est spécifique de l'espèce animale dans laquelle l'anticorps primaire a été produit, pendant 1h à température ambiante. En parallèle, les noyaux cellulaires sont marqués avec du Hoechst 33342 (dilué au 1/1000^e ; Sigma-Aldrich). Le Hoechst est un agent intercalant de l'ADN émettant de la fluorescence à 360 nm.

Enfin, des lamelles sont montées sur les lames avec un milieu de montage soluble à l'eau et non-fluorescent (Aqua-Poly/Mount). Ce montage permet de préserver les coupes et leur observation au microscope à fluorescence.

Les études immunohistologiques réalisées ont ciblé la vascularisation (marquage collagène IV), la substance blanche (marquage MBP, *myelin basic protein*) et l'inflammation cérébrale avec le marquage des astrocytes (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*), ainsi que les cassures double brin de l'ADN (γ H₂AX). Les anticorps primaires utilisés sont répertoriés dans le **Tableau 9** présenté ci-dessous.

CIBLE	Anticorps	Hôte	Dilution	Fournisseur	Référence
Vaisseaux sanguins (lame basale des vaisseaux)	Collagène IV	Goat	1/100	Southern Biotech	134001
Substance blanche (myéline)	MBP	Rabbit	1/500	Abcam	Ab 40370
Astrocytes	GFAP	Rabbit	1/500	Dako	Z0334
Cassures double brin de l'ADN	γ H ₂ AX (phospho S139)	Mouse	1/200	Abcam	Ab 26350

Tableau 9 : Anticorps primaires utilisés dans les analyses immunohistologiques réalisées.

Analyse des immunomarquages

Les immunomarquages ont ensuite été observés au microscope à fluorescence en choisissant la longueur d'onde spécifique de l'anticorps secondaire choisi. Les coupes histologiques sont photographiées à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence (Leica DMI8) relié à un système d'acquisition des images (logiciel MetaMorph®). L'acquisition des images est réalisée avec l'objectif 10X. Pour chaque structure cérébrale d'intérêt, 2 photos adjacentes ont été prises par rat et cela pour chaque temps d'étude. Les structures à imager

étaient réparties sur 3 champs : le 1^{er} champ contient les bulbes olfactifs, le 2^{ème} champ englobe la zone sous-ventriculaire, le striatum, le corps calleux et le cortex frontal et enfin le 3^{ème} champ inclut l'hippocampe et le thalamus (**Figure 81**). Le choix de ces structures cérébrales a été conditionné par les examens IRM préalablement réalisés. Les analyses IRM présentant des variations significatives de certains paramètres dans ces régions cérébrales. Il s'agit donc de confirmer les résultats obtenus en imagerie mais également de les approfondir.

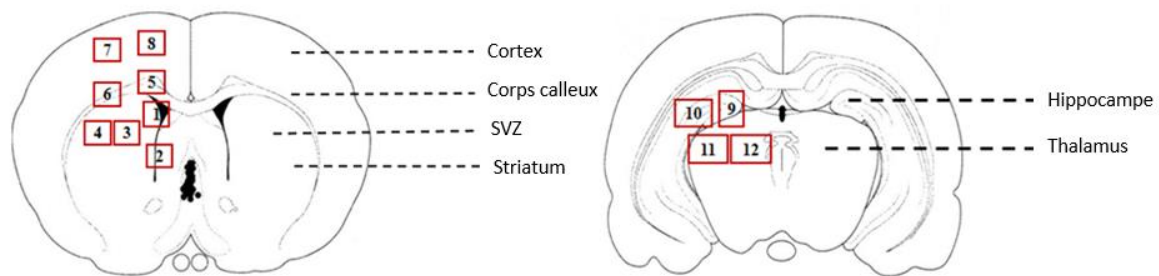


Figure 81 : Schéma des différentes structures cérébrales analysées. [1, 2] SVZ (zone sous-ventriculaire) ; [3, 4] striatum ; [5, 6] corps calleux ; [7, 8] cortex ; [9, 10] hippocampe ; [11, 12] thalamus.

Les images immunohistochimiques de la vascularisation cérébrale, de la réponse astrocytaire et de la substance blanche (myéline) ont été quantifiées grâce au logiciel ImageJ (**Figure 82**). L'objectif pour ces quantifications est de transformer les images 16 bits des immunomarquages (**Figure 82 A**) en images binaires (**Figure 82 C**). Ces images sont ainsi codées en blanc (valeur de 255) et en noir (valeur nulle). À partir de l'image binaire, il est ensuite possible d'extraire de façon automatique 3 paramètres vasculaires que sont la surface vasculaire, la longueur et le diamètre des vaisseaux. De même, il a pu être quantifié la surface marquée par les astrocytes et par la myéline.

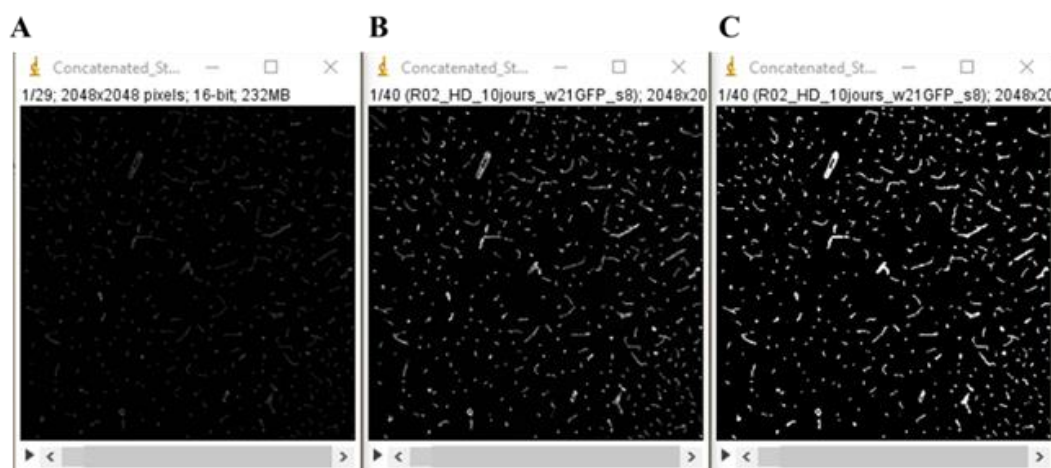


Figure 82 : Capture d'écran des étapes de traitement des images avec le logiciel ImageJ. (A) image brute, (B) image avec rehaussement de contraste de 0,5% appliqué à l'ensemble des coupes et (C) image binaire.

VII - Dosages biochimiques du stress oxydatif

Des échantillons sanguins ont été prélevés chez les animaux vigiles au niveau de la veine caudale avant irradiation puis à différents temps après irradiation cérébrale (1, 2, semaines et 1,3, 6 mois). Une fois prélevés, les échantillons sanguins sont maintenus dans la glace avant centrifugation à 2000g pendant 20 min à 4°C. La centrifugation du sang permet alors de dissocier 3 phases : le plasma, les leucocytes et les globules rouges. Le plasma est alors prélevé et congelé directement dans de la glace carbonique avant d'être conservé à -80°C.

Dosage des espèces réactives de l'interactome (RSI)

Différents types d'espèces réactives de l'interactome (RSI, *reactives species interactome*) ont été quantifiés à partir d'échantillons de tissu cérébral et de plasma : les espèces réactives de l'oxygène (ROS), les espèces réactives de l'azote (RNS), les espèces réactives du carbone (RCS) et les espèces réactives du soufre (RSS) grâce à des sondes fluorescentes spécifiques. Pour quantifier les ROS, deux sondes ont été utilisées : la sonde DHE (dihydroethidium) qui émet une fluorescence lorsqu'elle est oxydée et permet de quantifier l'ion superoxyde (O_2^-) et la sonde DCFDA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) qui permet de doser le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Pour mesurer les RNS, la sonde DHR123 (dihydrorhodamine 123) a été utilisée pour quantifier les ions peroxynitrites ($ONOO^-$) puisqu'elle émet une fluorescence lorsqu'elle est oxydée. Pour mesurer les RCS, la sonde NDB-

H (7-hydrazino-4-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazole) a été utilisée pour quantifier les espèces carbonyles, cette sonde émet une fluorescence lorsqu'elle est oxydée. De même, les RSS ont été mesurées à partir des sondes fluorescentes AzMC (7-Azido-4-methylcoumarin) et SSP4 (Sulfane Sulfur Probe 4) qui permettent de quantifier respectivement l'hydrogène sulfuré (H_2S) et le disulfure d'hydrogène (H_2S_2). Avant toute mesure, ces sondes ont été diluées pour être utilisées à une concentration de 10 μM .

Pour chaque dosage, 180 μL de la solution contenant une des sondes sont déposés dans une plaque noire 96 puits à laquelle sont ajoutés 20 μL de plasma ou de protéines totales (10 $\mu g/\mu L$, dosage des protéines effectué avec kit Pierce BCA protein Assay) extraites sur les échantillons cérébraux. Les plaques noires sont alors incubées 30 min à 37°C et les mesures de fluorescence sont ensuite réalisées avec un lecteur de microplaque (SPARK, Tecan) à des longueurs d'onde d'excitation (exc) et d'émission (emi) spécifiques pour chaque sonde : DHE (exc500-emi590 nm), DCFDA et DHR123 (exc485-emi535 nm), NBD-H (exc500-emi560 nm), AzMC (exc365-emi450 nm) et SSP4 (exc482-emi515 nm).

Dosages par ELISA de l'albumine et de la 8-OHdG

L'ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) permet d'évaluer, par une approche biochimique, la présence de protéines d'intérêt et de quantifier leur concentration. Il s'agit d'un dosage immuno-enzymatique utilisant deux anticorps différents, l'un est spécifique de l'antigène recherché, le deuxième est spécifique du 1^{er} anticorps. Il est alors possible de quantifier la libération du composé coloré par spectrophotométrie. Une gamme étalon est réalisée en parallèle afin d'obtenir une relation linéaire entre l'absorbance mesurée et la concentration de la protéine d'intérêt. Nous avons ainsi mesuré les concentrations d'albumine et de 8-hydroxydésoxyguanosine (8-OHdG) à partir des échantillons de plasma obtenus. Ces analyses ont été réalisées grâce aux kits « Albumin Rat ELISA Kit » (Abcam ; ab108790) et « OxiSelect ELISA Kit Oxidative DNA Damage 8-OHdG » (Cell Biolabs ; STA-320) selon les recommandations techniques des fournisseurs.

L'albumine, protéine hépatique sérique, est la protéine la plus abondante dans le sérum. Elle contribue au maintien de la pression oncotique ainsi qu'au transport de molécules hydrophobes. Le dosage de la concentration plasmatique d'albumine dans le cadre de ces travaux permet de mettre en évidence la présence d'un stress oxydatif associé à une

inflammation systémique. En effet, les ROS produites lors d'une inflammation ciblent l'albumine, celle-ci est alors oxydée et sa concentration diminue.

La présence de 8-OHdG au niveau plasmatique met en évidence des dommages à l'ADN irréversibles induits par le stress oxydatif. En effet, il existe des mécanismes de réparation de l'ADN permettant de remplacer les lésions. Elles sont ensuite éliminées du milieu intracellulaire vers les compartiments extracellulaires, tels que le sang et les urines (Haghdoust, 2005). La quantification de 8-OHdG vise à établir un lien dose/réponse entre l'irradiation et le taux de 8-OHdG produit afin de quantifier de manière indirecte le stress oxydatif.

VIII - Analyses Statistiques

Tous les résultats sont présentés sous forme de moyenne + écart-type (SD), sauf indication contraire mentionnée dans la légende des figures dans la partie RESULTATS du manuscrit. Concernant les effectifs des animaux au sein de chaque groupe, ceux-ci sont mentionnés dans la légende des figures car le nombre de rats par groupe expérimental peut varier selon les approches méthodologiques employées. Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel Statistica (StatSoft, Inc). Au préalable, la normalité de l'ensemble des données présentées dans cette thèse a été testée avec un test de Shapiro. La majorité de ces données répondant à une loi normale, des tests paramétriques ont été effectués : une ANOVA à 1 ou 2 facteurs (effets groupe et temps) qui, lorsque qu'elle était significative, était suivie du test post-hoc LSD de Fisher.

RESULTATS

Etude 1 : Caractérisation multiparamétrique et longitudinale de la radiotoxicité cérébrale chez le rat adulte

Bien que la plainte cognitive (mémoire, processus attentionnels, fonctions exécutives) soit fréquemment rapportée par les patients traités par RT, il n'existe actuellement aucun argument expérimental permettant de conclure sur l'évolution temporelle des différents processus physiopathologiques en réponse à la RT et leurs conséquences sur l'apparition des déficits cognitifs. C'est pourquoi de nouvelles recherches sont nécessaires pour identifier la chronologie des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués directement dans la mise en place progressive des dysfonctionnements cognitifs qui à long terme deviennent irréversibles. Ainsi, l'identification précise des processus médiant la neurotoxicité radique devrait permettre de faire émerger de nouvelles thérapies. De même, il est primordial de proposer des outils capables de détecter et de prédire les toxicités neurologiques induites par la RT afin d'améliorer la prise en charge des patients. C'est pourquoi, les modèles animaux de radiotoxicité cérébrale sont essentiels pour répondre à ces problématiques.

Dans ce contexte, l'objectif de la première étude menée lors de mes travaux de thèse était de développer et de caractériser de manière multiparamétrique et longitudinale la radiotoxicité cérébrale dans un modèle de rat mâle adulte exposé à une irradiation cerveau entier à une dose fractionnée de 30 Gy. Ainsi, nous nous sommes attachés à évaluer l'état général et comportemental de l'animal (fatigue, locomotion, mémoire, anxiété et dépression), l'intérêt de différentes modalités d'imagerie IRM (IRM anatomique, IRM vasculaire et IRM de diffusion) ainsi que la pertinence de marqueurs du stress oxydatif en tant que biomarqueurs.

I - Analyse dosimétrique de l'irradiation cérébrale chez le rat

Avant de pouvoir caractériser la radiotoxicité cérébrale dans notre modèle animal, nous avons tout d'abord réalisé une analyse dosimétrique à partir du système de planification de traitement (TPS) pour nous assurer de la robustesse du protocole d'irradiation (dose de 30 Gy répartie en 3 fractions quotidiennes sur le cerveau entier). Ainsi, les cartes de dépôt dose générées à l'aide du TPS simulant une dose de 10 Gy, correspondante à une fraction de notre protocole d'irradiation, ont été recalées sur les images obtenues en IRM anatomique (**Figure 83**) en vue de quantifier différents paramètres dosimétriques au sein de plusieurs structures cérébrales et organes à risque (OAR).

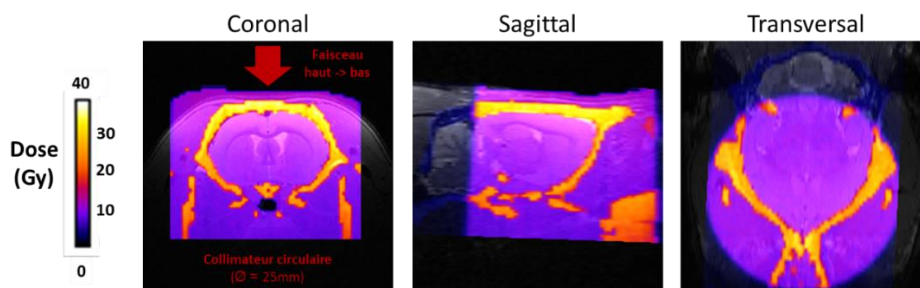


Figure 83 : Observations d'une carte de dépôt de dose obtenue à l'issue d'une planification de traitement (TPS) et recalée sur une image IRM anatomique. Le protocole d'irradiation consiste en une irradiation de l'ensemble du cerveau, hormis le cervelet) à une dose de 3x 10 Gy délivrée par un faisceau de rayons X unique, orienté haut-bas et collimaté avec un cylindre de 25 mm de diamètre.

Une analyse dosimétrique a alors été réalisée en générant les courbes HDV (histogramme dose-volume) à partir de stimulât. Ces courbes HDV nous ont alors permis d'extraire les doses moyennes, maximales et minimales (D_{moy} , D_{max} , D_{min} respectivement) reçues par les différentes structures cérébrales et par les OAR (Organes à Risques). Comme présenté sur la **Figure 84 A**, les courbes HDV pour l'ensemble des structures cérébrales étudiées ont des profils similaires avec quasiment 100% du volume de ces structures recevant une dose d'irradiation centrée sur 10 Gy. Concernant les OAR, les courbes HDV sont fortement décalées vers la gauche par comparaison aux régions du cerveau analysées, ce qui indique que les doses reçues par les OAR sont plus faibles (**Figure 84 B**). Les paramètres quantitatifs extraits de ces courbes HDV montrent que les D_{50} sont comprises entre 10,4 Gy et 9,5 Gy selon les structures cérébrales. Les OAR tels que l'œil et les glandes salivaires sont faiblement irradiés comme en témoigne les D_{50} qui sont inférieures à 1 Gy. En revanche, l'œsophage reçoit tout de même une dose moyenne de 6,7 Gy, ce qui était attendu puisque nous avons

irradié du haut vers le bas du crâne et que les rayons sont connus pour avoir un fort pouvoir pénétrant dans les tissus (**Figure 84 C**).

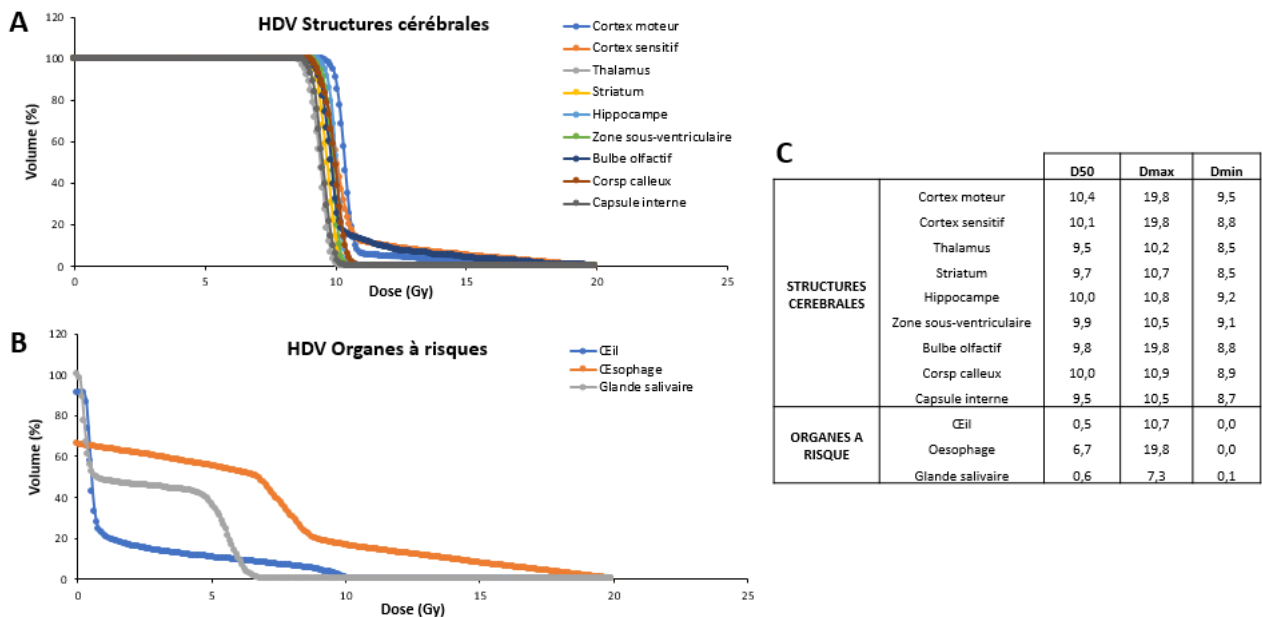


Figure 84 : Estimation du volume irradié en fonction de la dose reçue (courbes HDV) dans (A) les structures cérébrales d'intérêt et (B) les organes à risque pour une simulation TPS d'une dose de 10 Gy déposée sur le cerveau entier. (C) Quantification des doses moyenne (Dmoy), maximale (Dmax) et minimale (Dmin) pour chacune des structures cérébrales étudiées et les organes à risque.

Enfin, il nous a semblé indispensable de valider biologiquement les résultats obtenus à l'aide du TPS. Pour cela, nous avons réalisé un immunomarquage γ H2AX pour évaluer les cassures double brin de l'ADN sur des coupes d'un hémisphère cérébral prélevé 2h post-irradiation (lorsque l'animal a terminé la totalité du protocole d'irradiation, c'est-à-dire quand il a reçu la dose totale de 30 Gy). Les images présentées sur la **Figure 85** montrent bien la présence d'un marquage γ H2AX (en rouge) assez homogène sur l'ensemble du tissu cérébral chez le rat irradié alors qu'aucun marquage n'est observé sur le cerveau du rat contrôle (**Figure 85**).

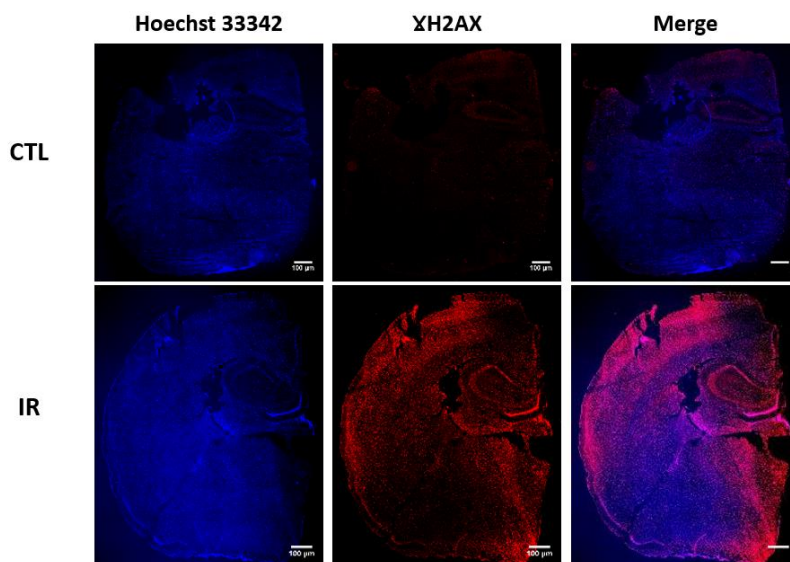


Figure 85 : Comparaison des marquages des cassures double brin de l'ADN (anticorps anti- γ H2A, en rouge) et des noyaux cellulaires (agent intercalant Hoechst 33342, en bleu) dans le cerveau d'un rat contrôle (CTL) et d'un rat irradié sur cerveau entier (IR). Les images obtenues par des acquisitions de type mosaïque représentent seulement un hémisphère cérébral qui a été prélevé 2 heures après irradiation.

L'analyse dosimétrique associée à l'immunomarquage des cassures double brin de l'ADN montrent que les paramètres choisis pour le protocole d'irradiation cerveau entier permettent un dépôt de dose de bonne qualité entre les 2 hémisphères cérébraux (homogénéité droite/gauche) ainsi qu'entre les structures corticales et sous-corticales (homogénéité haut/bas).

II- Effet de l'irradiation cérébrale sur le comportement animal

I – 1 Etat général

Afin d'analyser les effets de l'irradiation panencéphalique sur l'état général de l'animal et de son évolution pendant les phases aiguë, précoce et tardive, nous avons quantifié la masse corporelle des rats ainsi que des indices putatifs de leur état général (cf page 151). La survie des animaux au cours du protocole expérimental a également été évaluée.

- Suivi du poids corporel

Le suivi du poids des animaux, réalisé à partir des pesées régulières des animaux tout au long du protocole expérimental, nous indique tout d'abord que l'ensemble des animaux du groupe contrôle prend progressivement du poids au cours de l'étude, comme escompté (**Figure 86**). Et si les animaux irradiés ne présentent aucune différence de poids par rapport

aux contrôles avant irradiation, ces derniers ont une subite perte de poids pendant les 2 semaines après irradiation. A partir du 14^{ème} jour post-irradiation, les animaux irradiés vont progressivement reprendre du poids mais celui-ci restera très nettement inférieur à celui des rats contrôles tout au long de l'étude et ce jusqu'au moment de l'euthanasie ($p < 0,0001$) (**Figure 86**).

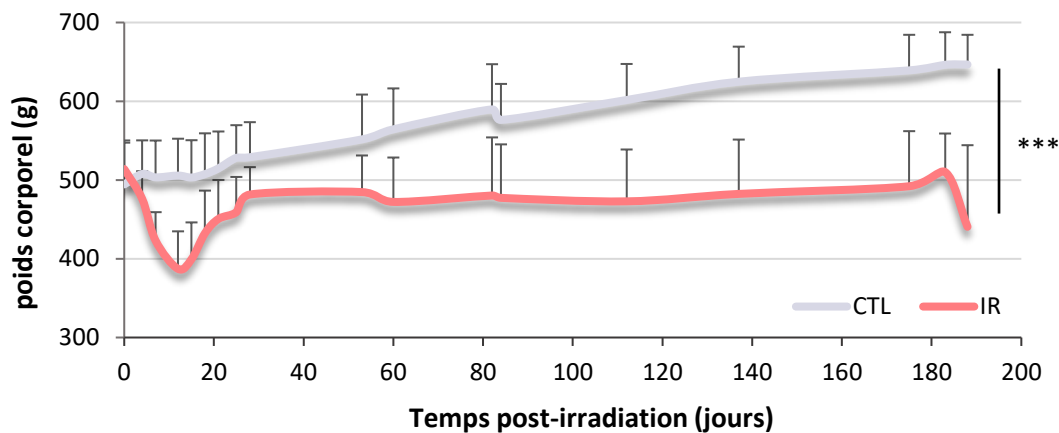


Figure 86 : Suivi du poids corporel des animaux contrôles (CTL) et irradiés (IR) jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale. Moyenne + SD ; CTL n=9-22 rats et IR n= 8-26 rats selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec *** $p < 0,0001$.

- Score de l'état Général

Le poids des animaux doit être mis en regard du score d'état général qui a été mis en place au laboratoire lors de mes travaux de thèse. Le nombre d'animaux est inférieur pour les deux groupes par rapport aux effectifs du suivi du poids corporel car ce test a été imaginé et initié au cours de ma deuxième année de thèse et donc, par conséquent, les premières cohortes d'animaux n'y ont pas été soumises.

Le score d'état général est basé sur l'observation de certaines caractéristiques physiques telles que décrit dans la partie Matériels et Méthodes (page 152). Ce score qui est initialement d'environ 30 chez tous les animaux au début du protocole, apparaît comme relativement stable dans le temps chez les animaux contrôles. En effet, ces derniers présentent en moyenne un score de 28 sur l'ensemble de l'étude (**Figure 87**). En revanche, les rats irradiés, qui ont également un score de 30 avant irradiation, présentent un score d'état général significativement plus faible dès la fin de la première semaine après irradiation avec une médiane de 23 contre 29 chez les contrôles ($p < 0,0001$) (**Figure 87**). Ceci se traduit par la

présence progressive de porphyrine au niveau du museau qui est légèrement gonflé mais également une salivation plus importante. Chez certains animaux irradiés, nous pouvons aussi observer des traces de porphyrine au niveau des pattes avant (signe de la grande production de cette substance et des difficultés rencontrées par le rat pour se toiletter) accompagnées dans certains cas de pelades. De plus, le poil apparaît globalement plus sale à ce moment de l'étude chez les rats irradiés que chez les rats contrôles.

Tout comme la mesure du poids, l'état général des animaux irradiés s'améliore alors progressivement. Cependant, à partir de la 3^{ème} semaine et jusqu'à 2,5 mois après irradiation, l'état général des animaux irradiés reste significativement inférieur à celui des animaux contrôles (**Figure 87**). En effet, nous avons pu observer le développement de pelades et de lésions cutanées radio-induites sur le dessus de la tête à partir de la 3^e semaine post-irradiation. Ces lésions vont mettre plusieurs semaines pour cicatriser ; les pelades vont s'estomper dans le temps mais seront toujours visibles 6 mois après irradiation. Au-delà de deux mois et demi après irradiation, le score des rats irradiés rejoint celui des contrôles, indiquant une restauration de l'état général de ces animaux. Celui-ci est cependant de nouveau impacté à la fin de l'étude (6 mois après irradiation) puisque les rats irradiés sont à la fois plus maigres et présentent un score d'état général inférieur aux contrôles sans toutefois atteindre le seuil de significativité statistique.

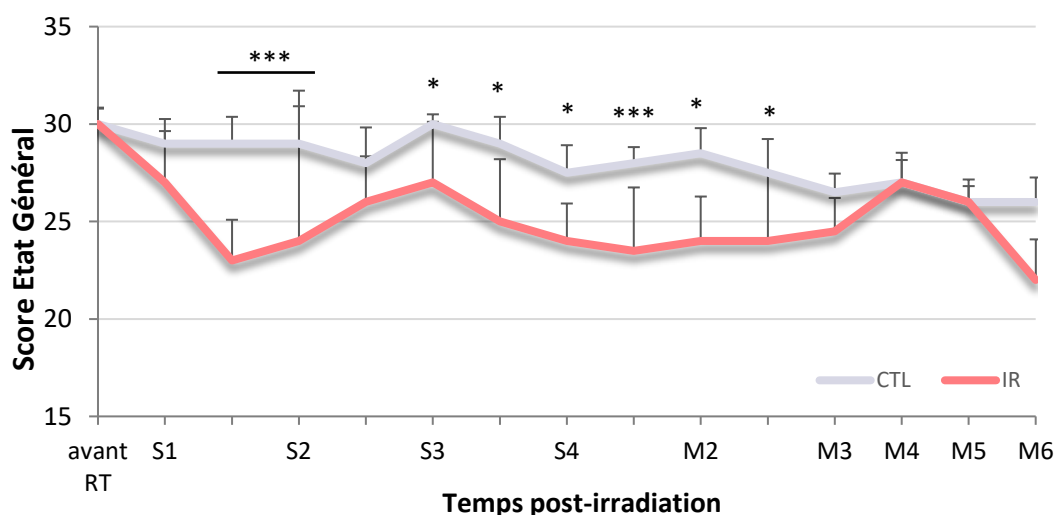


Figure 87 : Score d'état général des animaux contrôles (CTL) et irradiés (IR) au cours du protocole. Le score de l'état général évalue à la fois la posture (dos voûté, tête baissée), l'aspect du corps (poils...), mais aussi la tête (pelades, saignements, lésions cutanées), les yeux (porphyrine, yeux mi-clos), le nez (porphyrine, gonflement, salivation) et l'état des pattes avant (porphyrine, pelades). Chaque item est scoré selon 0 = absence ; 1 = présence ; 2 = forte présence. Un animal présentant un bon état général doit donc avoir un score proche de 0. Toutefois, pour une meilleure lisibilité des résultats, le score de chaque animal à chaque temps d'étude a été soustrait de 30, ce qui amène à avoir le score maximal de 30 pour un rat avec un bon état général. Le temps post-irradiation représenté sur l'axe des abscisses est exprimé en semaines (S) ou en mois (M). Médiane

+ SD ; CTL n=4-10 rats et IR n= 3-12 rats selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,0001$.

Ce score souligne ainsi que l'état général des animaux est globalement diminué par l'irradiation fractionnée du cerveau entier alors qu'il apparaît comme stable au cours du temps chez les animaux contrôles.

- Evaluation de la survie

Enfin, nous avons mené une étude de la survie des animaux contrôles et irradiés tout au long de l'étude (jusqu'à 6 mois post-irradiation). Les courbes de Kaplan-Meier présentées sur la **Figure 88** montrent une mortalité significativement plus importante chez les animaux irradiés par rapport aux animaux contrôles ($p = 0,02$). Le nombre de rats décédés au cours de l'étude était respectivement de 1 dans le groupe CTL et de 6 dans le groupe IR. De plus, la survie moyenne était de 195 jours pour les rats contrôles et de 168 jours chez les rats irradiés (**Figure 88**).

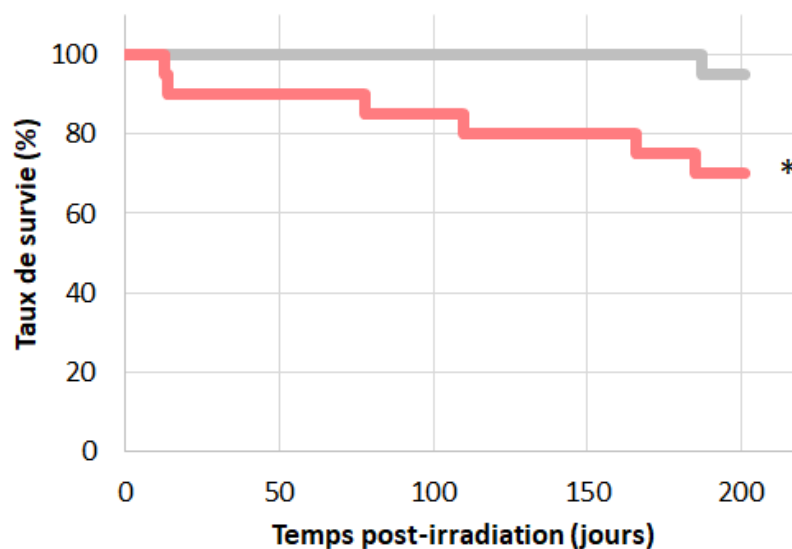


Figure 88 : Courbes de Kaplan-Meier illustrant la survie des animaux contrôles (CTL) et irradiés (IR) réalisée jusqu'à 6 mois après irradiation encéphalique. CTL, n = 25 ; IR, n = 20. Test de log-rang, * $p < 0,05$.

En résumé, l'irradiation cérébrale provoque des atteintes physiques avec une importante perte de poids et un état général globalement diminué par rapport aux rats contrôles et réduit également la survie des animaux.

I – 2 Fatigue et activité locomotrice

La fatigue étant un symptôme souvent décrit après RT par les patients atteints de tumeurs cérébrales, nous avons souhaité quantifier longitudinalement cet état de fatigue qui n'est jamais présenté dans les études précliniques visant à déterminer les effets de l'irradiation sur le tissu cérébral sain (non-tumoral). Ainsi, la fatigue a été évaluée par le Fatest que j'ai développé au début de ma thèse et l'activité locomotrice a été étudiée en parallèle avec le test de l'*Open field*.

- Fatest

Nous avons développé le « Fatest » afin d'obtenir un index de fatigue des animaux en mesurant le temps que ceux-ci mettent pour atteindre le sommet du dispositif expérimental. Nous observons tout d'abord un effet temps chez les rats contrôles. En effet, ceux-ci mettent de moins en moins de temps pour atteindre le sommet du dispositif au fil du temps (**Figure 89**). Les rats irradiés ont des performances similaires à celles de rats contrôles avant irradiation et également 1 semaine après irradiation (**Figure 89**). Cependant, à 2 semaines, 3 mois et 6 mois après irradiation, les animaux irradiés mettent significativement plus de temps pour grimper sur le plan incliné par rapport aux témoins (**Figure 89**).

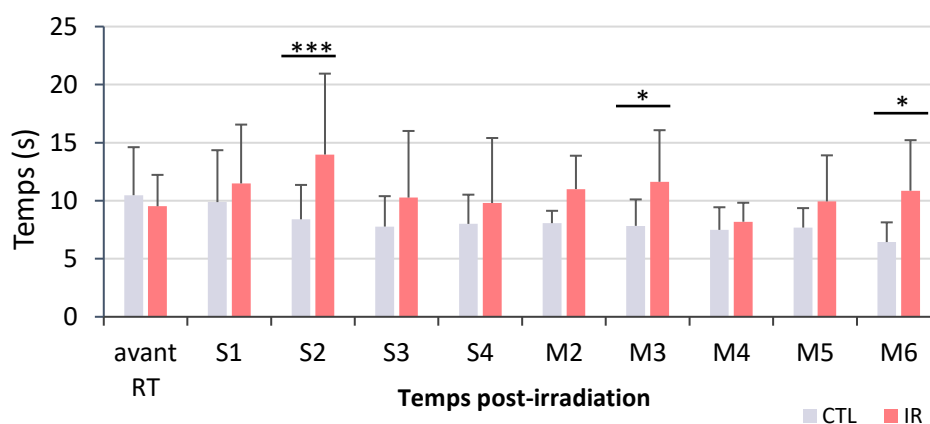


Figure 89 : Evaluation de l'état de fatigue des animaux contrôles (CTL) et irradiés (IR) jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale avec le Fatest. Le paramètre mesuré est le temps mis pour atteindre le sommet du dispositif exprimé en seconde. Le temps post-irradiation représenté en abscisse est exprimé en semaine (S) ou en mois (M). Moyenne + SD ; CTL n=11-16 rats et IR n= 9-20 rats selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$ et *** $p < 0,0001$.

Ces résultats étant obtenus à l'aide d'un test original, nous les avons couplés à l'étude des déplacements spontanés des rats au sein d'un *Open field* dont le test dure 10 minutes afin d'évaluer la fatigue radio-induite à travers l'activité locomotrice.

- Open field

L'activité locomotrice des rats dans l'*Open field* a été mesurée à travers 3 paramètres quantitatifs que sont l'inactivité des rats (**Figure 90 A**), la distance parcourue (**Figure 90 B**) et la vitesse de déplacement (**Figure 90 C**). Nous observons que les animaux contrôles vont progressivement être plus inactifs (**Figure 90 A**) et parcourir une plus petite distance (**Figure 90 B**) à mesure que ce test comportemental est répété au cours de l'étude. En revanche, leur vitesse de déplacement reste similaire au cours du temps (**Figure 90 C**). *A contrario*, les rats irradiés vont avoir une activité locomotrice réduite au cours du temps comme en témoigne l'augmentation de leur temps d'inactivité (**Figure 90 A**), la diminution de la distance parcourue (**Figure 90 B**) pendant le test ainsi que la réduction de leur vitesse de déplacement (**Figure 90 C**).

En comparant les deux groupes, nous observons des profils similaires avant irradiation. Néanmoins, dès la 1^{ère} semaine après irradiation cérébrale, l'activité locomotrice des animaux irradiés se distingue significativement de celle des animaux contrôles. En effet, les rats irradiés présentent un pourcentage d'inactivité largement supérieur aux rats contrôles lors de la 1^{ère} et 2^{ème} semaine après irradiation ($p < 0.001$) (**Figure 90 A**). De plus, ces animaux se déplacent moins vite tout au long de l'étude (**Figure 90 B**) et parcourent une distance significativement plus faible lors des 4 premiers mois suivant l'irradiation encéphalique en comparaison des rats contrôles (**Figure 90 B**).

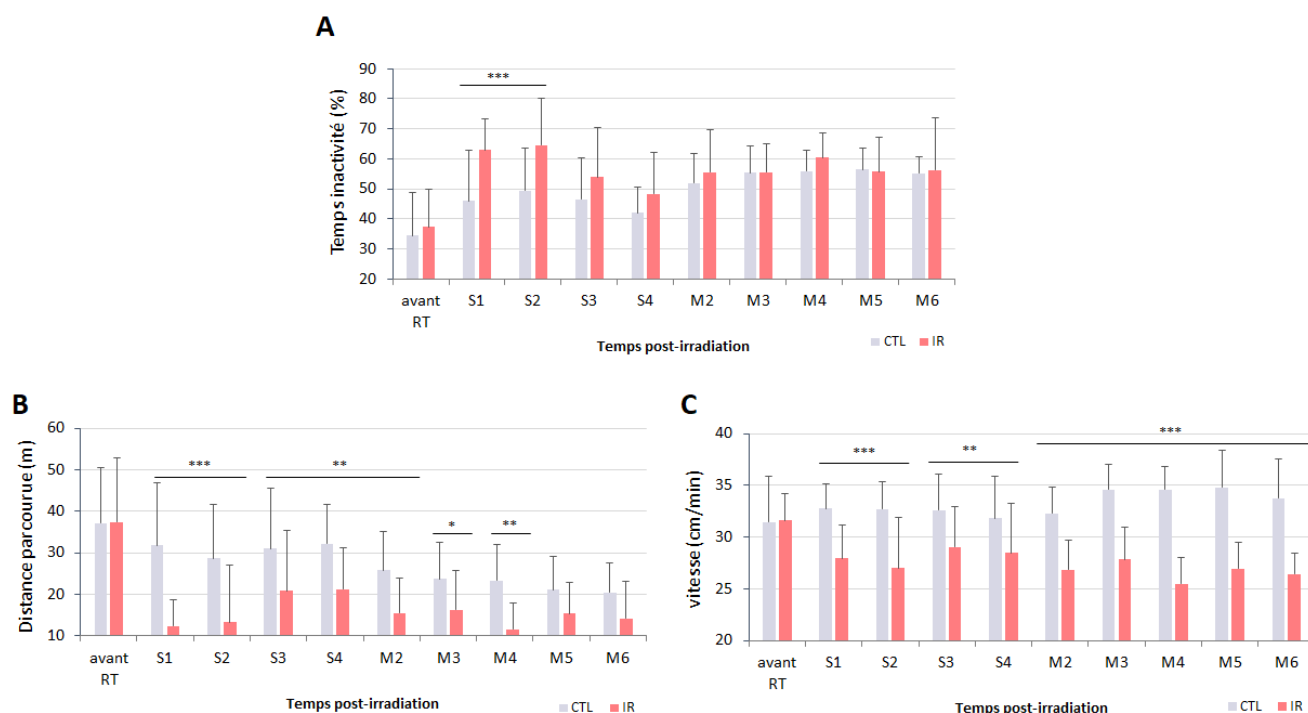


Figure 90 : Evaluation de l'activité locomotrice des animaux contrôles (CTL) et irradiés (IR) jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale avec le test de l'Open field. (A) Temps d'inactivité des animaux. (B) Distance parcourue pendant la durée du test. (C) Vitesse de déplacement des rats. Le temps post-irradiation en abscisse est présenté en semaine (S) et en mois (M). Moyenne + SD ; CTL n=16-22 rats et IR n= 19-26 rats selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et * $p < 0,0001$.**

Les données obtenues, présentées dans la **Figure 90**, affichent de très nettes différences entre le groupe IR et le groupe CTL que ce soit en termes de temps passé à être inactif, de distance parcourue ou encore de vitesse de déplacement. Nous pouvons alors en déduire que l'irradiation cérébrale induit une diminution de l'activité locomotrice associée à une fatigue, non seulement pendant la phase aigüe mais également plusieurs mois après l'exposition du cerveau aux rayons X.

I – 3 Cognition

Après RT, les patients atteints de tumeurs cérébrales vont progressivement développer des dysfonctionnements cognitifs qui touchent leurs capacités mnésiques et d'apprentissage ainsi que leurs fonctions exécutives. Ce déclin cognitif radio-induit va à terme devenir irréversible. Pour valider au mieux la pertinence du modèle animal de radiotoxicité cérébrale que nous avons utilisé dans cette étude, il nous paraissait indispensable d'évaluer longitudinalement les capacités mnésiques des animaux après irradiation. Dans ce sens, une batterie de tests évaluant différentes formes de mémoire chez les rongeurs a été réalisée :

test de reconnaissance du nouvel objet (mémoire à court-terme), test de l'évitement passif (mémoire à long-terme) et test du labyrinthe en Y (mémoire à court terme avec une composante spatiale).

- Mémoire à court-terme (test de reconnaissance d'objet)

La mémoire à court terme, en particulier la mémoire de travail, a été évaluée à travers différents paramètres mesurés lors du test de reconnaissance du nouvel objet : le temps d'exploration globale (objet familier + objet nouveau), l'indice de discrimination de l'objet nouveau et la fréquence d'exploration de l'objet nouveau. Les deux groupes d'animaux considérés (CTL et IR) présentent des résultats comparables avant irradiation pour chacun de ces trois paramètres retenus (**Figure 91**).

Les rats contrôles présentent une exploration globale stable dans le temps de l'ordre de 5,5% du temps total du test (**Figure 91 A**), tandis que les rats irradiés semblent explorer d'avantage les objets avec un pourcentage moyen d'exploration globale de 7,6% sur l'ensemble de l'étude. En outre, le groupe irradié explore significativement plus lors de la 1^{ère} semaine et le 5^{ème} mois post-irradiation vis-à-vis du groupe contrôle ($p < 0,05$) (**Figure 91 A**). En revanche, l'indice de discrimination varie légèrement dans le temps chez les individus contrôles mais semble être supérieur à l'indice de discrimination du nouvel objet mesuré chez les animaux irradiés (**Figure 91 B**). En effet, les valeurs de l'indice de discrimination de l'objet nouveau semblent être diminuées chez les animaux irradiés à 1 semaine, 2 semaines et 4 mois après irradiation, sans toutefois être significativement différent du groupe contrôle. Cependant, au 5^{ème} mois post-irradiation, les rats irradiés discriminent significativement mieux les objets que les rats contrôles (**Figure 91 B**). Ainsi, l'exploration accrue des objets par le groupe IR se traduit par une durée d'exploration plus intensive de l'objet nouveau par comparaison au groupe CTL (données non présentées).

L'analyse de la fréquence d'exploration de l'objet nouveau, nous indique que ce paramètre présente des valeurs relativement stables au cours du temps dans le groupe CTL (sauf au temps 5 mois) alors que les valeurs sont fluctuantes dans le groupe IR. Nous observons que les rats irradiés explorent moins fréquemment l'objet nouveau que les rats contrôles lors des 2 premières semaines ainsi qu'à 4 et 6 mois post-irradiation. En revanche,

ils explorent significativement plus fréquemment l'objet nouveau au temps 5 mois par rapport aux rats contrôles (**Figure 91 C**).

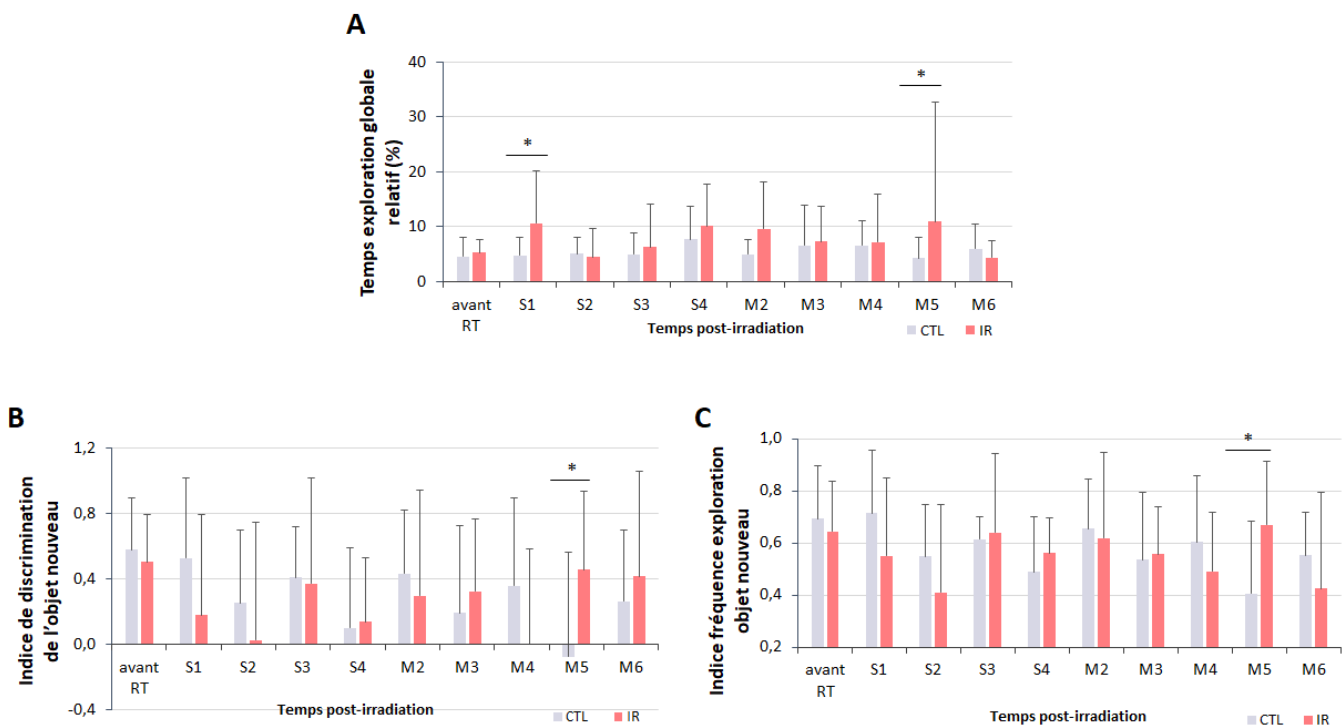


Figure 91 : Evaluation de la mémoire à court terme des animaux contrôles (CTL) et irradiés (IR) jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale avec le test de reconnaissance du nouvel objet. Plusieurs paramètres ont été mesurés : **(A)** le temps d'exploration relatif des deux objets présentés (%) ($T_{\text{nouv.}} + T_{\text{fam.}}$) / 180, **(B)** l'indice de discrimination de l'objet nouveau calculé à partir des temps d'exploration de l'objet nouveau ($T_{\text{nouv.}}$) et familier ($T_{\text{fam.}}$) : $\frac{T_{\text{nouv.}} - T_{\text{fam.}}}{T_{\text{nouv.}} + T_{\text{fam.}}}$ et **(C)** l'indice de fréquence d'exploration de l'objet nouveau ($\frac{\text{Freq. nouv.}}{\text{Freq. nouv.} + \text{Freq. fam.}}$). Temps post-irradiation présentés en abscisse en semaine (S) ou en mois (M). Moyenne + SD ; CTL n=12 rats et IR n= 11-14 rats selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$.

L'ensemble de ces résultats semble indiquer que l'irradiation encéphalique induit certains troubles de la mémoire à court terme lors d'une tâche de reconnaissance d'objet, en particulier lors de la 1^{ère} et 2^{ème} semaine post-irradiation ainsi qu'au 4^{ème} mois, sans toutefois dépasser le seuil de significativité entre les groupes.

- Mémoire à long-terme (test d'évitement passif)

Nous avons également évalué la mémoire à long terme de façon longitudinale en utilisant le test d'évitement passif. Nous observons alors que lors de la phase d'acquisition, les animaux contrôles et irradiés mettent en moyenne 20 et 40 secondes respectivement pour pénétrer dans le compartiment le plus sombre où ils recevront un choc électrique au niveau des pattes, valeurs qui sont significativement similaires entre les groupes CTL et IR. Lors de la

première session de test avant irradiation, nous constatons que l'ensemble des rats reste dans le compartiment lumineux et affichent une latence moyenne maximale, soit 180 sec. Les rats des deux groupes ont donc bien mémorisé la présence du choc dans le compartiment sombre. De plus, cette latence avant de changer de compartiment est relativement stable dans le groupe contrôle tout au long de l'étude (**Figure 92**). En revanche, les rats irradiés présentent un temps de latence qui diminue progressivement à partir du 2^e mois post-irradiation et qui est significativement plus faible que celui des animaux contrôles au cours des trois derniers mois de l'étude (4^{ème} au 6^{ème} mois de l'étude) (**Figure 92**).

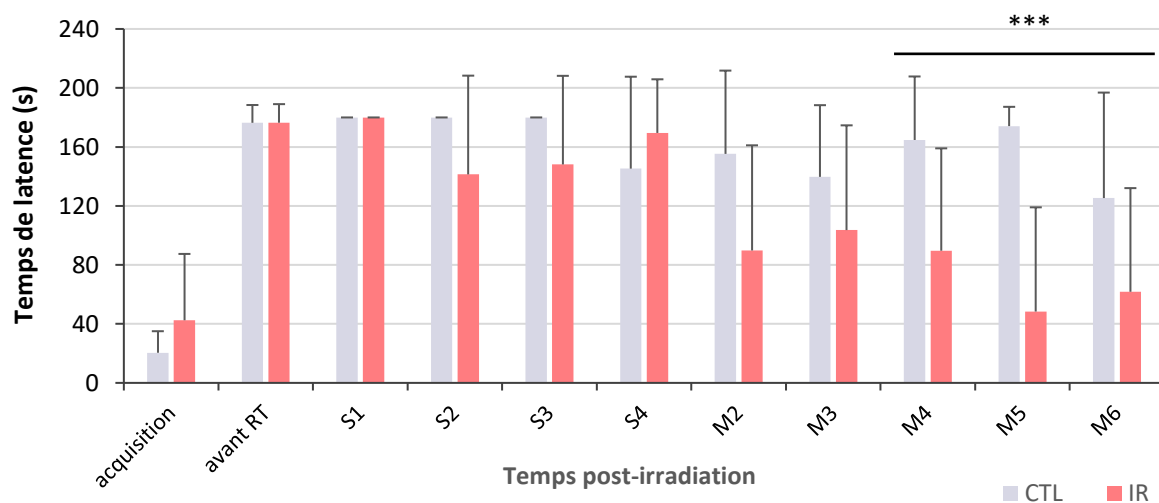


Figure 92 : Evaluation de la mémoire à long terme des animaux contrôles (CTL) et irradiés (IR) jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale avec le test de l'évitement passif. Temps post-irradiation en abscisse exprimé en semaine (S) ou mois (M). Moyenne + SD ; CTL n=8-11 et IR n=8-14 rats selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec *** $p < 0,0001$.

Ces résultats suggèrent donc que les rats contrôles ont non seulement appris la présence du choc dans le compartiment sombre mais également retenu l'information durant plusieurs mois (l'administration de choc n'étant jamais répétée après la session d'acquisition). En revanche, l'irradiation induit une atteinte progressive de la mémoire à long-terme, très marquée lors de la phase tardive post-irradiation, qui se traduit par une diminution du temps de latence pour entrer dans le petit compartiment sombre chez les rats irradiés par rapport aux rats contrôles.

- Mémoire spatiale (labyrinthe en Y)

La composante spatiale de la mémoire a été évaluée à l'aide du labyrinthe en Y. Les rats ont la possibilité de se déplacer à l'intérieur du dispositif afin d'explorer l'ensemble des trois

bras identiques qui le constituent : un bras de départ, un bras familier et un bras nouveau que le rat découvre dans la dernière phase du test. Les déplacements sont ensuite analysés et plusieurs paramètres exploités tels que l'indice de discrimination des bras, le pourcentage d'alternance ou encore le pourcentage de temps passé dans le bras nouveau (**Figure 93**). Nous constatons une très grande variabilité interindividuelle au sein même du groupe CTL mais également entre les différents temps de l'étude. Après analyse statistique, nous ne relevons pas de différence significative entre les animaux contrôles et irradiés pour le pourcentage de temps passé dans le nouveau bras (**Figure 93 C**). Néanmoins, l'indice de discrimination du bras nouveau et le pourcentage d'alternance sont inférieurs chez les rats irradiés par rapport aux rats contrôles, aux 5^{ème} et 6^{ème} mois respectivement (**Figure 93 A, B**). Il semblerait donc que l'irradiation induise des déficits de la mémoire spatiale de façon tardive.

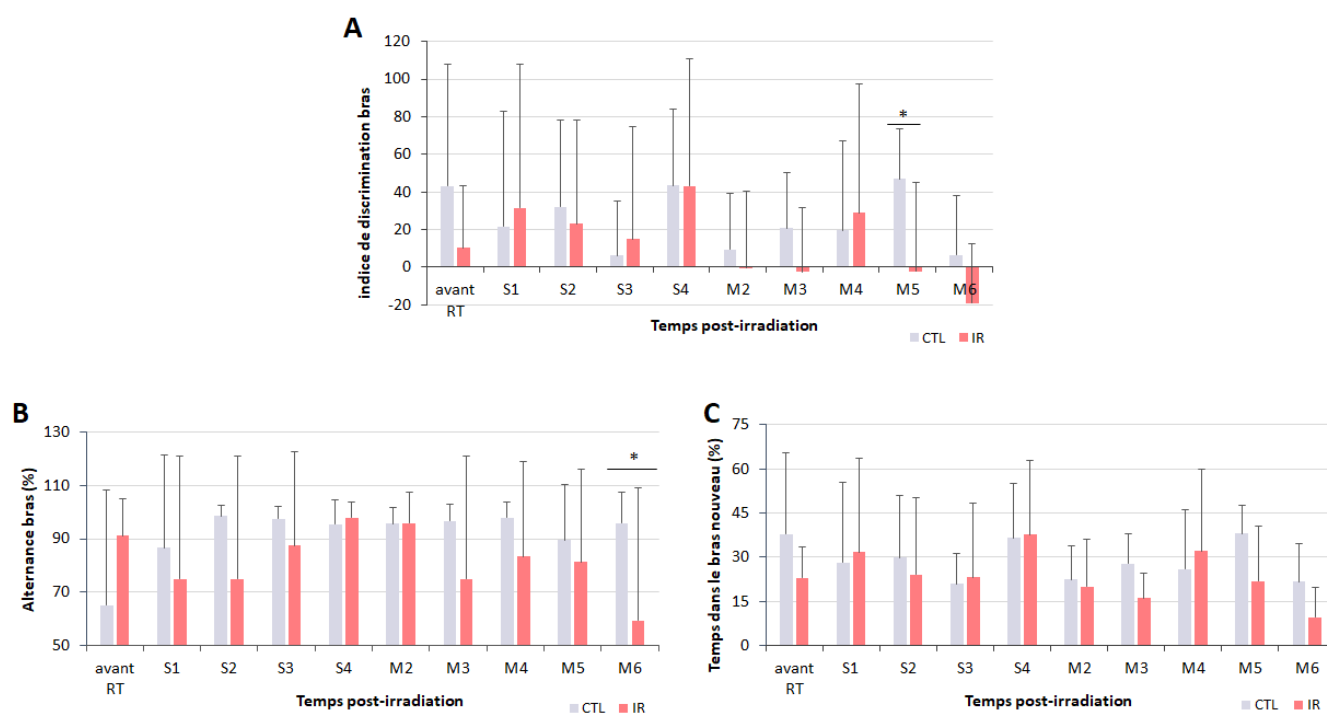


Figure 93 : Evaluation de la mémoire spatiale à court terme à l'aide du labyrinthe en Y chez les rats contrôles (CTL) et irradiés (IR). **(A)** Indice de discrimination du bras nouveau. **(B)** % d'alternance entre les bras. **(C)** % de temps passé dans le bras nouveau. Temps post-irradiation en abscisse exprimé en semaine (S) ou mois (M). Moyenne + SD ; CTL n=8 rats et IR n= 8 rats selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec *p < 0,05.

En regroupant l'ensemble des résultats obtenus avec les différents tests comportementaux évaluant la mémoire chez le rat, nous pouvons avancer que l'irradiation cérébrale induit des déficits de mémoire à court-terme transitoires et/ou cycliques avec une atteinte présente dès les deux premières semaines après irradiation, suivie d'une phase de

récupération, puis d'une deuxième phase plus tardive de troubles à partir du 4^e mois. Nos résultats soulignent également des déficits tardifs de la mémoire à long-terme et spatiale. L'irradiation du tissu cérébral sain a donc un réel effet délétère sur la cognition.

I – 4 Anxiété et anhédonie

Chez les patients atteints de tumeurs cérébrales et traités par RT, il est également décrit, en plus des troubles cognitifs, des syndromes d'anxiété et de dépression. Toutefois, il n'est pas connu si l'anxiété et/ou la dépression sont provoquées par le contexte de la pathologie et la psychologie qui y est associée, ou bien si la RT peut elle-même être un facteur déclenchant/majorant ces effets chez les patients. C'est pourquoi, nous avons étudié le comportement de type anxiété et de type dépression dans notre modèle d'irradiation encéphalique chez le rat adulte. L'anxiété et l'anhédonie des animaux ont été évaluées tout au long du protocole à l'aide du test de l'*Open field* et le *Splash test*, respectivement, comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes (page 157).

- Open field

Le temps passé au centre d'un *Open field* peut être un indicateur du niveau d'anxiété des animaux. Avant irradiation les groupes CTL et IR présentent des temps similaires. Comme présenté sur la **Figure 94**, au cours du premier mois post-irradiation, les rats contrôles passent sensiblement le même temps au centre. Les rats irradiés semblent passer moins de temps dans la zone centrale de l'*Open field* que les rats contrôles lors de la 1^{ère} et 2^{ème} semaines et de façon plus modérée lors des 3^{ème} et 4^{ème} semaines post-irradiation. De 2 à 4 mois post-irradiation, les deux groupes d'animaux présentent des résultats similaires tandis qu'à partir du 5^{ème} mois, les rats irradiés semblent passer plus de temps que les rats contrôles au centre du dispositif (**Figure 94**).

Les importantes variabilités interindividuelles relevées ne permettent pas de conclure de manière précise sur l'effet de l'irradiation cérébrale sur l'anxiété puisque le temps passé dans la zone d'intérêt n'est pas significativement différent entre les deux groupes tout au long du protocole. Néanmoins, les données obtenues semblent indiquer que l'irradiation cérébrale induit un comportement de type anxiété chez le rat lors de la phase aigüe (semaines 1 et 2 post-irradiation). Pour s'assurer que ceci ne serait pas lié à un comportement d'anhédonie,

qui se définit par une perte de la capacité à ressentir le plaisir et qui est considéré comme un symptôme central de la dépression, nous nous sommes attardés à l'évaluer à l'aide du *Splash test*.

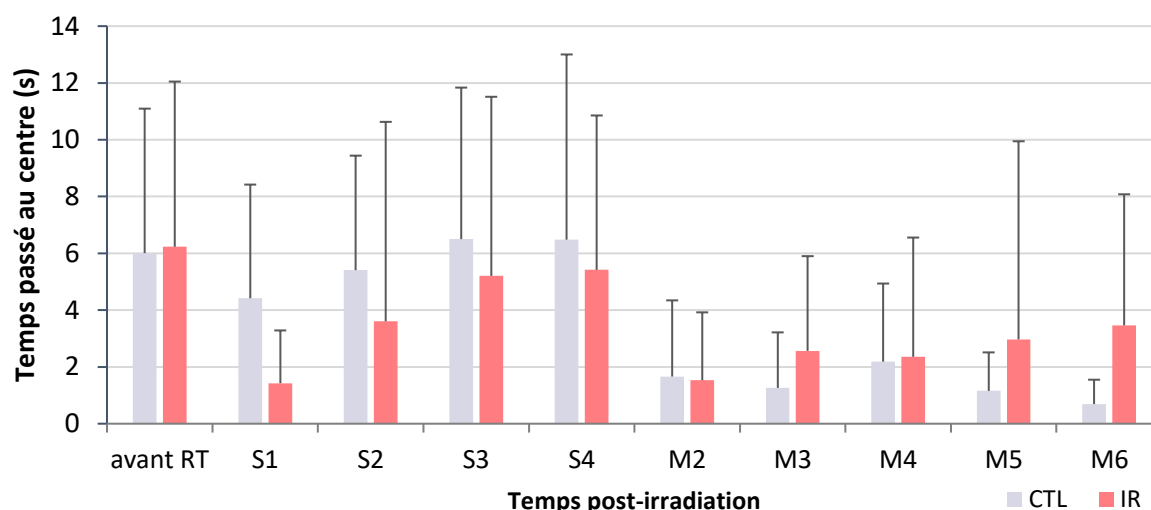


Figure 94 : Evaluation du comportement de type anxiété chez les rats contrôles (CTL) et irradiés (IR) avec le test de l'Open field. Le temps passé au centre de l'enceinte, connue pour être anxiogène pour les rongeurs, a été utilisé comme indicateur d'anxiété. Temps post-irradiation en abscisse exprimé en semaine (S) ou mois (M). Moyenne + SD ; CTL n=16-22 rats et IR n=19-26 rats selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher : aucune différence significative n'est observée.

- Splash test

Le *Splash test* permet d'évaluer l'anhédonie et est souvent utilisé pour déterminer le comportement de type dépression chez les rongeurs. Après avoir été aspergé d'une solution sucrée au niveau du bas du dos, chaque rat est laissé dans sa cage d'hébergement pendant 5 min et le pourcentage de temps passé à se toiletter ainsi que la fréquence de toilettage sont relevés.

Chez les animaux contrôles, le temps passé à se toiletter est relativement stable dans le temps, excepté une légère baisse au 3^{ème} mois post-irradiation (**Figure 95 A**) tandis que la fréquence de toilettage est, elle, relativement constante au cours du temps, sauf une légère diminution à 2 mois post-irradiation (**Figure 95 B**). Les rats du groupe IR présentent globalement des profils similaires à ceux du groupe contrôle. Néanmoins, ils passent moins de temps à se toiletter une semaine après irradiation ($p = 0,003$) et semblent également moins le faire 2 mois après irradiation (**Figure 95 A**). De plus, la fréquence de toilettage observée pour le groupe IR semble être inférieure à celle du groupe contrôle lors de la phase précoce

(du 2^{ème} au 4^{ème} mois post-irradiation) même si le seuil de significativité n'est pas atteint (**Figure 95 B**).

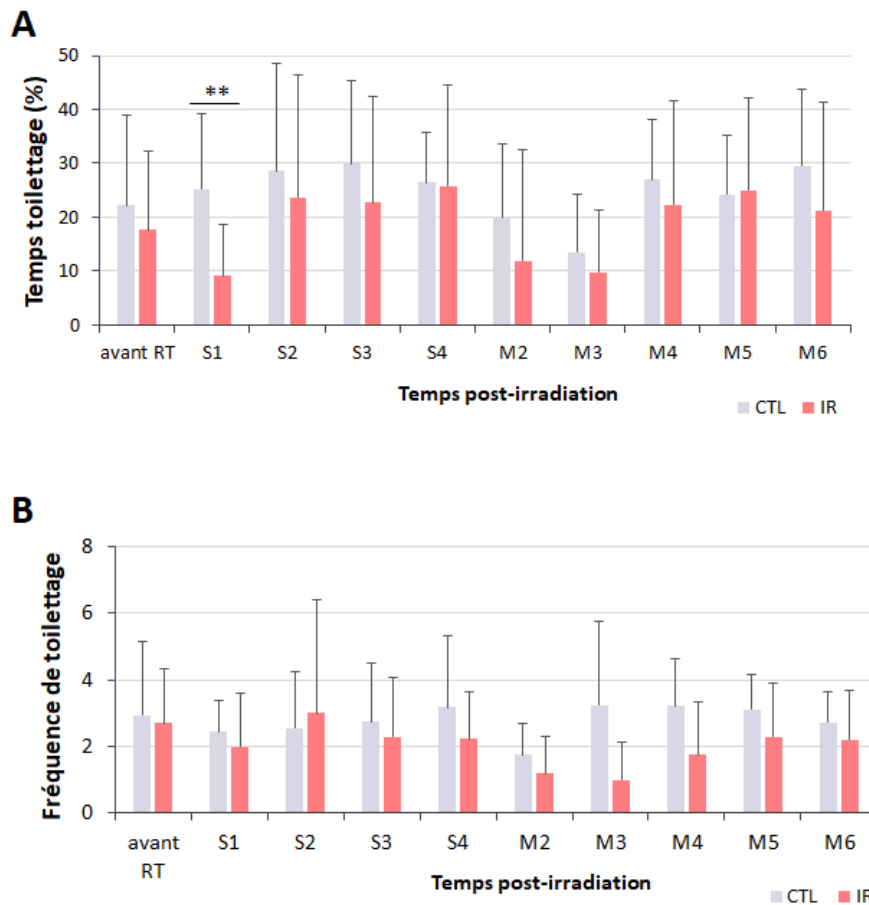


Figure 95 : Evaluation du comportement de type dépression à l'aide du Splash test chez les rats contrôles (CTL) et irradiés (IR). (A) Pourcentage de temps passé à se toiletter. (B) Fréquence de toilettage. Temps post-irradiation en abscisse exprimé en semaine (S) ou mois (M). Moyenne + SD ; CTL n=4-16 rats et IR n= 4-20 rats selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec **p<0,01.

Ces deux paramètres (temps et fréquence de toilettage) mesurés s'accordent donc à dire que les animaux irradiés se toilettent moins lors des phases aiguë et précoce. Ces résultats traduiraient donc un symptôme proche de l'anhédonie avec une perte de motivation et une incapacité à ressentir du plaisir. Néanmoins, excepté lors de la 1^{ère} semaine après irradiation cérébrale, nous ne relevons aucune différence significative entre les deux groupes.

A travers l'étude comportementale des animaux avant et après irradiation, nous avons pu constater des altérations de la mémoire et de la locomotion ainsi qu'une fatigue associée à une détérioration de l'état général. Cela nous permet donc de conclure que notre modèle de radiotoxicité cérébrale chez le rat comporte bien des toxicités neurologiques comme décrites chez les patients, ce qui nous a ensuite permis d'étudier si l'IRM pouvait être une

modalité d'imagerie pertinente pour détecter des atteintes cérébrales sous-jacentes à l'irradiation encéphalique.

III - Recherche de biomarqueurs d'imagerie pour détecter les lésions cérébrales radio-induites

Cette étude vise à définir, parmi les modalités IRM les plus utilisées en routine clinique (anatomique, vasculaire et diffusion), les meilleurs paramètres IRM pour identifier avec précision et temporellement les lésions cérébrales consécutives de l'irradiation dans notre modèle préclinique de radiotoxicité cérébrale développé chez le rat adulte.

III – 1 Etude de la macrostructure cérébrale par IRM anatomique

De 1 semaine à 6 mois post-irradiation, l'observation qualitative des images obtenues en IRM anatomiques montre aucune anomalie majeure du signal pondéré en T2 dans l'ensemble du cerveau. Comme présenté sur la **Figure 96 A**, il n'y a pas d'œdème, pas de nécrose et pas de dilatation ventriculaire visible dans le cerveau des animaux irradiés (IR) et la macrostructure cérébrale semble similaire entre les rats des groupes IR et CTL. Néanmoins, une analyse volumétrique de la totalité du cerveau, nous a permis de mettre en évidence que le volume cérébral des animaux contrôles (CTL) est stable dans le temps alors que celui des animaux irradiés (IR) présente une légère diminution au cours de l'étude. En effet, nous constatons que les rats irradiés présentent une atrophie cérébrale significative à 3 et 6 mois post-irradiation, de 6 et 8% respectivement par comparaison aux rats contrôles (**Figure-96 B**).

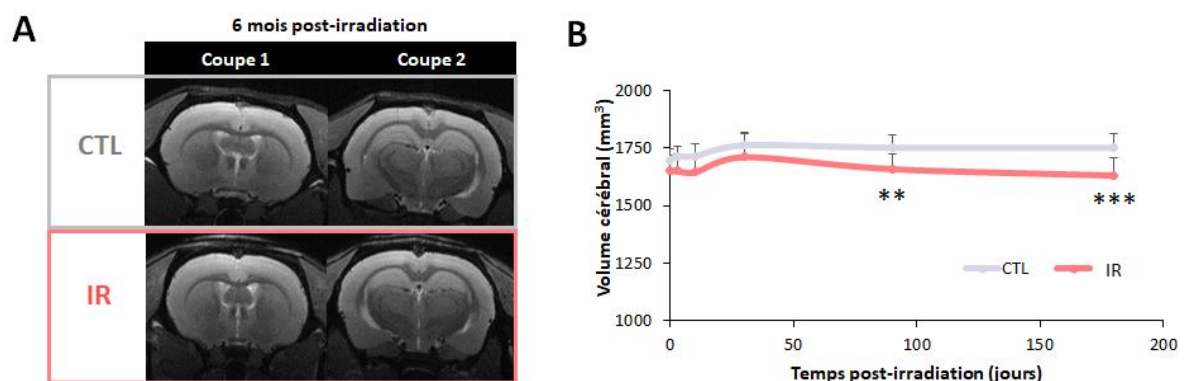


Figure 96 : Effets de l'irradiation sur la macrostructure cérébrale étudiés par IRM anatomique. (A) Images T2w représentatives des rats contrôles (CTL) et irradiés (IR) à 6 mois après irradiation de l'ensemble du cerveau. (B) Quantification

*du volume cérébral à avant irradiation puis 1 semaine, 2 semaines, 1 mois, 3 mois et 6 mois post-irradiation chez des animaux CTL et irradiés (IR). Moyenne + SD ; CTL n=6-11 rats et IR n= 6-9 rats selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec **p<0,01 et ***p<0,0001.*

L'irradiation panencéphalique induit donc une atrophie cérébrale globale. Nous avons donc souhaité approfondir ce résultat en réalisant une analyse des images T2 plus fine qui vise à évaluer les modifications volumiques locales dans le cerveau.

Nous nous sommes alors attachés à évaluer les modifications volumiques locales grâce à une analyse DBM dont la méthodologie détaillée est décrite page 160. Le choix de l'approche par DBM et non de la VBM plus couramment utilisée dans les études précliniques s'explique par le fait que les images obtenues avec les antennes de surface utilisées au laboratoire induisent un gradient de signal sur les images rendant impossible la segmentation de la SB, SG et des ventricules nécessaire à l'étape de normalisation dans l'approche VBM. Brièvement, les changements structuraux sont quantifiés par les déterminants jacobiens (Jd) qui intègrent l'ensemble des déformations lors du recalage rigide et affin. Les valeurs des Jd sont ensuite comparées entre les pixels des groupes contrôle (CTL) et irradié (IR) par des tests t dont le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,01$. Les pixels significatifs sont identifiés par un code couleur (rouge ou bleu) et sont reportés sur les images T2w (**Figure 97 A**). Si la déformation du pixel correspond à une dilatation lors du recalage, le pixel chez le groupe IR avait donc une taille plus petite que le même pixel chez le groupe CTL. Le pixel significatif apparaît alors en bleu sur les cartes de t et représente une atrophie de la structure cérébrale concernée (**Figure 97 A**). En revanche, si la déformation du pixel correspond à une contraction lors du recalage, alors le pixel chez le groupe IR est de plus grande taille que le même pixel observé chez le groupe CTL. Ce pixel significatif apparaît alors en rouge sur les cartes de t et représente une extension de la structure cérébrale (**Figure 97 A**).

Ainsi, les cartes t présentées dans la **Figure 97 A** montrent l'apparition de clusters bleus, surtout 1 mois après irradiation mais également de nombreux clusters rouges visibles à 3 et 6 mois après irradiation. Toutefois, cette représentation des résultats permet seulement de voir certains plans de coupe du cerveau. Pour avoir une meilleure interprétation de ces différences significatives des déformations locales des pixels entre les groupes IR et CTL, nous avons alors quantifié le nombre de pixels rouges et bleus sur l'ensemble du cerveau (**Figure 97 B**). Ainsi, nous avons pu mesurer le volume total de pixels bleus ou rouges significatifs rapporté au volume du cerveau de référence (*Template*) à travers le temps après irradiation.

Nous constatons que les temps 1 mois et 6 mois post-irradiation semblent être des moments clefs du point de vue des modifications anatomiques locales induites par l'irradiation cérébrale. En effet, 1 mois après irradiation, le nombre de pixels bleus est augmenté par rapport aux autres temps d'étude. En revanche, à 3 et 6 mois après irradiation, nous observons une augmentation progressive du nombre de pixels rouges par rapport aux autres temps post-irradiation indiquant alors une dilatation des structures cérébrales (**Figure 97 B**).

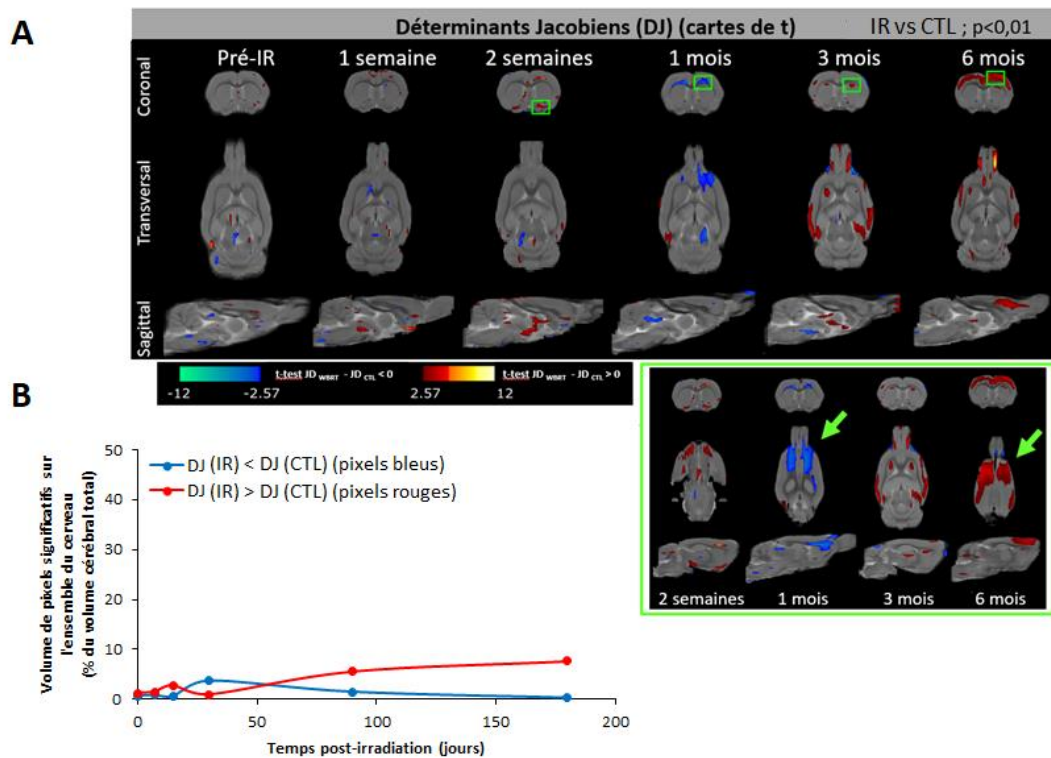


Figure 97 : Etude des modifications structurales locales induites par l'irradiation cérébrale par analyse DBM (déformation based-morphometry). (A) Cartes de t représentant les pixels significativement différents entre les rats irradiés (IR) et contrôles (CTL) à différents temps de l'étude (pré-irradiation, 1 semaine, 2 semaines, 1 mois, 3 mois et 6 mois post-irradiation). Les tests t avec un seuil de significativité fixé à $p < 0,01$ comparent les valeurs des déterminants jacobiens (DJ) pour chaque pixel entre les groupes CTL et IR. Pixel bleu = atrophie structurale ; pixel rouge = extension structurale. Les carrés verts ciblent des structures d'intérêt mieux visibles sur les coupes présentées en dessous. (B) Suivi temporel du volume total de pixels significatifs sur l'ensemble du cerveau comparant les groupes IR et CTL. La courbe rouge correspond au volume total des pixels rouges indiquant que les valeurs des déterminants jacobiens (DJ) ont des valeurs supérieures aux DJ des animaux CTL. La courbe bleue correspond au volume total des pixels bleus mentionnant que les valeurs des DJ ont des valeurs inférieures aux DJ des animaux CTL. Nombre de rats ayant permis de réaliser l'analyse DBM : N=6 rats/groupe/temps.

Pour aller plus loin dans l'interprétation des résultats obtenus par l'analyse DBM, l'ensemble des clusters bleus (observés à 1 mois) et des clusters rouges (observés à 6 mois) ont été extraits sous forme de masques qui ont alors été recalés et superposés sur un atlas labellisé spécifique du rat Wistar (obtenu auprès du laboratoire COMETE, UMR-S 1075 qui a réalisé cet atlas). Nous avons alors pu mettre en évidence que le corps calleux est la région cérébrale la plus affectée 1 mois après irradiation (atrophie) alors qu'à 6 mois après irradiation

c'est le cortex frontal qui apparaît comme la structure la plus impactée par l'irradiation cérébrale (**Figure 98**). Ces données obtenues par DBM suggèrent donc que le corps calleux et le cortex frontal sont les structures les plus radiosensibles dans ce modèle animal de radiotoxicité cérébrale.

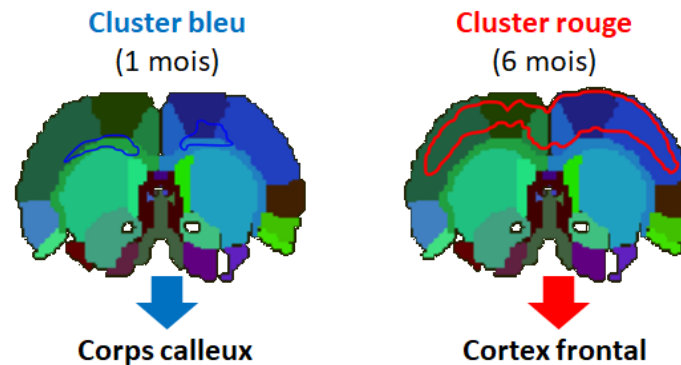


Figure 98 : Recalage des pixels significatifs bleus ou rouges obtenus sur les cartes de t , issues des données des déterminants jacobiens (analyse DBM), sur un atlas labellisé spécifique du rat Wistar. Le corps calleux apparaît comme la région cérébrale la plus affectée 1 mois après irradiation (atrophie) alors qu'à 6 mois c'est le cortex frontal qui le plus impacté par l'irradiation cérébrale.

Dans la suite de mes travaux de thèse, nous nous sommes attachés à déterminer si ces modifications de la macrostructure cérébrale après irradiation pouvaient être liées à des perturbations de l'organisation de l'architecture cellulaire du cerveau et de son fonctionnement. Nous avons donc évalué d'une part, la vascularisation cérébrale par IRM vasculaire et d'autre part, la microstructure cellulaire et la connectivité cérébrale par IRM de diffusion.

III – 2 Etude de la vascularisation cérébrale par IRM vasculaire

L'impact de l'irradiation sur la vascularisation cérébrale a tout d'abord été étudié par IRM vasculaire avec injection d'un agent de contraste (P904). Cette modalité d'imagerie a permis d'obtenir des cartes quantitatives du volume sanguin cérébral (VSC) chez les rats contrôles (CTL) et irradiés (IR) (**Figure 99**).

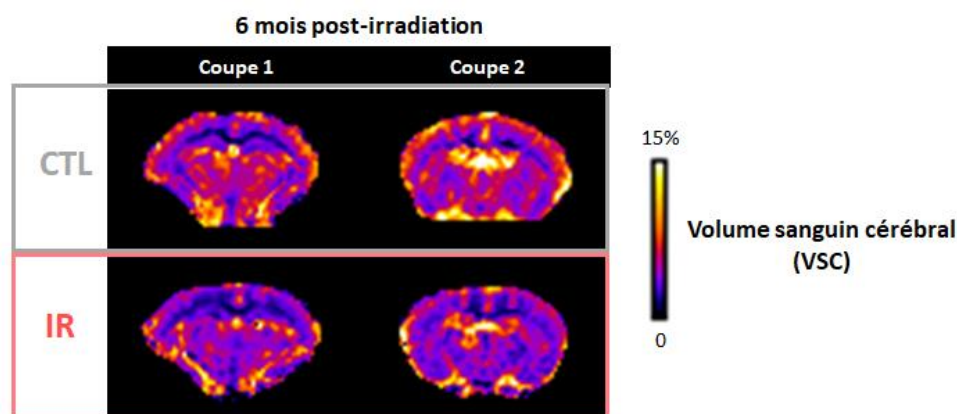


Figure 99 : Cartes du volume sanguin cérébral obtenues par IRM vasculaire avec injection d'un agent de contraste (P904) chez les groupes de rats contrôles (CTL) et irradiés (IR) à 6 mois après irradiation du cerveau entier.

L'analyse des cartes de VSC a été réalisée par 2 approches complémentaires qui sont détaillées dans la partie Matériels et Méthodes (page 165) :

- une analyse globale du cerveau qui est non-supervisée/sans *a priori*. Après recalage des cartes de VSC sur un cerveau de référence (*template*), une analyse statistique pixel-à-pixel (test t) entre les rats contrôles et irradiés est effectuée.

- une analyse par région d'intérêt (ROI) dont le choix des structures cérébrales est orienté par l'expérimentateur. Les valeurs moyennes du VSC pour chaque ROI sont obtenues et une analyse statistique (ANOVA) comparant les valeurs moyennes entre les rats des groupes contrôle et irradié est réalisée.

Tout d'abord, par analyse globale du cerveau, des cartes statistiques de t du VSC ont été obtenues (**Figure 100 A**). Les pixels significatifs sont alors identifiés par un code couleur (rouge ou bleu) et superposés sur le *Template*. Lorsque la valeur du VSC des rats irradiés est significativement inférieure à celle des rats contrôles, les pixels sont bleus. A contrario, lorsque la valeur du VSC des rats irradiés est significativement supérieure à celle des rats contrôles, les pixels sont rouges. Nous observons de nombreux clusters bleus 6 mois après irradiation (**Figure 100 A**). De plus, les courbes du volume total des pixels significatifs sur l'ensemble du cerveau montrent une très nette augmentation du nombre de pixels bleus 6 mois post-

irradiation alors que celui des pixels rouges est faible et stable tout au long de l'étude (**Figure 100 B**).

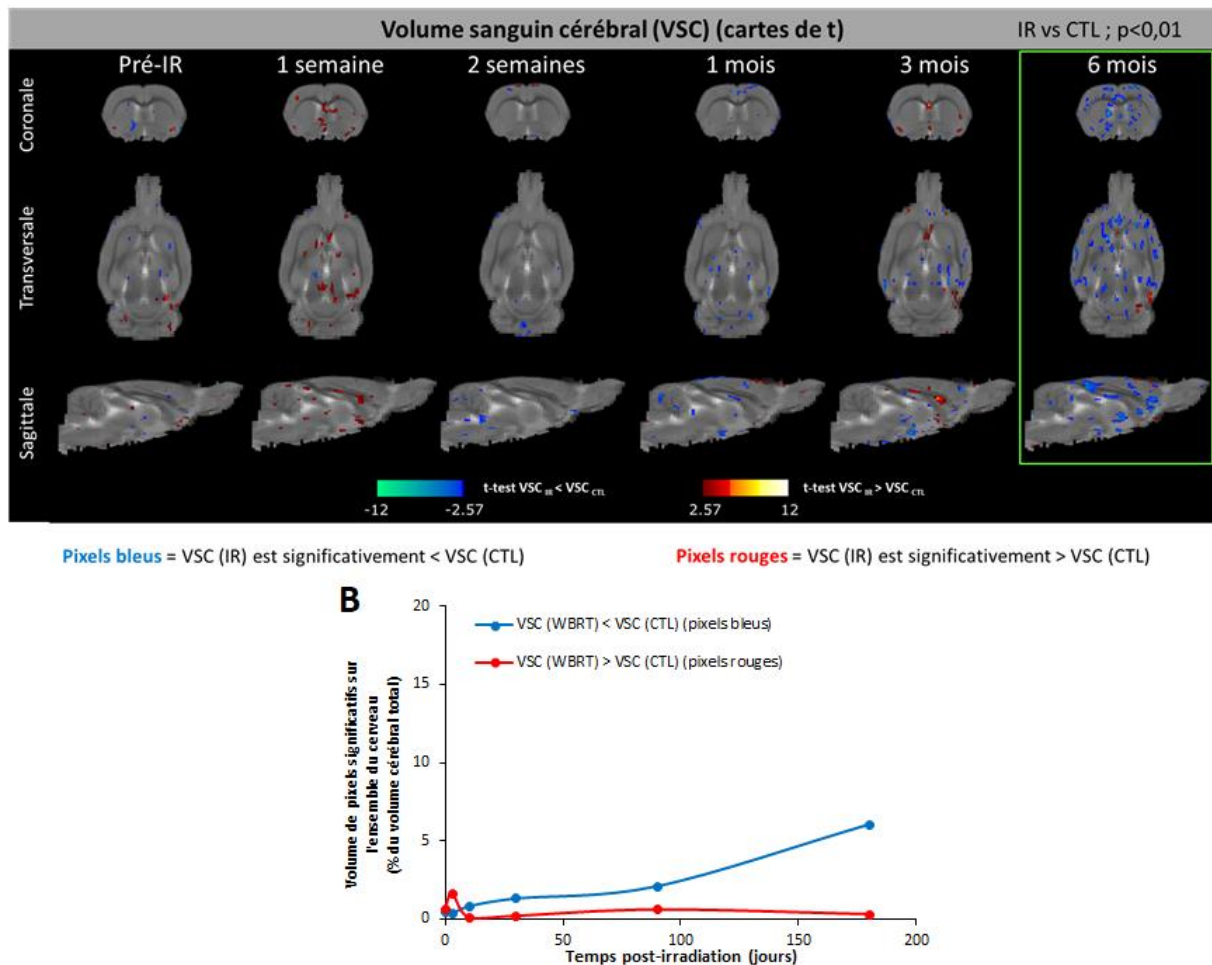


Figure 100 : Analyse statistique pixel-à-pixel sur l'ensemble du cerveau des variations de volume sanguin cérébral (VSC) après irradiation cérébrale. (A) Cartes de t représentant les pixels significativement différents entre les rats irradiés (IR) et les rats contrôles (CTL) à différents temps de l'étude (pré-irradiation, 1 semaine, 2 semaines, 1 mois, 3 mois et 6 mois post-irradiation). Les tests t avec un seuil de significativité fixé à $p < 0,01$ comparent les valeurs de VSC pour chaque pixel entre les groupes CTL et IR. Pixel bleu = VSC diminué chez les rats IR par rapport aux rats CTL ; pixel rouge = VSC augmenté chez les rats IR par rapport aux rats CTL. Le rectangle vert indique le temps post-irradiation pour lequel les effets statistiques sont les plus importants. (B) Suivi temporel du volume total de pixels significatifs (bleus ou rouges) sur l'ensemble du cerveau. $N = 6$ rats/groupe/temps.

Cette étude réalisée par une approche statistique globale du cerveau nous montre donc que l'irradiation cérébrale induit une diminution du VSC dans le cerveau des animaux irradiés 6 mois après irradiation.

En parallèle, nous avons également évalué les variations du VSC au niveau de structures cérébrales déterminées en réalisant une analyse par ROI. Nous observons alors une diminution significative du VSC chez les rats irradiés par rapport aux rats contrôles dans l'ensemble des structures cérébrales étudiées d'intérêt (cortex, hippocampe, thalamus, striatum et corps calleux) à 6 mois post-irradiation encéphalique (**Figure 101**). Il peut aussi

être noté que le VSC est significativement inférieur dans le groupe IR vis-à-vis du groupe CTL dans l'hippocampe et le thalamus dès 3 mois post-irradiation (**Figure 101**).

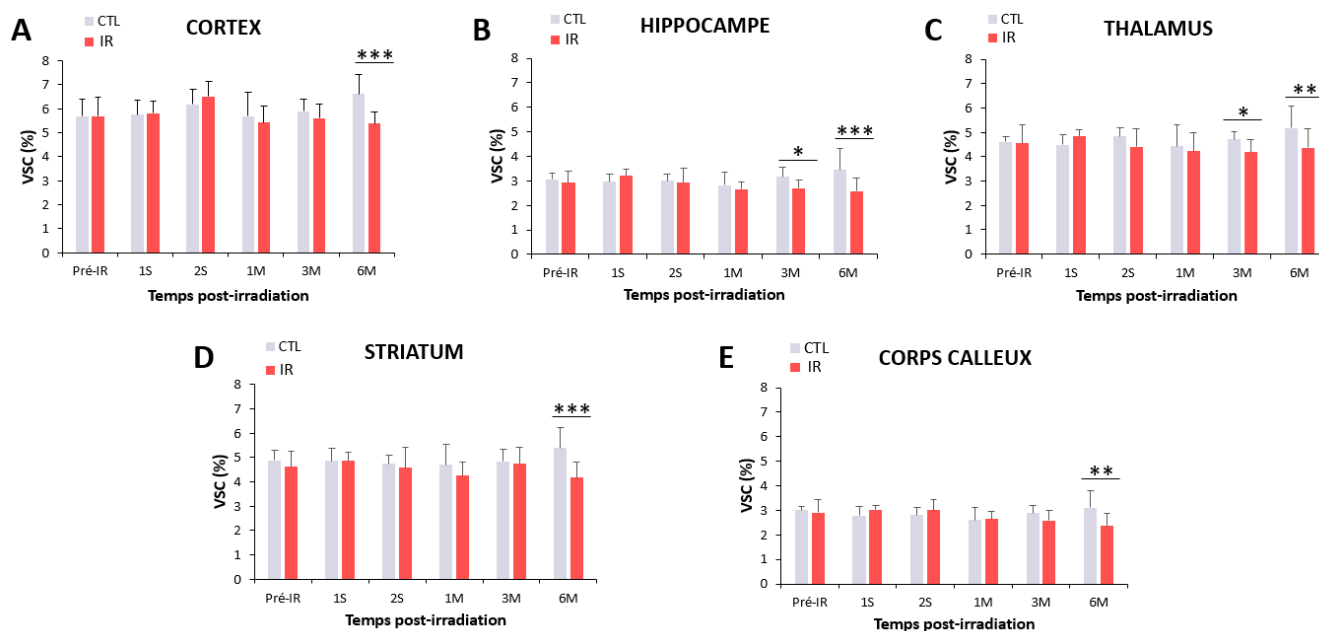


Figure 101 : Analyse par régions d'intérêt des effets de l'irradiation sur le volume sanguin cérébral (VSC) mesuré par IRM vasculaire. Evolution temporelle des valeurs de VSC chez les rats contrôles (CTL) et les rats irradiés (IR) dans différentes structures cérébrales : (A) cortex, (B) hippocampe, (C) thalamus, (D) striatum et (E) corps calleux. Moyenne + SD ; N = 6 rats/groupe/temps. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,0001$.

Cette étude de la vascularisation cérébrale par IRM nous indique donc que l'irradiation cérébrale induit une diminution globale du VSC de façon tardive (6 mois). De manière intéressante, le VSC est modifié plus précocement, dès le 3^{ème} mois après irradiation, au niveau de l'hippocampe et du thalamus.

Afin de mieux définir ces dommages vasculaires radio-induits, nous avons réalisé une étude en immunohistologie en marquant les vaisseaux sanguins avec un anticorps anti-collagène IV (protéine spécifique de la membrane basale des vaisseaux). Nous pouvons alors observer sur les images obtenues en microscopie par fluorescence des modifications morphologiques des vaisseaux sanguins essentiellement 1 semaine et 6 mois après irradiation (**Figures 102 A, 103 A, 104 A**). Globalement, les vaisseaux sanguins chez les rats irradiés semblent moins nombreux et leur structure tubulaire moins bien définie par rapport à ceux des rats contrôles.

L'analyse quantitative des vaisseaux, réalisée à partir des images de l'immunomarquage anti-collagène IV, au niveau de l'hippocampe montre en effet une

diminution significative de la surface vasculaire ($p<0,05$) accompagnée d'une réduction du diamètre des vaisseaux ($p<0,01$) 6 mois après irradiation (**Figures 102 B, D**). La diminution du diamètre des vaisseaux se retrouve également 1 semaine après irradiation (**Figure 102 D**). En revanche, nous n'observons aucune atteinte de la longueur des vaisseaux sanguins hippocampiques quel que soit le temps étudié (**Figure 102 C**).

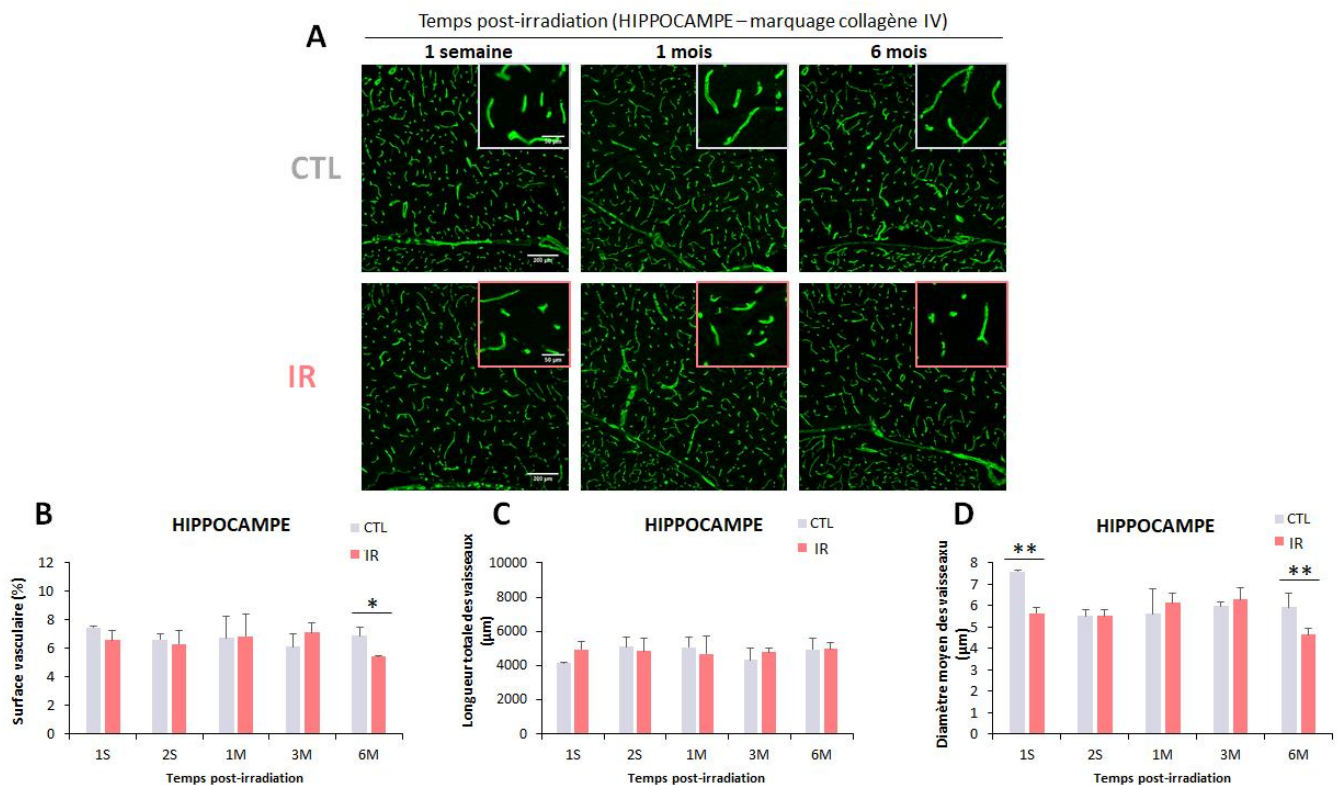


Figure 102 : Analyse immunohistologique des vaisseaux sanguins dans l'hippocampe des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR). (A) Images représentatives des immunomarquages réalisés avec un anticorps anti-collagène IV (en vert) révélant les vaisseaux sanguins dans l'hippocampe des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR) observés à 1 semaine, 1 mois et 6 mois après irradiation. Acquisition par microscopie à fluorescence avec un objectif 10X ; barre d'échelle = 200 μm (image entière) et 50 μm (image zoomée). (B) Quantification de la surface vasculaire (%). (C) Quantification de la longueur totale des vaisseaux (μm). (D) Quantification du diamètre moyen des vaisseaux (μm). Moyenne + SD ; N= 3 rats/groupe/temps avec 2 photos pour chaque condition. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p<0,05$ et ** $p<0,01$.

L'analyse des vaisseaux sanguins au niveau du cortex et du striatum ne montre aucune différence significative entre les groupes CTL et IR (**Figures 103, 104**). Pour le cortex, l'analyse quantitative nous indique en effet que la surface vasculaire chez les rats irradiés semble diminuée ($p=0,08$) et que les vaisseaux sanguins sont plus courts ($p=0,12$) que ceux observés chez les rats contrôles (CTL) à 6 mois post-irradiation. De plus, les vaisseaux sanguins corticaux semblent également être impactés par l'irradiation en phase aiguë (1 semaine post-irradiation), sans que le seuil de significativité statistique entre les deux groupes ne soit atteint (**Figure 103 B, C**). De même pour le diamètre moyen de ces vaisseaux qui semble être plus

petit chez les rats irradiés par rapport aux rats contrôles ($p=0,13$) lors de la 1^{ère} semaine après irradiation (**Figure 103 D**). Pour le striatum, l'analyse de la vascularisation par immunomarquage anti-collagène IV ne révèle aucune différence entre les rats irradiés et contrôles au cours du temps (**Figure 104**).

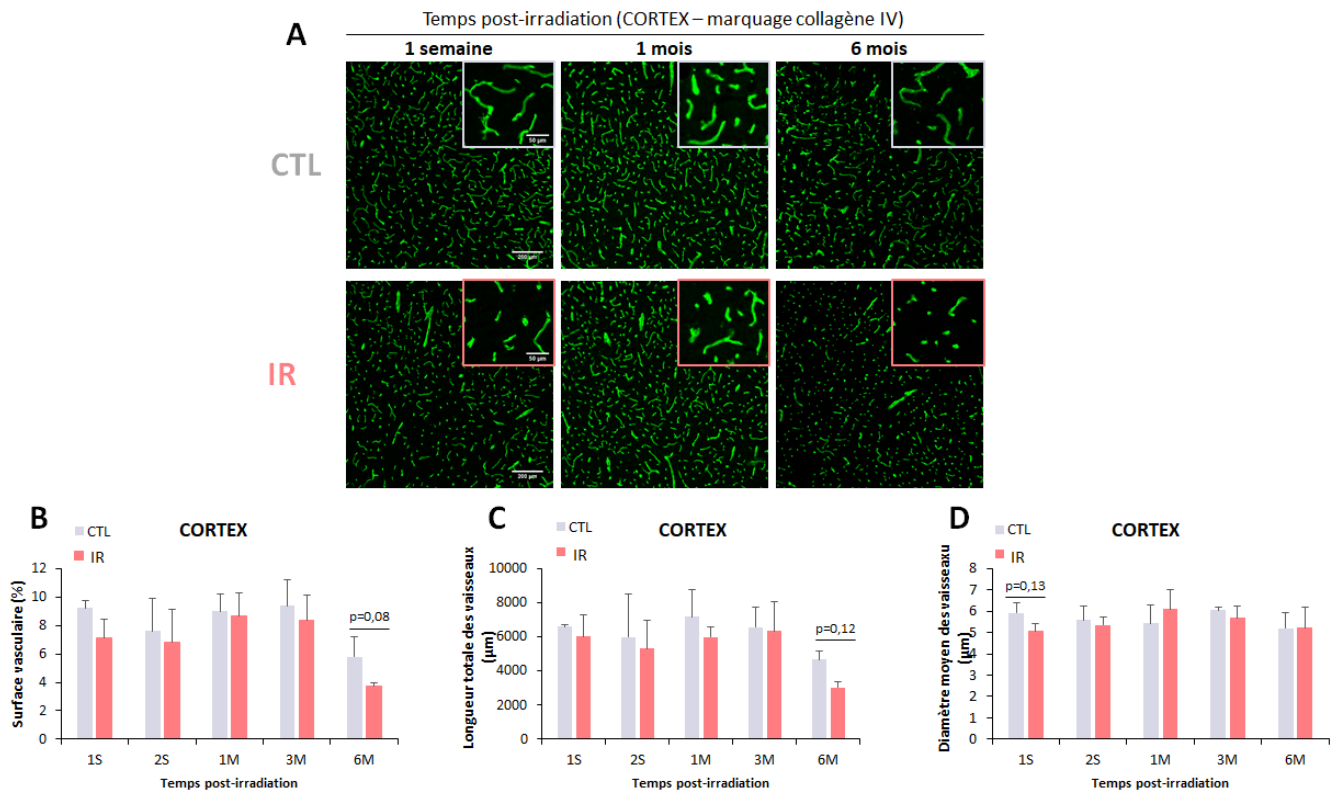


Figure 103 : Analyse immunohistologique des vaisseaux sanguins dans le cortex des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR). (A) Images représentatives des immunomarquages réalisés avec un anticorps anti-collagène IV (en vert) révélant les vaisseaux sanguins dans le cortex des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR) observés à 1 semaine, 1 mois et 6 mois après irradiation. Acquisition par microscopie à fluorescence avec un objectif 10X ; barre d'échelle = 200 μm (image entière) et 50 μm (image zoomée). (B) Quantification de la surface vasculaire (%). (C) Quantification de la longueur totale des vaisseaux (μm). (D) Quantification du diamètre moyen des vaisseaux (μm). Moyenne + SD ; N= 3 rats/groupe/temps avec 2 photos pour chaque condition. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher.

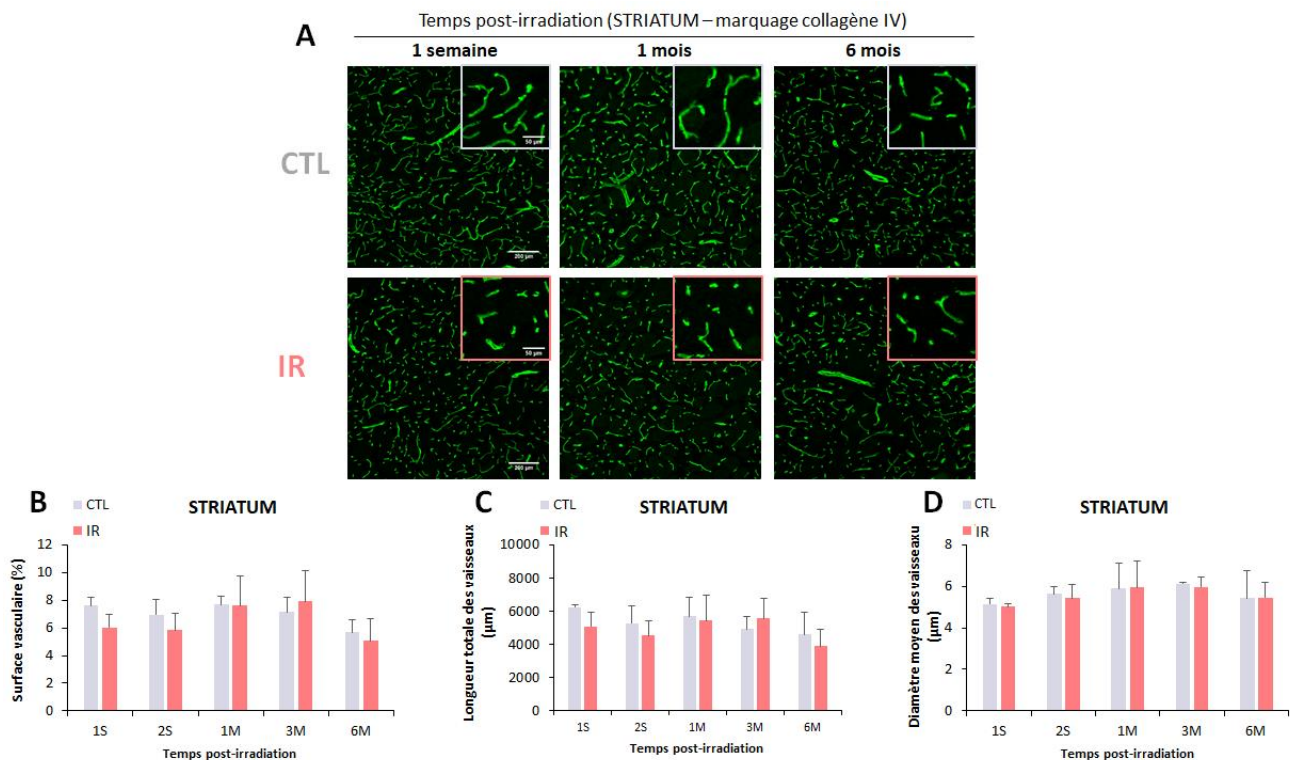


Figure 104 : Analyse immunohistologique des vaisseaux sanguins dans le striatum des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR). (A) Images représentatives des immunomarquages réalisés avec un anticorps anti-collagène IV (en vert) révélant les vaisseaux sanguins dans le striatum des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR) observés à 1 semaine, 1 mois et 6 mois après irradiation. Acquisition par microscopie à fluorescence avec un objectif 10X ; barre d'échelle = 200 μm (image entière) et 50 μm (image zoomée). (B) Quantification de la surface vasculaire (%). (C) Quantification de la longueur totale des vaisseaux (μm). (D) Quantification du diamètre moyen des vaisseaux (μm). Moyenne + SD ; N= 3 rats/groupe/temps avec 2 photos pour chaque condition. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher.

III – 3 Etude de microstructure cérébrale par IRM de diffusion

Afin d'évaluer les effets de l'irradiation sur la microarchitecture cérébrale, nous nous sommes appuyés sur l'imagerie de diffusion et avons extrait différents paramètres quantitatifs : la diffusivité moyenne (MD) (**Figure 105 A**), la diffusivité axiale (AD) (**Figure 105 B**), la diffusivité radiale (RD) (**Figure 105 C**) et la fraction d'anisotropie (FA) (**Figure 105 D**). La définition de ces paramètres de diffusion et la méthodologie pour les obtenir est détaillée dans la partie Matériels et Méthodes (pages 163-165). Quant à leurs interprétations biologiques, elles sont mentionnées dans la partie Introduction (pages 116-118). Les valeurs de ces différents paramètres de diffusion ont été obtenus à la fois chez des animaux contrôles et des animaux irradiés à différents temps, à savoir avant irradiation puis 1 semaine, 2 semaines, 1 mois, 3 mois et 6 mois post-irradiation. Comme pour l'étude du VSC par IRM présentée précédemment, l'analyse des cartes de MD, AD, RD et FA a été réalisée par 2 approches complémentaires : une analyse globale du cerveau et une analyse par ROI.

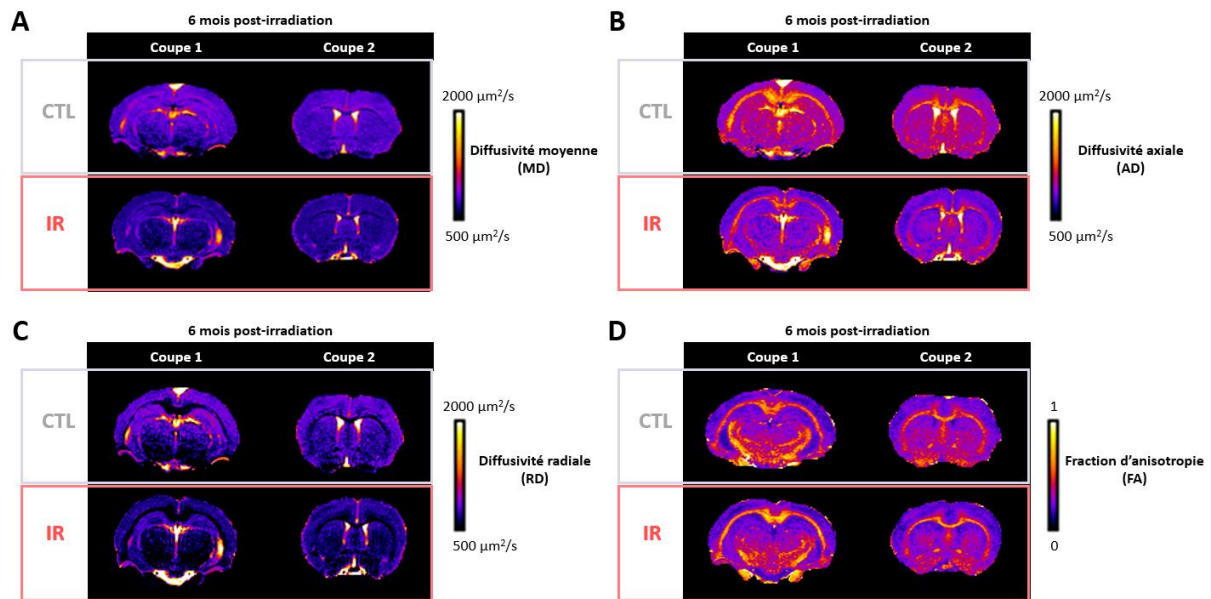


Figure 105 : Cartes paramétriques obtenues par IRM de diffusion et représentatives des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR) à 6 mois après irradiation encéphalique. **(A)** Diffusivité moyenne (MD) ; **(B)** Diffusivité axiale (AD) ; **(C)** Diffusivité radiale (RD) ; **(D)** fraction d'anisotropie (FA).

- **La diffusivité moyenne (MD)**

Pour rappel, le paramètre MD reflète la vitesse de diffusion moyenne des molécules d'eau dans les différentes directions de l'espace. Ce paramètre est souvent considéré dans les études comme un indicateur de la cellularité (densité cellulaire et volume cellulaire) puisque ce paramètre est très sensible aux modifications intra- ou extracellulaire qui peuvent entraver le déplacement des molécules d'eau dans un tissu (Le Bihan & Lima, 2015).

Tout d'abord, la comparaison des valeurs de ce paramètre entre les rats contrôles et irradiés a été réalisée par une analyse globale en réalisant une analyse statistique pixel-à-pixel. Les cartes statistiques obtenues par cette approche sans a priori pour le paramètre MD sont présentées dans la **Figure 106**. Ainsi, lorsque les valeurs de MD dans le cerveau des rats irradiés sont significativement inférieures à celles mesurées chez les rats contrôles, les pixels apparaissent en bleu. En revanche, si les valeurs de MD mesurées chez les animaux irradiés sont supérieures à celles des animaux contrôles alors les pixels s'affichent en rouge. Nous observons alors la présence de clusters rouges dans différentes régions du cerveau deux semaines après irradiation et de très nombreux clusters bleus un mois après irradiation (**Figure-106 A**). Nous pouvons en déduire que les valeurs de MD chez les animaux irradiés sont significativement supérieures à celles des animaux contrôles 2 semaines post-irradiation mais significativement inférieures 1 mois après irradiation. De plus, la quantification du volume

total des pixels significatifs sur l'ensemble du cerveau, présentée dans la **Figure 106 B**, illustre bien les changements significatifs du paramètre MD survenant au cours du temps. Une élévation importante du nombre de pixels bleus, observable sur les courbes sous forme d'un grand pic, est mise en évidence au temps 1 mois post-irradiation et un pic plus modéré de pixels rouges deux semaines plus tôt (**Figure-106 B**).

Cette étude réalisée par une approche statistique globale du cerveau nous montre donc que l'irradiation cérébrale induit une augmentation de MD 2 semaines après irradiation et, *a contrario*, une diminution de MD 1 mois post-irradiation qui est un effet majeur puisqu'il concerne environ 40% du volume cérébral.

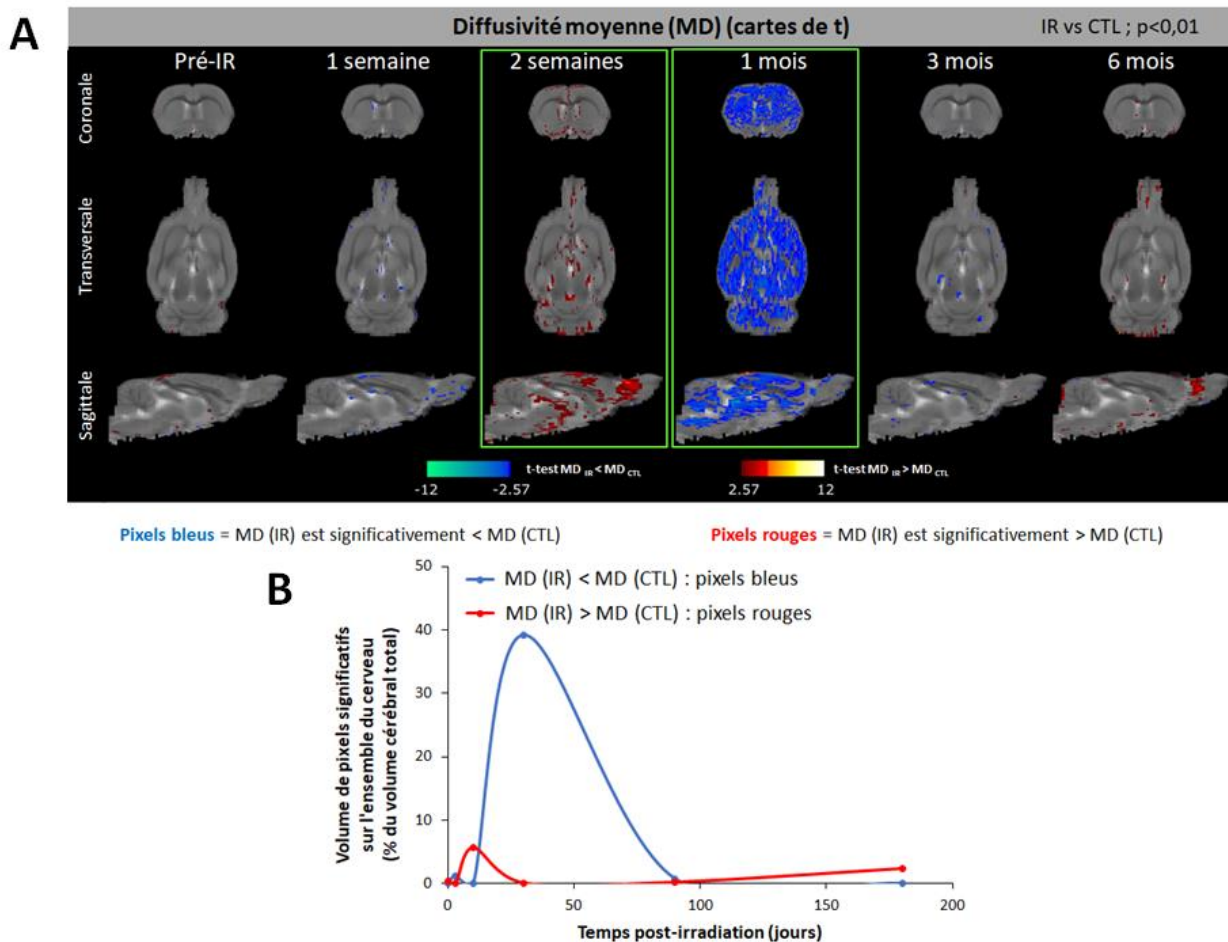


Figure 106 : Analyse statistique pixel-à-pixel sur l'ensemble du cerveau des variations de diffusivité moyenne (MD) après irradiation cérébrale. **(A)** Cartes de t représentant les pixels significativement différents entre les rats irradiés (IR) et les rats contrôles (CTL) à différents temps de l'étude (pré-irradiation, 1 semaine, 2 semaines, 1 mois, 3 mois et 6 mois post-irradiation). Les tests t avec un seuil de significativité fixé à $p < 0,01$ comparent les valeurs de MD pour chaque pixel entre les groupes CTL et IR. Pixel bleu = MD diminué chez les rats IR par rapport aux rats CTL ; pixel rouge = MD augmenté chez les rats IR par rapport aux rats CTL. Le rectangle vert indique le temps post-irradiation pour lequel les effets statistiques sont les plus importants. **(B)** Suivi temporel du volume total de pixels significatifs (bleus ou rouges) sur l'ensemble du cerveau. $N = 6$ rats/groupe/temps.

En parallèle, nous avons évalué les variations de MD au niveau de structures cérébrales déterminées en réalisant une analyse par ROI. Cette analyse nous a permis de conforter les résultats observés avec l'approche globale. En effet, une augmentation de la MD deux semaines après irradiation et une diminution de ce paramètre 1 mois après irradiation sont retrouvées dans l'ensemble des structures cérébrales étudiées que sont le cortex (**Figure 107 A**), l'hippocampe (**Figure 107 B**), le thalamus (**Figure 107 C**), le striatum (**Figure 107 D**), le corps calleux (**Figure 107 E**).

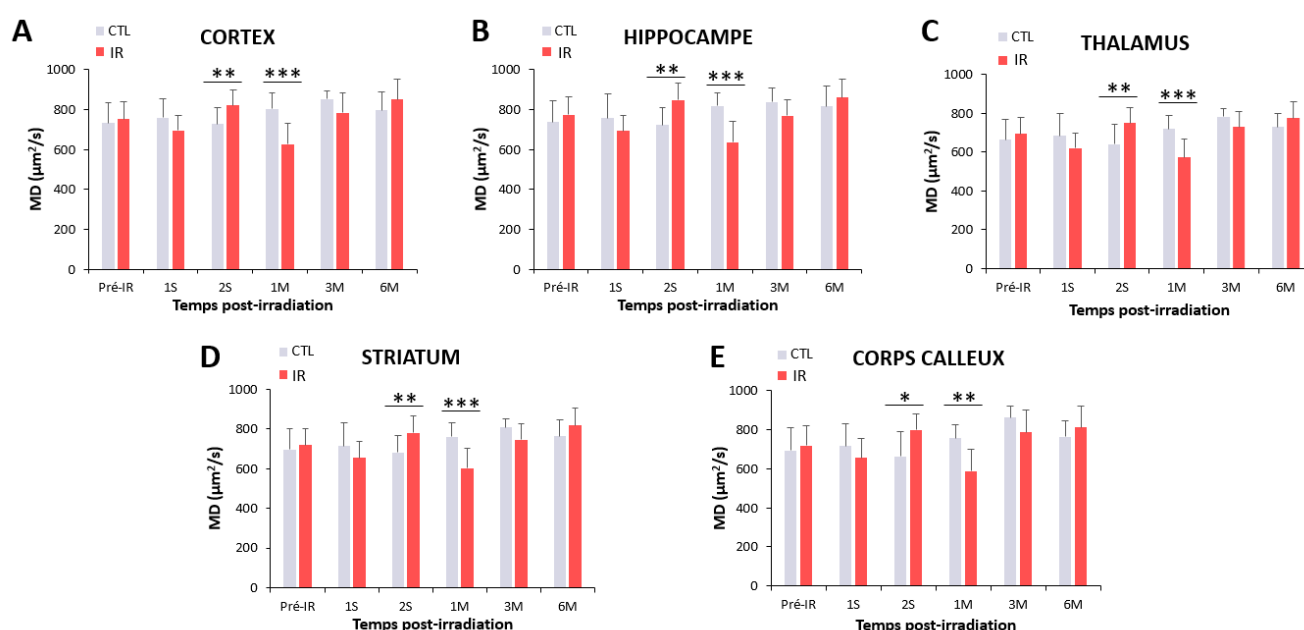


Figure 107 : Analyse par régions d'intérêt des effets de l'irradiation sur la diffusivité moyenne (MD) mesurée par IRM de diffusion. Evolution temporelle des valeurs de MD chez les rats contrôles (CTL) et les rats irradiés (IR) dans différentes structures cérébrales : (A) cortex, (B) hippocampe, (C) thalamus, (D) striatum et (E) corps calleux. Moyenne + SD ; N = 6 rats/groupe/temps. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,0001$.

La MD traduit la diffusion des molécules d'eau dans le tissu. Ainsi, si la densité cellulaire augmente, la valeur de MD diminue. A *contrario*, si la densité cellulaire diminue, la MD augmente. Les résultats obtenus pour le paramètre MD issu de l'IRM de diffusion laissent supposer que l'irradiation induit une diminution de la densité cellulaire lors de la phase aiguë (2 semaines après irradiation) suivie d'une augmentation de celle-ci en phase précoce (1 mois après irradiation). Nous pouvons alors proposer que cette diminution de la densité cellulaire, observée rapidement après irradiation encéphalique, soit due aux effets directs des rayonnements ionisants sur les cellules du tissu cérébral. En revanche, l'augmentation de la densité cellulaire observée un mois après exposition pourrait s'expliquer par la présence des cellules activées suite aux lésions radio-induites telles que la microglie et les astrocytes.

C'est pourquoi nous avons complété cette analyse IRM par une étude immunohistologique afin de visualiser et quantifier la réponse astrocytaire dans les différentes régions d'intérêt qui est souvent présente dans l'initiation de la neuroinflammation. Pour ce faire, des immunomarquages avec un anticorps anti-GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), permettant de visualiser les astrocytes activés, ont été réalisés sur les coupes de cerveaux de rats CTL et IR prélevés à tous les temps étudiés après irradiation. Comme observé sur les images obtenues en microscopie de fluorescence, les immunomarquages anti-GFAP dans le cortex (**Figure 108 A**), l'hippocampe (**Figure 109 A**) et le striatum (**Figure 110 A**) témoignent que l'irradiation cérébrale induit une activation astrocytaire visible par un marquage plus intense et surtout une morphologie plus étoilée chez les rats IR par comparaison des images obtenues chez les rats CTL. A partir de ces images, nous avons quantifié la surface astrocytaire. Les données obtenues nous montrent une importante augmentation significative de la surface astrocytaire dans le cortex des rats irradiés à 2 semaines ($p<0,01$) et 1 mois post-irradiation ($p<0,01$) et qui semble se maintenir jusqu'à 3 mois post-irradiation ($p=0,07$) (**Figure 108 B**).

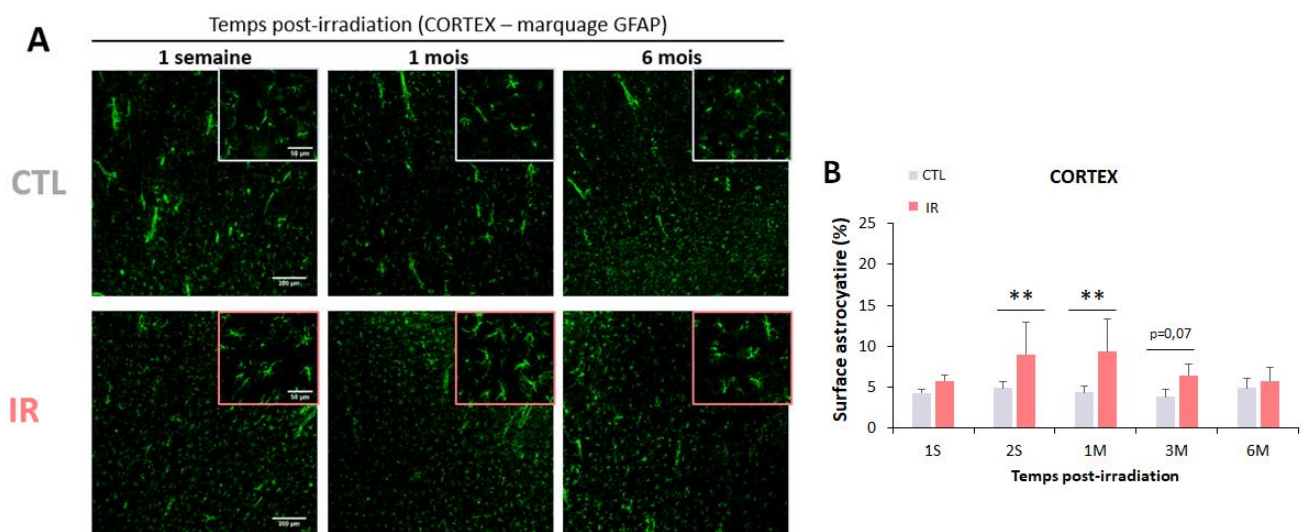


Figure 108 : Analyse immunohistologique de la réponse astrocytaire dans le cortex des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR). (A) Images représentatives des immunomarquages réalisés avec un anticorps anti-GFAP (en vert) révélant les astrocytes activés dans le cortex des rats contrôles (CTL) et irradiés (IR) observés à 1 semaine, 1 mois et 6 mois après irradiation. Acquisition par microscopie à fluorescence avec un objectif 10X ; barre d'échelle = 200 μ m (image entière) et 50 μ m (image zoomée). (B) Quantification de la surface astrocytaire (%). Moyenne $\pm$ SD ; N = 3 rats/groupe/temps avec 2 photos par chaque condition. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher. ** $p < 0,01$.

Des résultats similaires ont été observés au niveau de l'hippocampe : une augmentation de la réponse astrocytaire est identifiée chez les rats du groupe IR à 2 semaines ($p<0,01$) et 1 mois ($p<0,05$) après irradiation du cerveau entier (**Figure 109 B**).

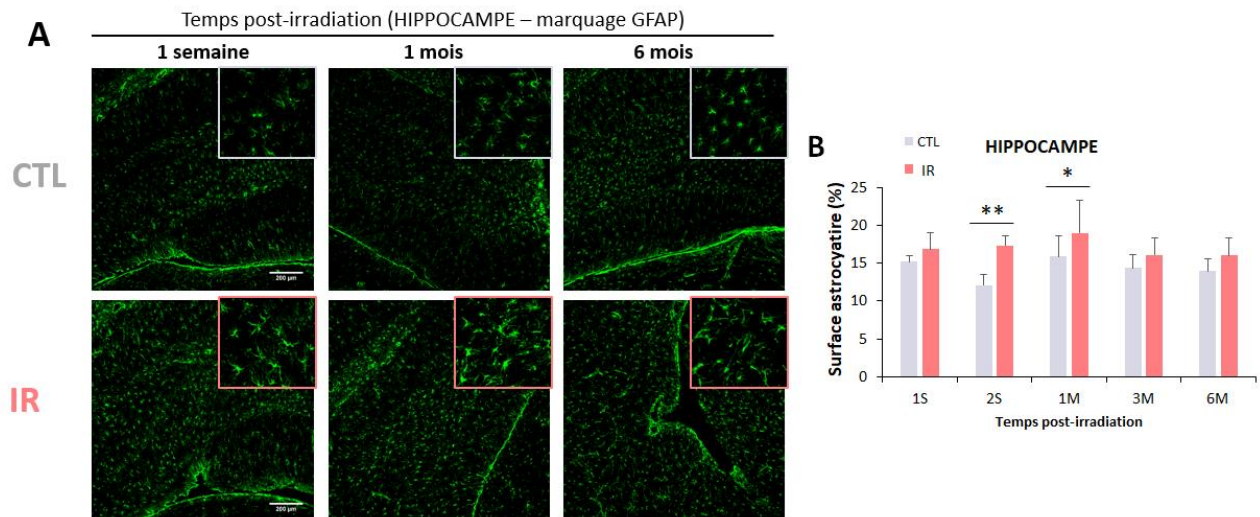


Figure 109 : Analyse immunohistologique de la réponse astrocytaire dans l'hippocampe des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR). (A) Images représentatives des immunomarquages réalisés avec un anticorps anti-GFAP (en vert) révélant les astrocytes activés dans l'hippocampe des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR) observés à 1 semaine, 1 mois et 6 mois après irradiation. Acquisition par microscopie à fluorescence avec un objectif 10X ; barre d'échelle = 200 μ m (image entière) et 50 μ m (image zoomée). (B) Quantification de la surface astrocytaire (%). Moyenne + SD ; N= 3 rats/groupe/temps avec 2 photos pour chaque condition. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher.

En revanche, au niveau du striatum, nous observons également une augmentation de la réponse astrocytaire chez les animaux irradiés mais celle-ci est plus tardive et se maintient dans le temps. En effet, la surface astrocytaire est significativement supérieure dans le striatum des rats irradiés par rapport aux animaux contrôles à 1, 3 et 6 mois (**Figure 110**).

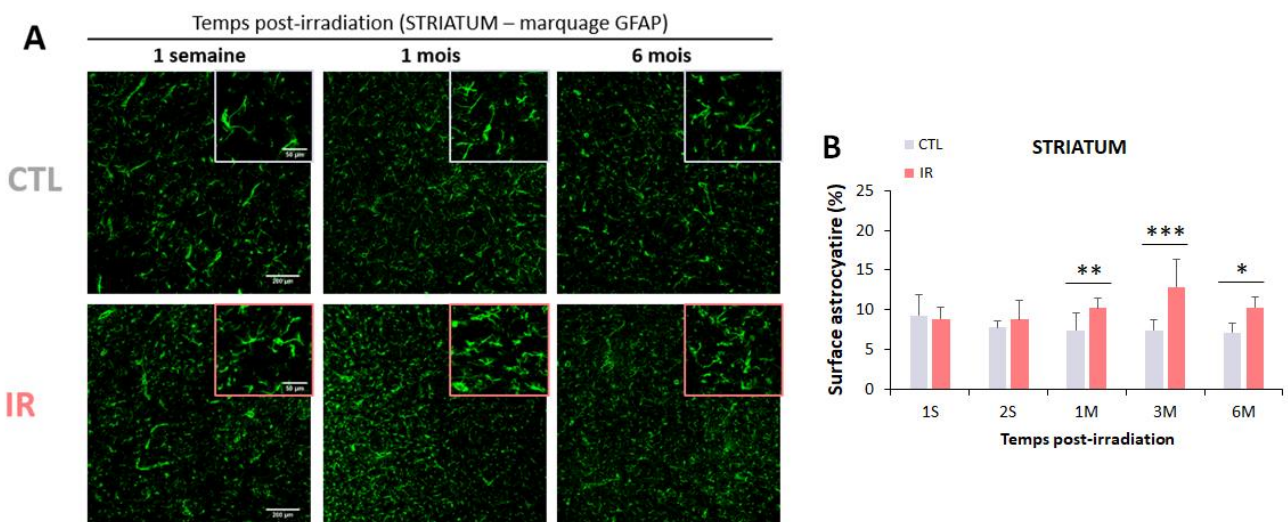


Figure 110 : Analyse immunohistologique de la réponse astrocytaire dans le striatum des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR). (A) Images représentatives des immunomarquages réalisés avec un anticorps anti-GFAP (en vert) révélant les astrocytes activés dans le striatum des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR) observés à 1 semaine, 1 mois et 6 mois après irradiation. Acquisition par microscopie à fluorescence avec un objectif 10X ; barre d'échelle = 200 μ m (image entière) et 50 μ m (image zoomée). (B) Quantification de la surface astrocytaire (%). Moyenne + SD ; N= 3 rats/groupe/temps avec 2 photos pour chaque condition. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher.

Ainsi, les résultats obtenus en immunohistologie soulignent la présence d'une réponse astrocytaire, qui est un élément à part entière de la neuroinflammation, suite aux lésions cérébrales radio-induites. Celle-ci se met en place précocement au niveau du cortex et de l'hippocampe, puisqu'une augmentation de la surface astrocytaire est observée dès la 2^e semaine et jusqu'à 1 mois après irradiation. Néanmoins, il existe une cinétique différente avec une activation astrocytaire plus tardive dans d'autres structures cérébrales tel le striatum.

Par ailleurs, nous avons également souhaité étudier la neuroinflammation avec des immunomarquages de la microglie en réalisant un double marquage Iba1/CD68 mais, malheureusement, la qualité des marquages était insuffisante pour exploiter ces données. Des optimisations du protocole d'immunomarquage de l'activation microgliale sont actuellement en cours d'étude.

- **La diffusivité axiale (AD)**

Pour aller plus loin dans l'analyse par IRM des paramètres de diffusion, nous nous sommes intéressés à la diffusivité axiale (AD) qui reflète la vitesse des molécules d'eau dans une orientation particulière, laquelle est parallèle au sens de lecture du signal lors des acquisitions des images. Autrement dit, dans la substance blanche, le paramètre AD reflète le mouvement des molécules d'eau le long des fibres et permet ainsi d'avoir des informations biologiques sur l'intégrité axonale (Le Bihan & Lima, 2015).

L'analyse globale du paramètre AD nous révèle que les valeurs d'AD sont significativement plus basses chez les rats irradiés à 1 mois et 6 mois post-irradiation par rapport aux animaux contrôles comme en témoigne les pixels bleus. Cela est visible à la fois sur les cartes statistiques (cartes de t) présentées sur la **Figure 111 A** (clusters bleus) et sur l'évolution du nombre total de pixels significatifs sur l'ensemble du cerveau (courbe bleue) (**Figure 111 B**).

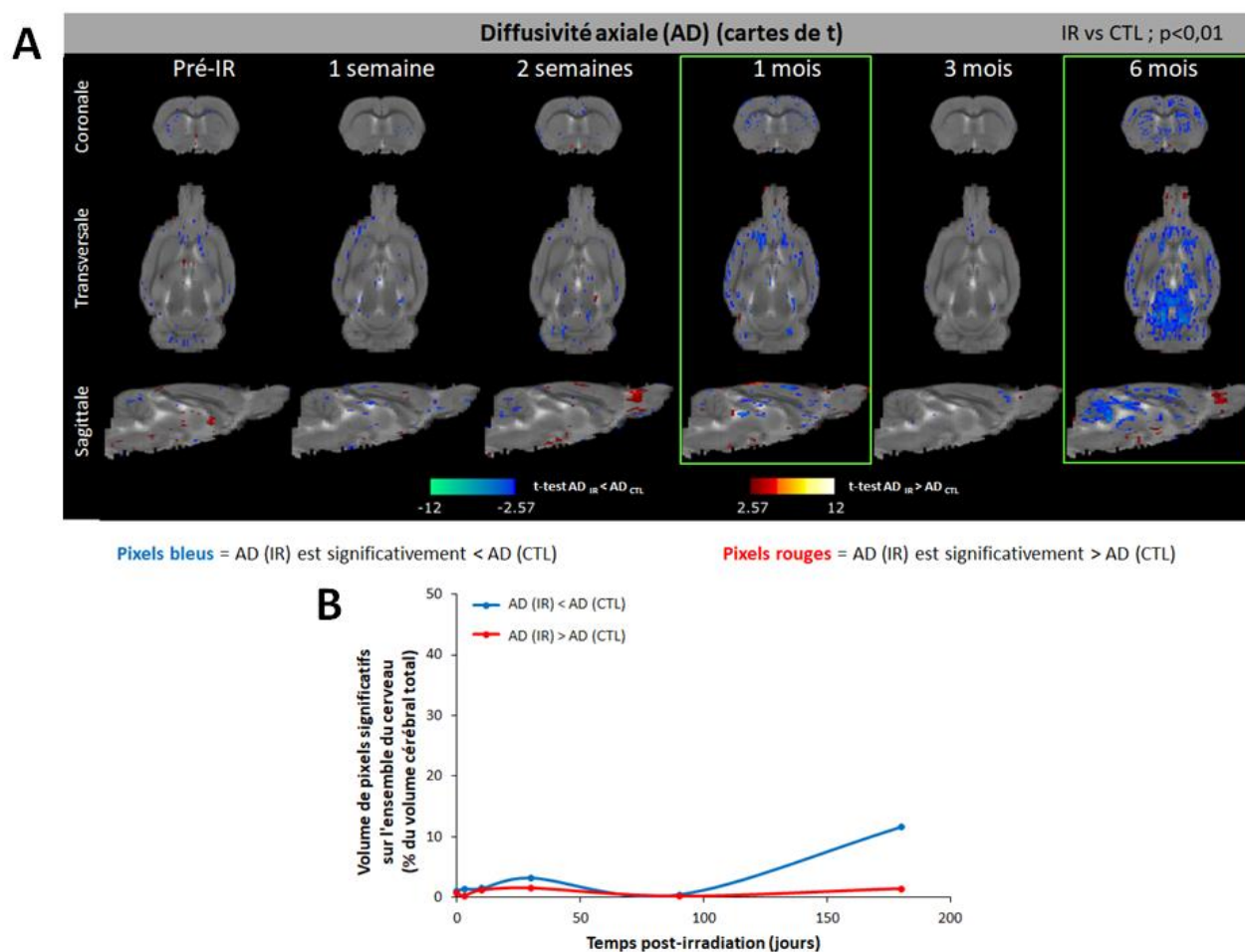


Figure 111 : Analyse statistique pixel-à-pixel sur l'ensemble du cerveau des variations de diffusivité axiale (AD) après irradiation cérébrale. (A) Cartes de t représentant les pixels significativement différents entre les rats irradiés (IR) et les rats contrôles (CTL) à différents temps de l'étude (pré-irradiation, 1 semaine, 2 semaines, 1 mois, 3 mois et 6 mois post-irradiation). Les tests t avec un seuil de significativité fixé à $p < 0,01$ comparent les valeurs d'AD pour chaque pixel entre les groupes CTL et IR. Pixel bleu = AD diminué chez les rats IR par rapport aux rats CTL ; pixel rouge = AD augmenté chez les rats IR par rapport aux rats CTL. Le rectangle vert indique le temps post-irradiation pour lequel les effets statistiques sont les plus importants. **(B)** Suivi temporel du volume total de pixels significatifs (bleus ou rouges) sur l'ensemble du cerveau. $N = 6$ rats/groupe/temps.

En revanche, l'analyse par ROI nous apporte des résultats légèrement différents de ceux obtenus par l'analyse statistique pixel-à-pixel des valeurs d'AD sur l'ensemble du cerveau (**Figure 112**). En effet, au niveau du cortex et de l'hippocampe, nous observons une diminution significative de l'AD dans le groupe IR par rapport au groupe CTL de 1 à 6 mois après irradiation du cerveau entier (**Figures 112 A et 112 B**). Dans le thalamus et le striatum, les valeurs d'AD sont réduites chez les animaux irradiés par rapport aux animaux contrôles à 3 et 6 mois post-irradiation (bien qu'il s'agisse seulement d'une tendance pour les valeurs d'AD à 6 mois dans le thalamus (**Figures 112 C et 112 D**)). En revanche, aucune différence significative n'est observée entre les groupes au niveau du corps calleux, même si les valeurs d'AD tendent à diminuer depuis 1 mois post-irradiation jusqu'à la fin du protocole (**Figure 112 E**).

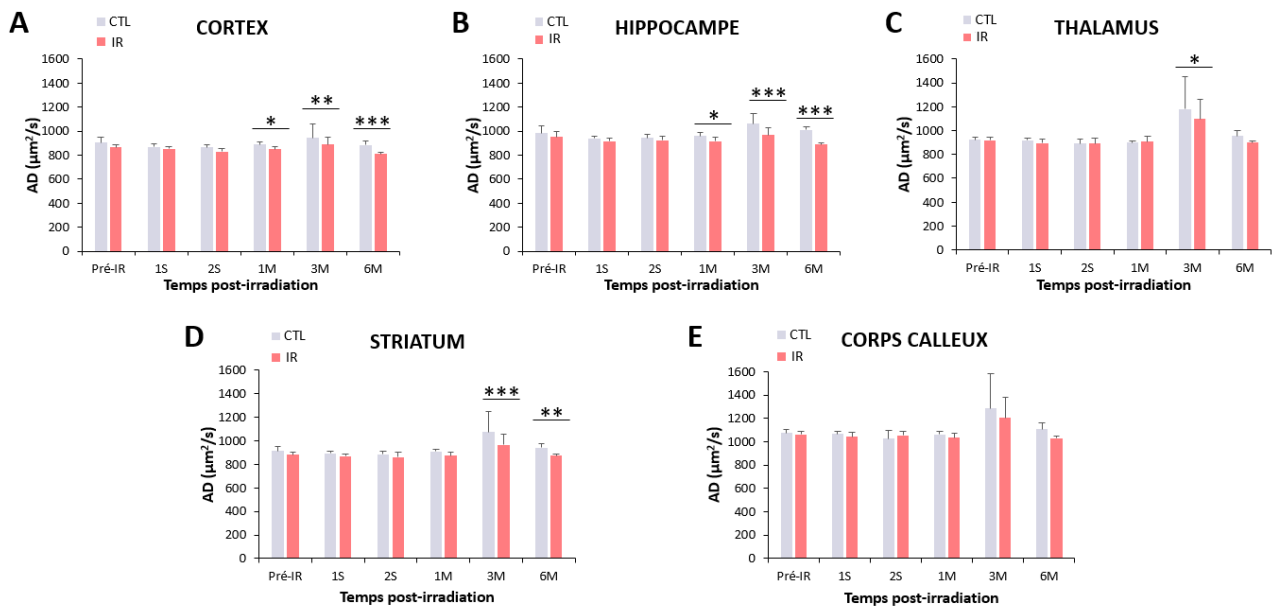


Figure 112 : Analyse par régions d'intérêt des effets de l'irradiation sur la diffusivité axiale (AD) mesurée par IRM de diffusion. Evolution temporelle des valeurs d'AD chez les rats contrôles (CTL) et les rats irradiés (IR) dans différentes structures cérébrales : (A) cortex, (B) hippocampe, (C) thalamus, (D) striatum et (E) corps calleux. Moyenne + SD ; N = 6 rats/groupe/temps. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,0001$.

L'AD traduit la vitesse des molécules d'eau de façon parallèle aux faisceaux de SB ou la structure cellulaire organisée dans la SG. L'irradiation induit une diminution des valeurs de l'AD de façon précoce et persistante sur des temps plus tardifs. Nous pouvons alors supposer que cela traduit la présence d'une dégénérescence axonale ou une gliose/neuroinflammation induite par l'irradiation cérébrale.

- **Diffusion radiale (RD)**

En parallèle des analyses du paramètre AD, nous avons étudié la diffusivité radiale (RD) qui reflète la vitesse des molécules d'eau dans une orientation particulière, laquelle est perpendiculaire au sens de lecture du signal lors des acquisitions des images. Autrement dit, dans la substance blanche, le paramètre RD reflète le mouvement des molécules d'eau qui traversent la myéline et permet ainsi d'avoir des informations biologiques sur l'intégrité de la SB (Le Bihan & Lima, 2015).

Avec l'analyse statistique globale des valeurs de RD sur l'ensemble du cerveau, nous observons des clusters bleus principalement à 6 mois après irradiation. Cela signifie que les valeurs de RD sont significativement inférieures chez les rats irradiés à ce temps de l'étude par rapport aux rats contrôles (**Figure 113 A**). De plus, les courbes du volume total des pixels

significatifs sur l'ensemble du cerveau montrent une légère augmentation du nombre de pixels bleus 6 mois post-irradiation (**Figure 113 B**).

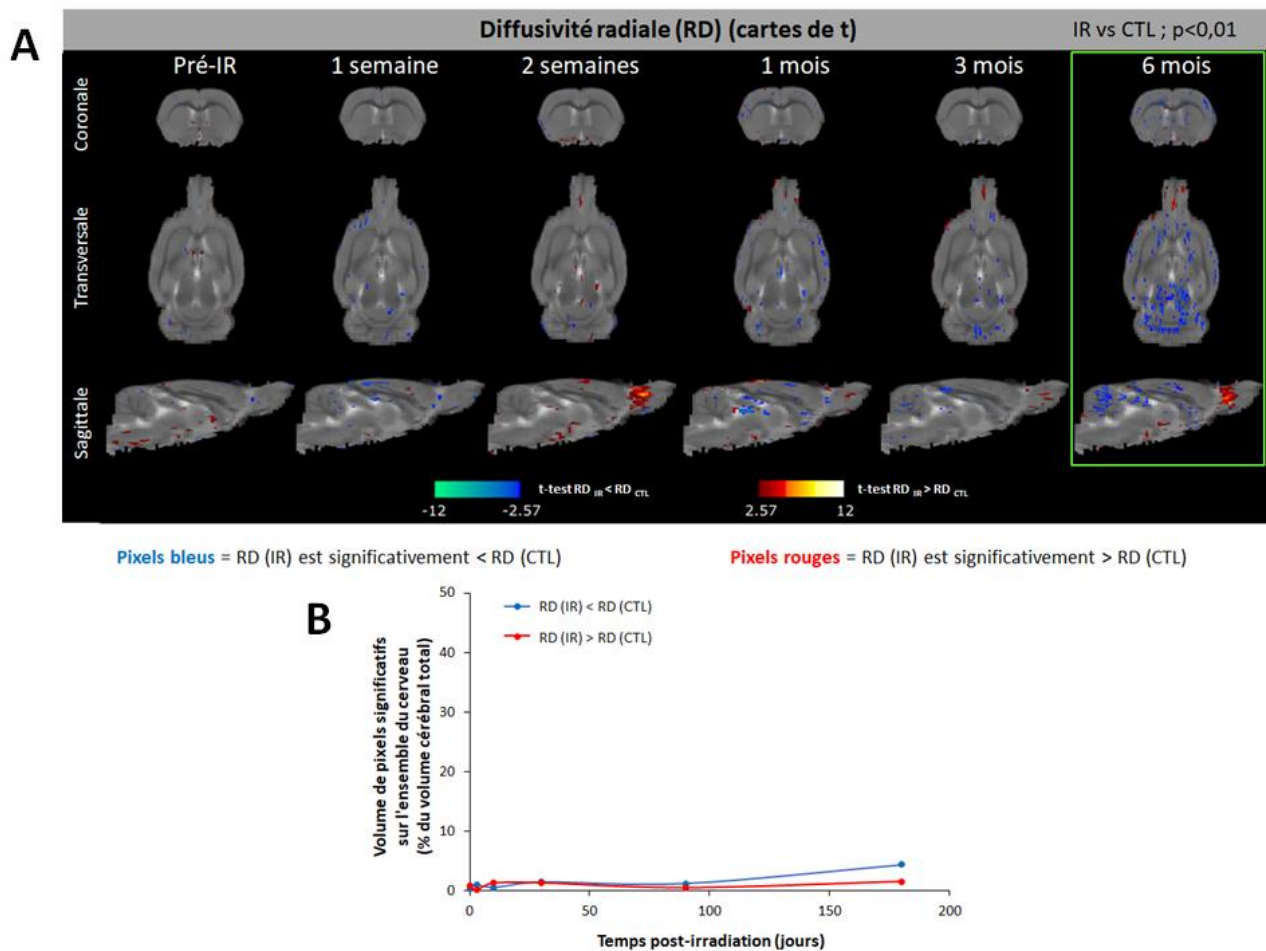


Figure 113 : Analyse statistique pixel-à-pixel sur l'ensemble du cerveau des variations de diffusivité radiale (RD) après irradiation cérébrale. (A) Cartes de t représentant les pixels significativement différents entre les rats irradiés (IR) et les rats contrôles (CTL) à différents temps de l'étude (pré-irradiation, 1 semaine, 2 semaines, 1 mois, 3 mois et 6 mois post-irradiation). Les tests t avec un seuil de significativité fixé à $p < 0,01$ comparent les valeurs de RD pour chaque pixel entre les groupes CTL et IR. Pixel bleu = RD diminué chez les rats IR par rapport aux rats CTL ; pixel rouge = RD augmenté chez les rats IR par rapport aux rats CTL. Le rectangle vert indique le temps post-irradiation pour lequel les effets statistiques sont les plus importants. (B) Suivi temporel du volume total de pixels significatifs (bleus ou rouges) sur l'ensemble du cerveau. $N = 6$ rats/groupe/temps.

L'analyse par ROI conforte ces atteintes tardives de la RD à 6 mois post-irradiation puisque l'ensemble des structures cérébrales étudiées (cortex, hippocampe, thalamus, striatum, corps calleux) présentent une diminution significative des valeurs de RD chez les rats irradiés par rapport aux rats contrôles 6 mois post-irradiation (**Figure 114**). De plus, il est observé à des temps aigus (1 ou 2 semaines) ou précoces (1 ou 3 mois) après irradiation que les valeurs de RD sont significativement plus faibles dans le groupe IR par comparaison au groupe CTL au niveau du cortex, de l'hippocampe et du corps calleux (**Figure 114 A, 114 B, 114 E**).

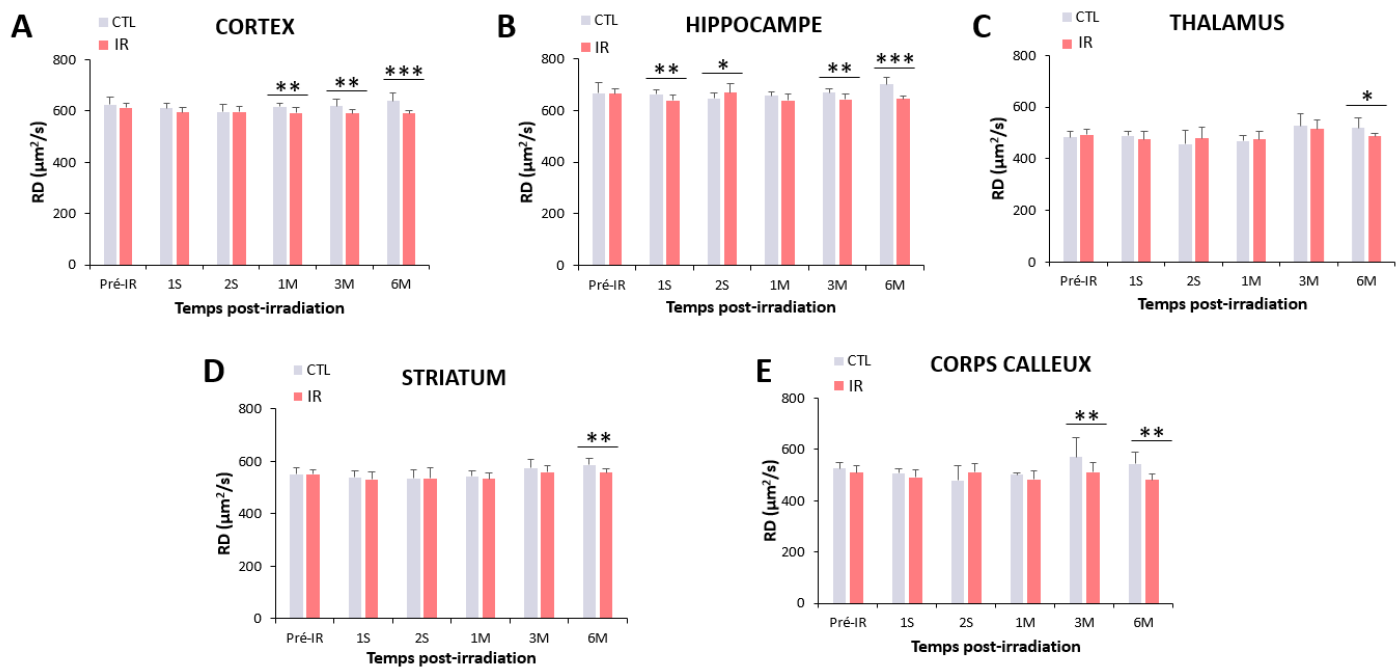


Figure 114 : Analyse par régions d'intérêt des effets de l'irradiation sur la diffusivité radiale (RD) mesurée par IRM de diffusion. Evolution temporelle des valeurs de RD chez les rats contrôles (CTL) et les rats irradiés (IR) dans différentes structures cérébrales : (A) cortex, (B) hippocampe, (C) thalamus, (D) striatum et (E) corps calleux. Moyenne + SD ; N = 6 rats/groupe/temps. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,0001$.

La RD traduit la vitesse des molécules d'eau de façon perpendiculaire aux faisceaux de SB ou la structure cellulaire organisée dans la SG. L'irradiation induit donc une diminution des valeurs de RD de façon aiguë, précoce et persistante sur des temps plus tardifs selon les structures cérébrales étudiées. Nous pouvons alors supposer que cela traduit la présence de modifications de la myéline ou une gliose/neuroinflammation induite par l'irradiation cérébrale.

Afin de mieux comprendre les effets de l'irradiation sur les valeurs d'AD et de RD, nous avons souhaité visualiser l'intégrité des fibres de SB, notamment de la myéline. Pour ce faire, des immunomarquages avec un anticorps anti-MBP (*myelin basic protein*), permettant de visualiser les gaines de myéline autour des axones, ont été réalisés sur les coupes de cerveaux de rats CTL et IR prélevés à tous les temps étudiés après irradiation. Comme observés sur les images obtenues en microscopie de fluorescence, les immunomarquages anti-MBP dans le striatum montrent une myéline plus rare et avec un aspect fragmenté à 6 mois post-irradiation (**Figure 115 A**). La quantification de la surface occupée par la myéline semble être diminuée chez les rats irradiés à la fois lors de la phase aiguë (2^{ème} semaine) ($p=0,11$) et tardive (6 mois) ($p=0,10$) (**Figure 115 A**). Ces résultats suggèrent donc une atteinte radio-induite des fibres de

substance blanche au niveau du striatum. Néanmoins, ces résultats n'atteignent pas le seuil de significativité lors de la comparaison entre les groupes CTL et IR et sont donc à prendre avec précaution.

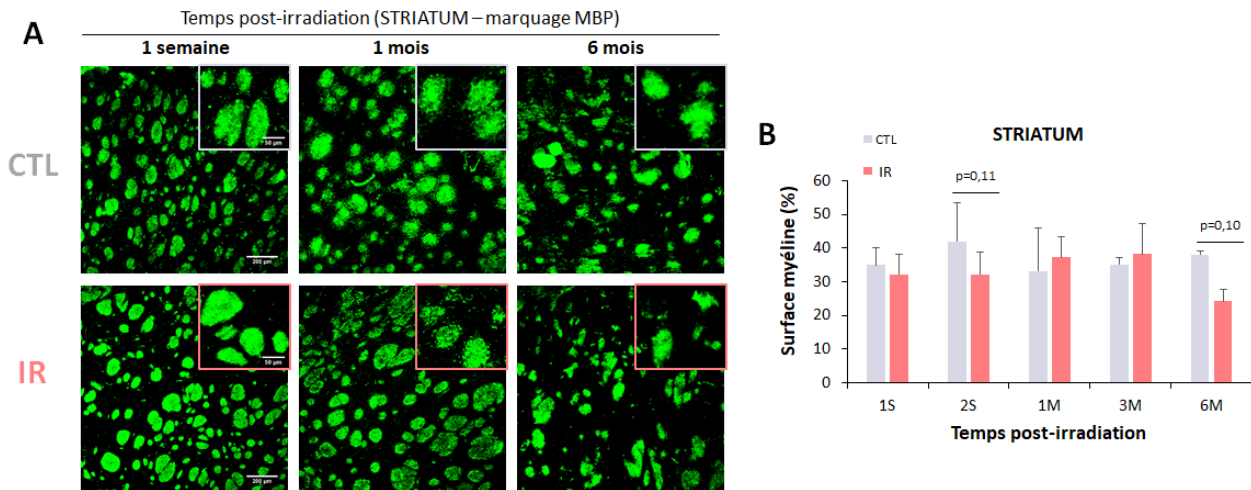


Figure 115 : **Analyse immunohistologique de la myéline dans le striatum des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR).** (A) Images représentatives des immunomarquages réalisés avec un anticorps anti-MBP (en vert) révélant les gaines de myélines dans le striatum des rats contrôles (CTL) et des rats irradiés (IR) observés à 1 semaine, 1 mois et 6 mois après irradiation. Acquisition par microscopie à fluorescence avec un objectif 10X ; barre d'échelle = 200 μ m (image entière) et 50 μ m (image zoomée). (B) Quantification de la surface occupée par la myéline (%). Moyenne + SD ; N= 3 rats/groupe/temps avec 2 photos pour chaque condition. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher.

A notre plus grand regret, nous n'avons pas pu faire ces analyses de la myéline sur le corps calleux qui est le plus gros tractus de SB dans le cerveau, car nos coupes de cerveau ont été faites en plan frontal. L'orientation du corps calleux sur ces coupes est alors transversale, ce qui empêche une révélation correcte de la myéline. Pour se faire, il faudrait faire des immunomarquages de la myéline sur des coupes sagittales, ce qui nous est impossible car nous n'avons plus de matériel biologique disponible.

- **Fraction d'anisotropie (FA)**

Pour finir, nous avons aussi étudié les effets de l'irradiation cérébrale sur la fraction d'anisotropie (FA) qui témoigne de l'organisation particulière ou non d'un tissu. Les valeurs de ce paramètre sont comprises obligatoirement entre 0 et 1. Si la valeur est proche de 0, cela indique que les molécules d'eau se déplacent uniformément dans toutes les directions de l'espace et signifie donc que le tissu n'a pas d'organisation particulière. A l'inverse, si la valeur est proche de 1, cela indique que les molécules d'eau se déplacent uniquement dans une seule direction de l'espace et indique alors que le tissu repose sur une organisation particulière. Par

conséquent, dans le cerveau, les valeurs de FA sont donc plus élevées dans la SB que dans la SG (Le Bihan & Lima, 2015).

Les cartes statistiques obtenues après l'analyse globale des valeurs de FA ne présentent aucun changement significatif majeur entre le groupe CTL et le groupe IR puisque aucun cluster bleu ou rouge n'est franchement visible, même si quelques pixels bleus apparaissent à quelques endroits du cerveau (**Figure 116 A**). Néanmoins, les courbes du volume total des pixels significatifs sur l'ensemble du cerveau montrent une légère augmentation du nombre de pixels bleus à 2 semaines et 1 mois post-irradiation ainsi qu'à 6 mois post-irradiation (**Figure 116 B**).

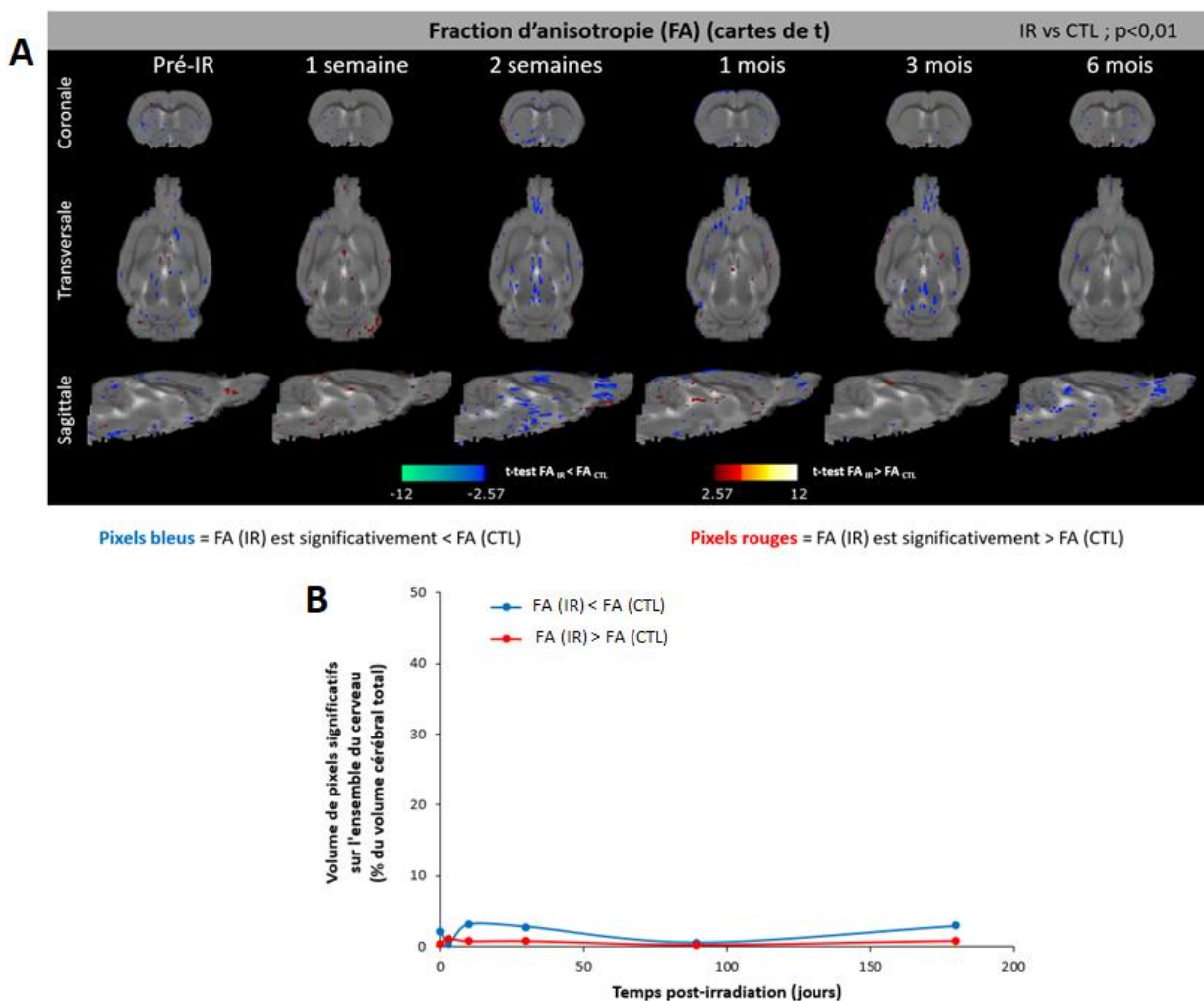


Figure 116 : Analyse statistique pixel-à-pixel sur l'ensemble du cerveau des variations de la fraction d'anisotropie (FA) après irradiation cérébrale. **(A)** Cartes de t représentant les pixels significativement différents entre les rats irradiés (IR) et les rats contrôles (CTL) à différents temps de l'étude (pré-irradiation, 1 semaine, 2 semaines, 1 mois, 3 mois et 6 mois post-irradiation). Les tests t avec un seuil de significativité fixé à $p < 0,01$ comparent les valeurs de FA pour chaque pixel entre les groupes CTL et IR. Pixel bleu = FA diminué chez les rats IR par rapport aux rats CTL ; pixel rouge = FA augmenté chez les rats IR par rapport aux rats CTL. **(B)** Suivi temporel du volume total de pixels significatifs (bleus ou rouges) sur l'ensemble du cerveau. $N = 6$ rats/groupe/temps.

Avec l'analyse par ROI, certaines différences notables entre les rats contrôles et irradiés ont pu être mises en lumière. En effet, l'irradiation induit une diminution de la FA dès deux semaines post-irradiation dans la plupart des structures cérébrales étudiées (cortex, hippocampe, thalamus et corps calleux) (**Figure 117 A, 117 B, 117 C, 117 E**). Cette diminution se retrouve également 3 mois après irradiation au niveau de l'hippocampe et du striatum et également 6 mois après irradiation au niveau de l'hippocampe (**Figure 117 B, 117 D**).

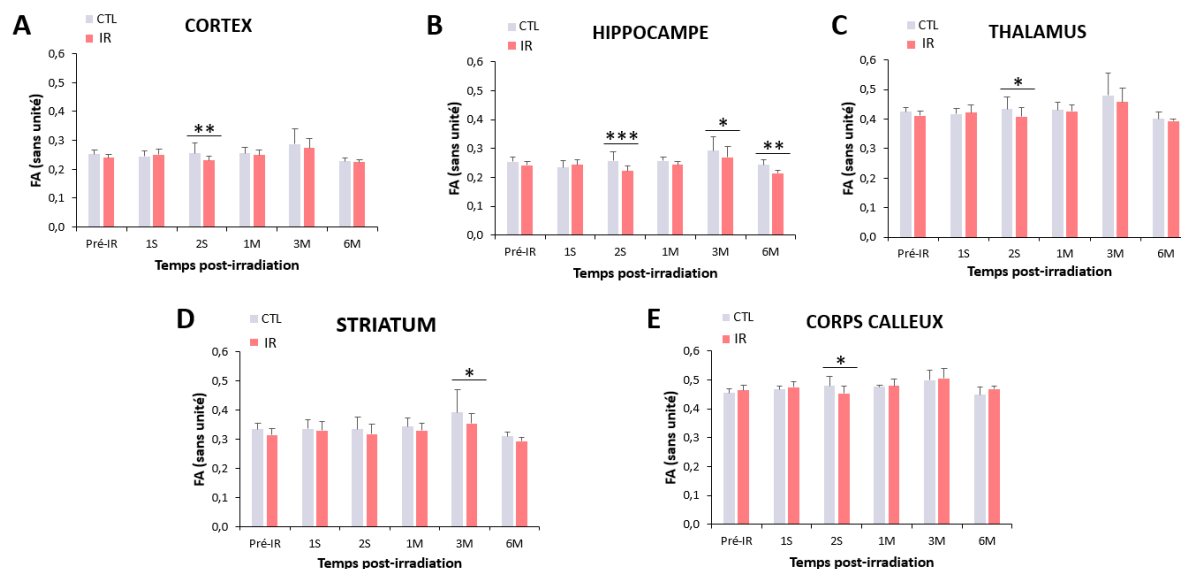


Figure 117 : Analyse par régions d'intérêt des effets de l'irradiation sur la fraction d'anisotropie (FA) mesurée par IRM de diffusion. Evolution temporelle des valeurs de FA chez les rats contrôles (CTL) et les rats irradiés (IR) dans différentes structures cérébrales : (A) cortex, (B) hippocampe, (C) thalamus, (D) striatum et (E) corps calleux. Moyenne + SD ; N = 6 rats/groupe/temps. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,0001$.

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus en IRM nous a permis de révéler la présence de dommages cérébraux dans notre modèle animal de radiotoxicité chez le rat adulte. De manière intéressante, l'IRM anatomique nous a permis de mettre en évidence une atrophie cérébrale qui apparaît aux temps tardifs après irradiation. L'IRM vasculaire est suffisamment sensible, à travers la quantification du VSC, pour détecter les atteintes des vaisseaux cérébraux à long-terme après irradiation cérébrale. Quant à l'IRM de diffusion, cette modalité d'imagerie nous semble très pertinente car elle permet de mettre en évidence avec le paramètre MD les modifications cellulaires induites par l'irradiation, notamment dès 2 semaines (mort cellulaire) et à 1 mois post-irradiation (neuroinflammation). De plus, notre étude montre que les paramètres AD et RD seraient intéressants pour détecter les lésions cérébrales à plus long-terme pouvant refléter une désorganisation de l'intégrité structurelle de la SB mais également de la SG.

A travers cette étude en imagerie, nous suggérons que les paramètres mesurés par IRM de diffusion pourraient être des biomarqueurs de diagnostic des toxicités cérébrales induites par la RT dans les phases précoces et que le VSC mesuré par IRM vasculaire pourrait être aussi un biomarqueur de diagnostic à utiliser dans la phase tardive de la neurotoxicité radique. En revanche, nous ne pouvons pas, à ce jour, conclure sur la valeur prédictive de ces biomarqueurs d'imagerie vis-à-vis des déficits cognitifs car nous ne pouvons pas faire de corrélations entre les données obtenues en IRM et en comportement dans notre modèle préclinique car ces données ont été obtenues sur des cohortes d'animaux différentes.

IV – Le stress oxydatif : un biomarqueur des atteintes neuropathologiques induites par l'irradiation ?

En plus des biomarqueurs d'imagerie pour détecter et/ou prédire les toxicités neurologiques de la RT, les biomarqueurs sanguins sont également d'un intérêt majeur car sont peu invasifs et faciles à mettre en place dans le parcours de soins des patients. De nombreuses études précliniques ont étudié différents biomarqueurs plasmatiques ou lymphocytaires potentiels pour détecter/prédire les atteintes neuropathologiques de la RT. La plupart des marqueurs biologiques étudiés visent l'inflammation, l'angiogenèse ou les cassures de l'ADN et ses réparations (Sultana et al., 2020). Toutefois peu d'études se sont focalisées sur les marqueurs du stress oxydatif alors que celui-ci a un rôle majeur dans la physiopathologie de la radiotoxicité cérébrale. En effet, il est bien décrit dans la littérature que la RT induit du stress oxydatif par deux mécanismes : 1/ un mécanisme précoce via la radiolyse de l'eau due aux effets indirects des RI et également par la formation d'espèces réactives par les cellules irradiées, notamment à partir des mitochondries ; puis, 2/ un mécanisme plus tardif via les radicaux libres qui vont activer les cellules impliquées dans la neuroinflammation (microglie et astrocytes) qui à leur tour vont également générer des ROS qui vont maintenir ou augmenter le stress oxydatif (Azzam et al., 2012). Ainsi, les dosages des différentes espèces réactives et des enzymes antioxydantes à partir d'échantillons plasmatiques seraient très pertinents.

Dans cet objectif, nous avons réalisé des dosages dans le cerveau et dans le plasma des espèces réactives qui sont dérivées de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*), de l'azote (RNS, *reactive nitrogen species*), du carbone (RCS, *reactive carbonyl species*) et du soufre (RSS, *reactive sulfur species*), lesquelles sont maintenant incluses sous le terme d'interactome des espèces réactives (RSI, *reactive species interactome*) (Malard et al., 2021). Grâce à des sondes spécifiques de chacune de ces espèces réactives qui émettent de la fluorescence lorsqu'elles sont oxydées, lesquelles sont détaillées dans la partie Matériels et Méthodes (pages 170-172), nous avons quantifié les différentes espèces réactives à 1 semaine, 2 semaines, 1 mois, 3 mois et 6 mois après irradiation du cerveau entier dans notre modèle animal.

IV – 1 Espèces réactives dans le tissu cérébral

• Dosage des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Nous avons choisi de doser l'anion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec les sondes DHE et DCFDA respectivement, dans le tissu cérébral aux différents temps de l'étude. Si ces différents dosages se montrent stables dans le temps chez les rats contrôles, nous observons une diminution significative de O_2^- 3 mois après irradiation chez les animaux soumis à une irradiation du cerveau entier (**Figure 118 A**). En revanche, même s'il semble y avoir une légère augmentation 6 mois post-irradiation, le taux d' H_2O_2 dans le tissu cérébral n'est pas significativement différent entre les CTL et IR tout au long de l'étude (**Figure 118-B**).

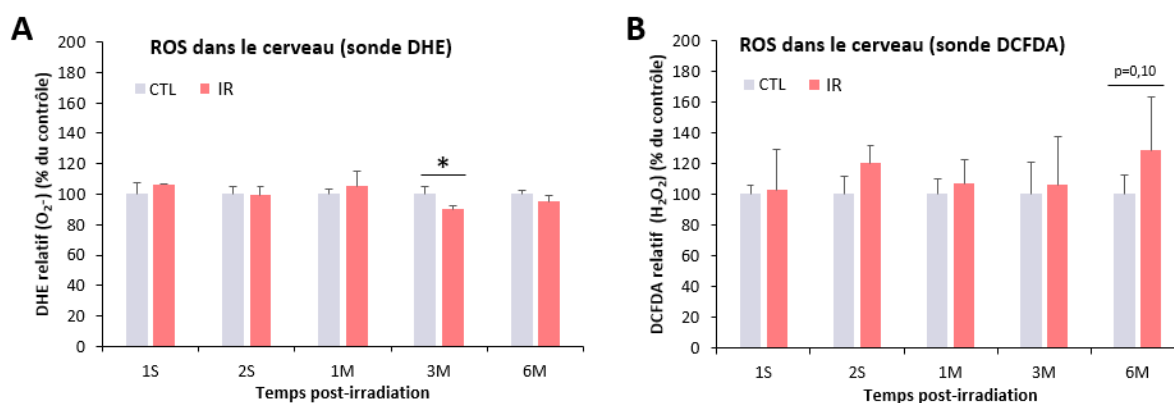


Figure 118 : Dosage par fluorescence des taux de ROS dans le cerveau des animaux contrôles (CTL) et des animaux irradiés (IR). (A) O_2^- exprimé en % par rapport au contrôle (sonde DHE, dihydroéthidium). **(B)** H_2O_2 exprimé en % par rapport au contrôle (sonde DCFDA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate). Moyenne + SD ; N = 3 rats/groupe/temps. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$.

L'irradiation semble donc modifier le niveau des ROS dans le cerveau dans les phases tardives (3 et 6 mois post-irradiation).

- **Dosage des espèces réactives de l'azote (RNS)**

Le dosage des RNS, notamment les ions peroxyntrites (ONOO^-), a été réalisé dans le tissu cérébral grâce à l'utilisation de la sonde de fluorescente DHR123. Comme présenté sur la **Figure 119**, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les animaux contrôles et irradiés pour tous les temps de l'étude considérés.

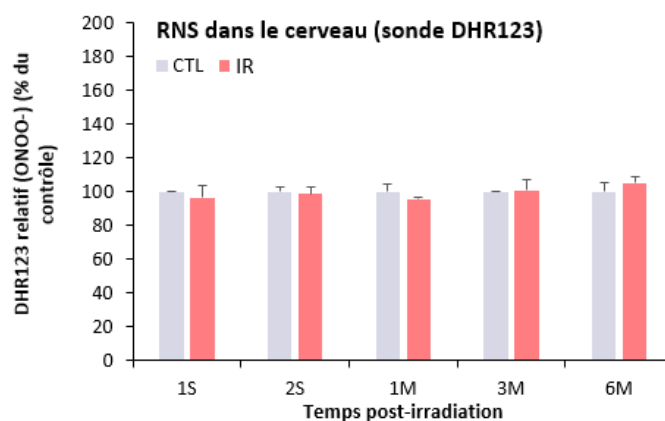


Figure 119 : Dosage par fluorescence des taux de RNS dans le cerveau des animaux contrôles (CTL) et des animaux irradiés (IR). ONOO^- exprimé en % par rapport au contrôle (sonde DHR123, dihydrorhodamine 123). Moyenne + SD ; N = 3 rats/groupe/temps. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher : aucune différence significative n'est observée.

- **Dosage des espèces réactives du soufre (RSS)**

Nous avons choisi de doser sulfure d'hydrogène (H_2S) et le disulfure d'hydrogène (H_2S_2) avec les sondes AzMc et SSP4, respectivement, dans le tissu cérébral aux différents temps de l'étude. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence certaines modifications survenant après irradiation. En effet, si les taux d' H_2S et de H_2S_2 sont stables dans le temps chez les animaux contrôles, une diminution significative de H_2S (**Figure 120 A**) et de H_2S_2 (**Figure 120 B**) est observée dans le cerveau des rats irradiés par rapport aux rats contrôles, à deux semaines et 6 mois, respectivement, après irradiation. De plus, le taux de H_2S_2 dans le cerveau des rats irradiés semble inférieur à celui des animaux contrôles 1 semaine, 2 semaines et 3 mois après irradiation sans toutefois que ces valeurs n'atteignent le seuil de significativité (**Figure 120 B**).

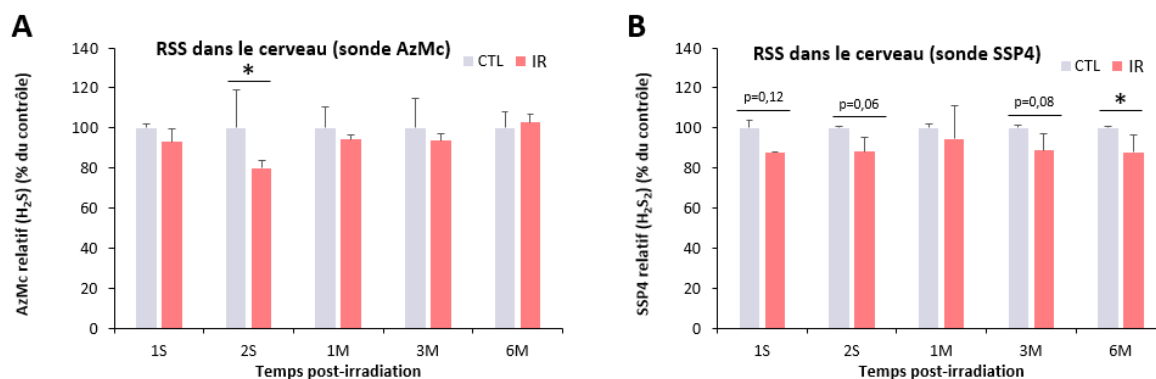


Figure 120 : Dosage par fluorescence des taux de RSS dans le cerveau des animaux contrôles (CTL) et des animaux irradiés (IR). **(A)** H_2S exprimé en % par rapport au contrôle (sonde AzMc, 7-Azido-4-methylcoumarin). **(B)** H_2S_2 exprimé en % par rapport au contrôle (sonde SSP4, Sulfane Sulfur Probe 4). Moyenne + SD ; N = 3 rats/groupe/temps. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$.

L'irradiation semble modifier le niveau des RSS dans la phase aiguë (2 semaines post-irradiation).

- **Dosage des espèces réactives du carbone (RCS)**

Nous avons choisi de doser les espèces carbonylées avec la sonde NDB-H dans le tissu cérébral aux différents temps de l'étude. Les taux de RCS sont similaires entre les rats CTL et IR quel que soit le temps d'étude considéré (données non-présentées).

En résumé, nos résultats des dosages du RSI dans le tissu cérébral suggèrent que les ROS et les RSS pourraient être modulées par l'irradiation dans des temps tardifs et précoces, respectivement. Toutefois, ces résultats doivent être pris avec précaution car le nombre d'animaux par groupe et par temps d'étude est limité. D'autres échantillons cérébraux devront être analysés pour conforter ces résultats.

IV – 2 Espèces réactives dans le compartiment plasmatique

- **Dosage des ROS**

L'anion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ont été dosés avec les sondes DHE et DCFDA respectivement, dans le plasma aux différents temps de l'étude. Comme présenté sur la **Figure 121**, bien que les niveaux de ces ROS soient stables dans le temps chez les rats contrôles, il apparaît de très nettes hausses chez les animaux irradiés. Ainsi, par comparaison aux rats contrôles, le taux d' O_2^- est significativement plus élevé chez les rats irradiés 6 mois après exposition (**Figure 121 A**) tandis que le niveau d' H_2O_2 est, lui, plus élevé de façon précoce lors des deux premières semaines qui suivent l'irradiation (**Figure 121 B**).

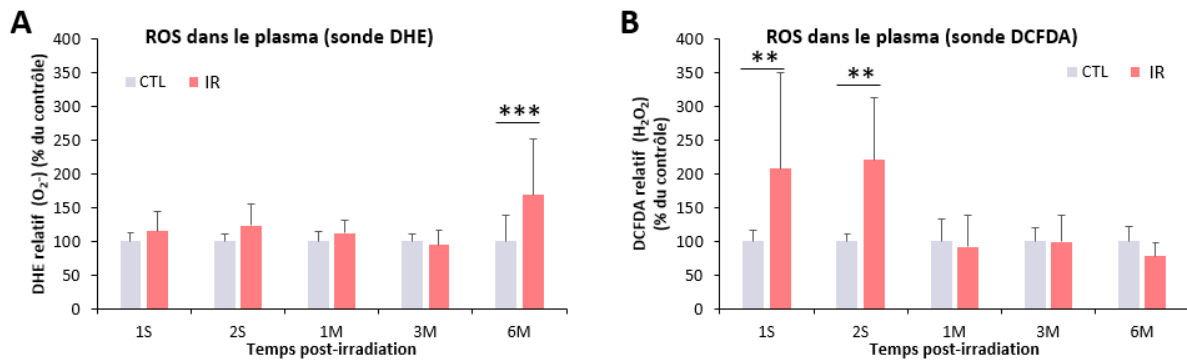


Figure 121 : Dosage par fluorescence des taux de ROS dans le plasma des animaux contrôles (CTL) et des animaux irradiés (IR). (A) O_2^- exprimé en % par rapport au contrôle (sonde DHE, dihydroethidium). (B) H_2O_2 exprimé en % par rapport au contrôle (sonde DCFDA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate). Moyenne + SD ; N = 7 rats/groupe/temps. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,0001$.

L'irradiation cérébrale induit donc une augmentation des ROS dans le compartiment plasmatique. De plus, selon l'espèce ciblée (O_2^- ou H_2O_2), ces modifications apparaissent soit lors de la phase précoce (H_2O_2) soit lors de la phase tardive (O_2^-) ce qui permet d'avoir un marqueur temporel des modifications radio-induites.

• Dosage des RNS

Le dosage des RNS dans le compartiment plasmatique nous indique tout d'abord que les niveaux d' $ONOO^-$ sont stables dans le temps chez les individus contrôles. Néanmoins, chez les rats irradiés nous remarquons des taux plus élevés vis-à-vis des contrôles 2 semaines et 6 mois après irradiation (**Figure 122**). Entre ces deux points, les niveaux d' $ONOO^-$ relevés chez les rats irradiés sont identiques à ceux des rats contrôles.

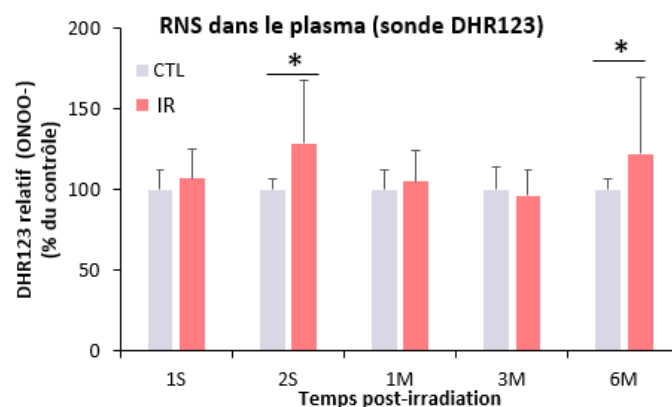


Figure 122 : Dosage par fluorescence des taux de RNS dans le plasma des animaux contrôles (CTL) et des animaux irradiés (IR). $ONOO^-$ exprimé en % par rapport au contrôle (sonde DHR123, dihydrorhodamine 123). Moyenne + SD ; N = 7 rats/groupe/temps. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$.

L'irradiation cérébrale induit donc des augmentations transitoires des niveaux de RNS dans le plasma des animaux irradiés.

• Dosage des RSS

Le dosage des espèces réactives de soufre (H_2S et H_2S_2) à l'aide de différentes sondes fluorescentes (AzMc et SSP4 respectivement) au niveau plasmatique nous indique d'une part que les niveaux de ces espèces ciblées sont relativement stables dans le temps chez les rats contrôles. D'autre part, l'irradiation cérébrale semble influencer les taux de RNS. En effet, le niveau d' H_2S chez les rats irradiés est significativement plus faible que celui des rats contrôles 3 mois post-irradiation mais également très nettement supérieur vis-à-vis de ces derniers 6 mois après irradiation (**Figure 123 A**). De plus, le taux d' H_2S_2 plasmatique chez les individus irradiés est significativement supérieur à celui des individus contrôles deux semaines après irradiation et a tendance à l'être également une semaine après exposition sans que le seuil de significativité ne soit atteint (**Figure 123 B**).

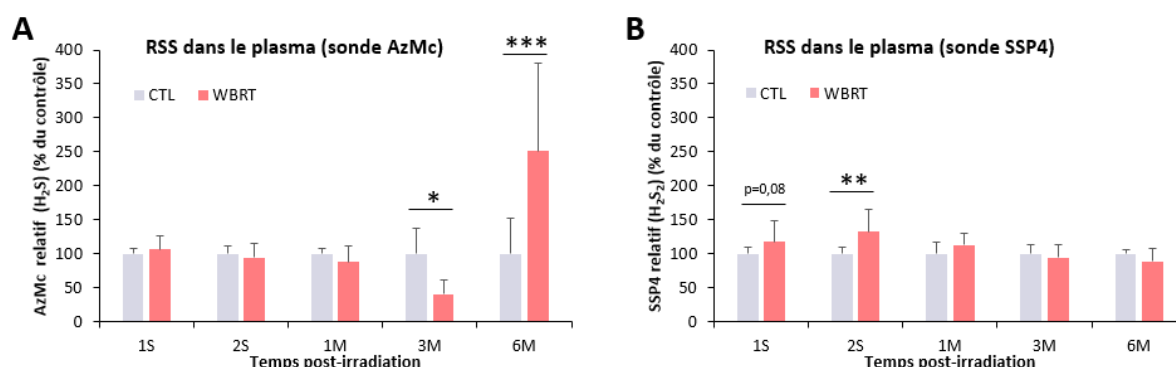


Figure 123 : Dosage par fluorescence des taux de RSS dans le plasma des animaux contrôles (CTL) et des animaux irradiés (IR). (A) H_2S exprimé en % par rapport au contrôle (sonde AzMc, 7-Azido-4-methylcoumarin). (B) H_2S_2 exprimé en % par rapport au contrôle (sonde SSP4, Sulfane Sulfur Probe 4). Moyenne + SD ; N = 7 rats/groupe/temps. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

Comme pour les ROS, l'irradiation cérébrale induit donc une augmentation des RSS au niveau plasmatique. De plus, selon l'espèce ciblée (H_2S et H_2S_2), ces modifications apparaissent soit lors de la phase précoce (H_2S_2) soit lors de la phase tardive (H_2S) ce qui rend les RSS potentiellement intéressantes pour évaluer les atteintes cérébrales radio-induites.

• Dosage des RCS

Les dosages des RCS avec la sonde NDB-H dans le plasma aux différents temps de l'étude n'ont montré aucune différence entre les rats CTL et IR quel que soit le temps d'étude considéré (données non-présentées).

En résumé, comme pour l'analyse du RSI sur le cerveau, nos résultats des dosages des différentes espèces réactives dans le plasma soulignent que les ROS et les RSS pourraient être modulées par l'irradiation cérébrale dans des temps tardifs et précoces, respectivement.

IV – 3 L'Albumine et la 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) dans le plasma : marqueurs indirects du stress oxydatif

Les espèces réactives étant des composés futils, c'est-à-dire ayant des demi-vies courtes du fait de leurs possibles interactions avec d'autres espèces réactives ou molécules, nous avons cherché à conforter nos résultats obtenus sur l'intérêt de mesurer le RSI dans le plasma en dosant des molécules connues pour être impactées par le stress oxydatif. Notre choix s'est porté sur l'albumine et la 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG).

L'albumine, protéine hépatique sérique, est la protéine la plus abondante dans le sérum. Elle contribue au maintien de la pression oncotique ainsi qu'au transport de molécules hydrophobes. Il est connu que la concentration d'albumine diminue lorsqu'un stress oxydatif est présent car cette protéine peut être directement oxydée par les espèces réactives.

La présence de 8-OHdG au niveau plasmatique met en évidence des dommages à l'ADN irréversibles induits par le stress oxydatif. En effet, il existe des mécanismes de réparation de l'ADN permettant de remplacer des lésions. Elles sont ensuite éliminées du milieu intracellulaire vers les compartiments extracellulaires, tels que le sang et les urines (Haghdoost, 2005). La quantification de 8-OHdG vise à établir un lien dose/réponse entre l'irradiation et le taux de 8-OHdG produit afin de quantifier de manière indirecte le stress oxydatif.

Dans notre étude, nous avons quantifié par test ELISA les concentrations d'albumine et de 8-OHdG dans le plasma des rats CTL et des rats IR à tous les temps de notre étude : 1 semaine, 2 semaines, 1 mois, 3 mois et 6 mois après irradiation du cerveau entier.

Les résultats obtenus indiquent d'une part que les concentrations plasmatiques d'albumine chez le groupe contrôle sont relativement stables dans le temps (**Figure 124 A**), tandis que les concentrations de 8-OHdG semblent légèrement fluctuer au cours du temps (**Figure 124 B**). D'autre part, l'irradiation cérébrale modifie les concentrations d'albumine et

de 8-OHdG au niveau plasmatique. En effet, les rats irradiés ont une concentration d'albumine significativement inférieure par rapport au groupe contrôle lors de la 1^{ère} semaine et du 6^e mois après irradiation. Bien que les concentrations d'albumine entre les rats des groupes CTL et IR ne soient pas différentes significativement de 2 semaines à 3 mois post-irradiation, les rats irradiés ont tendance à avoir des taux d'albumine diminués (**Figure 124 A**). De plus, les concentrations plasmatiques de 8-OHdG semblent être supérieures tout au long de l'étude chez les rats irradiés vis-à-vis des rats contrôles. Néanmoins, le seuil de significativité ($p < 0,05$) n'est atteint qu'à 6 mois post-irradiation (**Figure 124 B**).

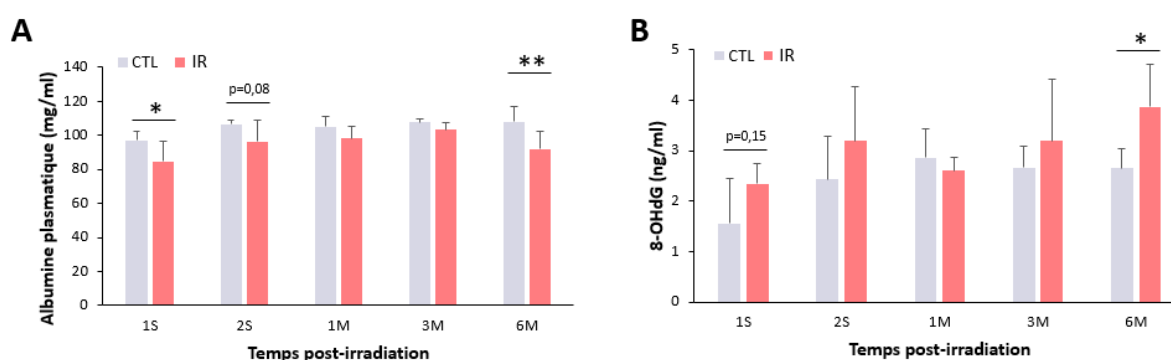


Figure 124 : Quantifications par test ELISA des concentrations plasmatiques de l'albumine (**A**) et de la 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) (**B**) chez les rats contrôles (CTL) et les rats irradiés (IR). Moyenne + SD ; N = 4 rats/groupe/temps. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

Conclusion

Cette première étude nous a donc permis de caractériser la radiotoxicité cérébrale dans un modèle de rat adulte de manière globale en évaluant tout d'abord sa pertinence en termes d'altérations comportementales, puis en recherchant des biomarqueurs d'imagerie (IRM) et plasmatiques (stress oxydatif). L'ensemble de nos résultats montre que l'irradiation cérébrale a un effet délétère sur l'état général des animaux mais également leur survie à long terme. Ce modèle permet également de mimer les troubles comportementaux observés en clinique tant cognitifs que d'un point de vue de la fatigue radio-induite (**Figure 125**). Nos données d'IRM nous ont permis de souligner l'intérêt de l'IRM de diffusion, notamment le paramètre de diffusivité moyenne (MD), pour détecter précocement les dommages cérébraux tandis que les dommages tardifs pourraient être identifiables par les paramètres de diffusivité axiale (AD) et radiale (RD). De plus, la quantification du VSC par IRM vasculaire pourrait être tout autant pertinente pour détecter les lésions neuropathologiques radio-induites à long-

terme (**Figure 125**). Au travers de cette étude, nous supposons aussi que le stress oxydatif, plus précisément les taux de ROS et de RSS pourraient être des biomarqueurs plasmatiques intéressants pour améliorer la prise en charge des effets neurotoxiques de l'irradiation.

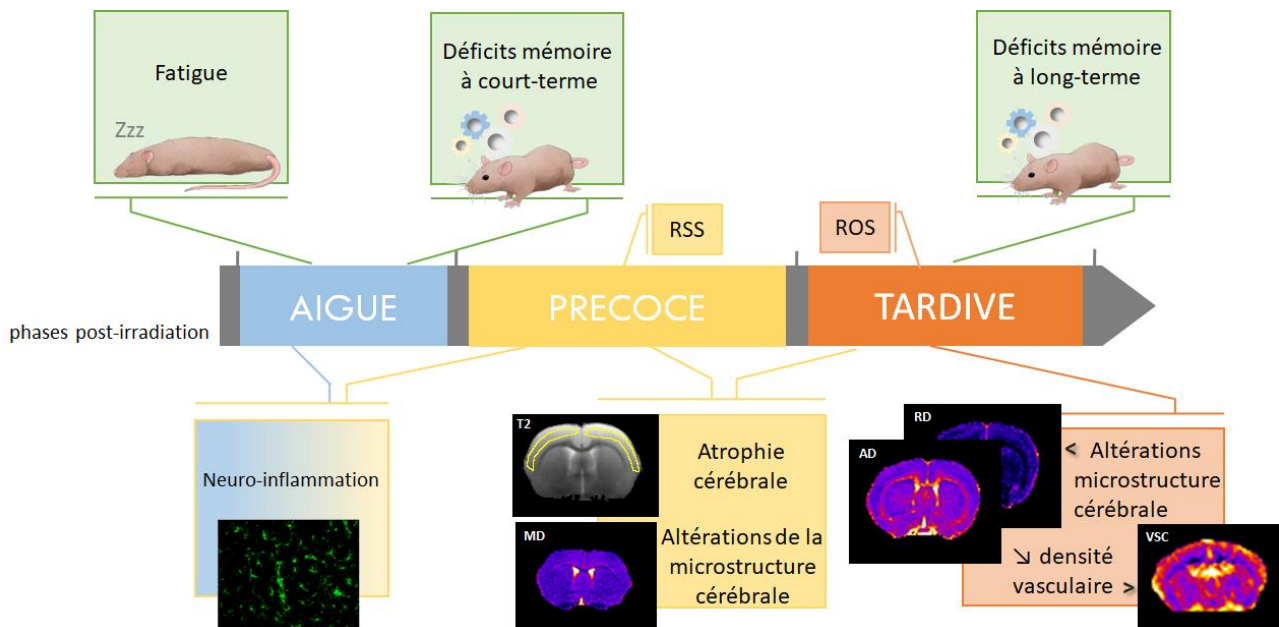


Figure 125 : Conclusion schématique sur les principaux résultats obtenus par la caractérisation longitudinale et multiparamétrique du modèle de radiotoxicité cérébrale développé chez le rat adulte.

La caractérisation de ce modèle préclinique de radiotoxicité cérébrale chez le rat adulte et sa pertinence vis-à-vis de la situation clinique, nous permet à présent de l'utiliser pour tester des stratégies thérapeutiques pour prévenir et/ou traiter les toxicités cérébrales radio-induites, notamment la fatigue et les troubles cognitifs qui sont bien décrits pour impacter la qualité de vie des patients long-survivants d'une tumeur cérébrale. Dans cet objectif, la 2^{ème} partie de ces travaux de thèse visait à évaluer la pratique de l'activité physique comme potentielle stratégie thérapeutique non-médicamenteuse.

Etude 2 : L'activité physique peut-elle être une stratégie thérapeutique pour atténuer les lésions cérébrales et les déficits cognitifs consécutifs de l'irradiation ?

Bien que la plainte cognitive (mémoire, processus attentionnels, fonctions exécutives) soit fréquemment rapportée par les patients traités par RT, il n'existe actuellement aucune prise en charge systématique de ces troubles ce qui impacte directement la qualité de vie des patients long survivants. Quelques approches médicamenteuses ou non médicamenteuses telles que l'activité physique sont évaluées en recherche clinique et préclinique afin de permettre une prise en charge totale des patients cancéreux. La 1^{ère} partie de ces travaux de thèse nous ayant permis de développer et caractériser un modèle de radiotoxicité cérébrale chez le rat adulte de façon longitudinale et multiparamétrique, cette 2^e partie avait pour but de tester l'activité physique comme potentielle stratégie thérapeutique.

Ainsi, nous nous sommes attachés à évaluer l'état général et comportemental de l'animal (fatigue, locomotion, mémoire, anxiété et dépression), mais également les modifications cérébrales radio-induites à l'aide de différentes modalités d'imagerie IRM (IRM anatomique, IRM vasculaire et IRM de diffusion). Dans cette étude l'activité physique est forcée et réalisée de façon régulière sur tapis de course, 30 minutes trois fois par semaine. Nous avons fait le choix de ce type d'activité afin de pouvoir contrôler au mieux l'activité pratiquée tant en termes de durée, que d'intensité ou encore de fréquence. Après avoir été soumis à une semaine d'habituation au tapis de course, les rats sont répartis aléatoirement en quatre groupes distincts : rats contrôles (groupe CTL) ; les rats irradiés (groupe IR), les rats contrôles soumis au protocole d'activité physique (groupe CTL AP) et les rats irradiés soumis au protocole d'activité physique (groupe IR AP).

Afin de ne pas déséquilibrer les groupes lors des analyses statistiques, les résultats présentés dans cette étude, notamment pour les groupes CTL et IR, portent essentiellement sur les données obtenues avec les cohortes d'animaux soumis à l'activité physique. En d'autres termes, les animaux contrôles et irradiés des premières cohortes visant à évaluer l'effet de l'irradiation sur la cognition et la structure cérébrale (étude 1) ne sont pas inclus dans les résultats présentés dans cette 2^{ème} partie des résultats de mes travaux de thèse. Les groupes

contrôles et irradiés de cette 2^{ème} étude ont donc bien été dans les mêmes conditions environnementales que les deux autres groupes CTL AP et IR AP.

I – Intérêt de l'activité physique pour améliorer les troubles comportementaux associés à l'irradiation cérébrale

I – 1 Etat général

Afin d'analyser les effets de l'activité physique sur l'état général de l'animal après irradiation encéphalique ainsi que son évolution pendant les phases aiguë, précoce et tardive, nous avons de nouveau quantifié la masse corporelle des rats et développer un score d'état général basé sur des indices physiques du bien-être de l'animal (page 151). Enfin, nous nous sommes attachés à évaluer la survie des animaux au cours du protocole pour chacun des groupes d'étude.

- Suivi du poids corporel

Le suivi du poids corporel nous indique tout d'abord que l'ensemble des animaux des groupes CTL et CTL AP prennent du poids au cours de l'étude et il n'y a aucune différence significative entre ces deux groupes (**Figure 126**). De la même manière que dans la 1^{ère} partie des résultats, les animaux des groupes IR et IR AP ne présentent aucune différence de poids vis-à-vis des deux groupes CTL et IR avant irradiation. Cependant, l'ensemble des rats IR présente une subite et très nette perte de poids dès la première semaine après irradiation. A partir de la deuxième semaine, ces animaux irradiés vont progressivement reprendre du poids mais celui-ci restera significativement inférieur à celui des groupes CTL et CTL AP tout au long de l'étude (**Figure 126**). Néanmoins, nous observons une différence significative entre les animaux des groupes IR et IR AP 5 mois après irradiation (J137). De plus, la courbe de poids des rats IR AP est significativement différente de celle des rats CTL AP tout au long de l'étude, sauf à J28 ($p = 0,052$).

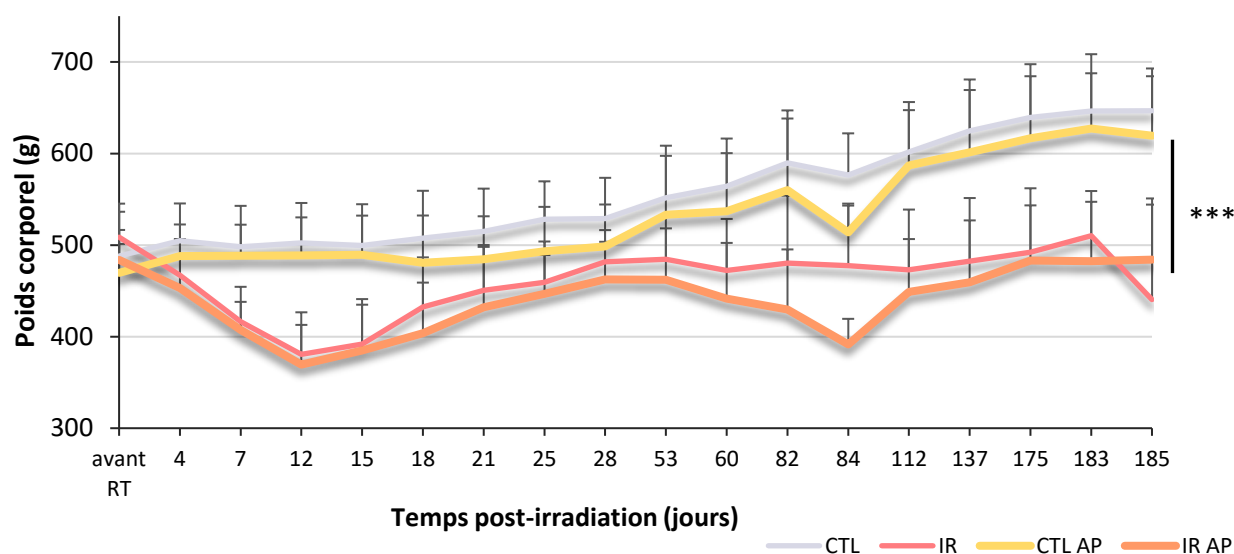


Figure 126 : Suivi du poids corporel des animaux contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP) jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale. Moyenne + SD ; CTL n=6-20, IR n=5-24, CTL AP n=6-20, IR AP n=5-24 selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec *** $p < 0,0001$.

Ces résultats confirment donc le lien de cause à effet entre l'irradiation cérébrale et la perte de poids observée chez les animaux exposés aux RI, qu'ils soient irradiés seuls ou soumis à un protocole d'AP régulière. Ainsi, la pratique d'une AP régulière après exposition aux rayons X ne permet pas de palier la perte de poids engendrée par l'irradiation cérébrale.

- Etat Général

Nous nous sommes alors attardés à comparer les données du suivi du poids des animaux au score d'état général mis en place. Le score d'état général basé sur la quantification de caractéristiques physiques (cf. Matériels et Méthodes page 151) est initialement d'environ 30 chez tous les animaux au début du protocole. Il semble relativement stable dans le temps chez les rats CTL et CTL AP. Néanmoins ces derniers ont tendance à présenter un meilleur score d'état général que les contrôles à partir de 2,5 mois après irradiation, sans que cela ne dépasse le seuil de significativité (**Figure 127**). La pratique de l'AP sans traitement par RT semble donc améliorer l'état général. Il s'agit à présent de déterminer si cette pratique améliore également la condition des animaux soumis à un protocole d'irradiation cérébrale.

En comparant les groupes IR AP et CTL AP, nous remarquons 6 temps durant lesquels le score entre ces deux groupes est significativement différent. Résultat illustré sur la **Figure 127**. De la même manière que lors de la 1^{ère} étude, lorsque nous comparons les groupes

contrôle et irradié, les rats IR AP présentent un score d'état général significativement plus faible dès la première semaine après irradiation avec une médiane de 25 contre 28 chez les CTL AP. Ceci se traduit là encore par la présence progressive de porphyrine au niveau du museau qui lui est légèrement gonflé mais également une salivation plus importante. Chez certains animaux nous pouvons aussi observer des traces de porphyrine au niveau des pattes avant, accompagnées dans certains cas de pelades. De plus, le poil apparaît globalement plus sale à ce moment de l'étude chez les rats IR AP que chez les CTL AP. En revanche, leur état général s'améliore rapidement (dès la 2^e semaine post-irradiation) pour atteindre le même niveau que celui des CTL AP 3 semaines après irradiation (**Figure 127**). De plus, le score des IR AP apparaît supérieur à celui des irradiés sur cette période de récupération. Il existe cependant des différences significatives entre ces deux groupes de rats irradiés (irradié et IR AP) à J7 ($p=0,03$) et M4 ($p=0,04$). Le score d'état général des animaux irradiés soumis à l'AP est alors inférieur à celui des irradiés ne pratiquant pas de course. Néanmoins, à partir de M4 et jusqu'à la fin de l'étude nous ne relevons aucune différence entre les groupes IR AP et CTL AP, signe d'une récupération tardive de leur condition après irradiation (**Figure 127**).

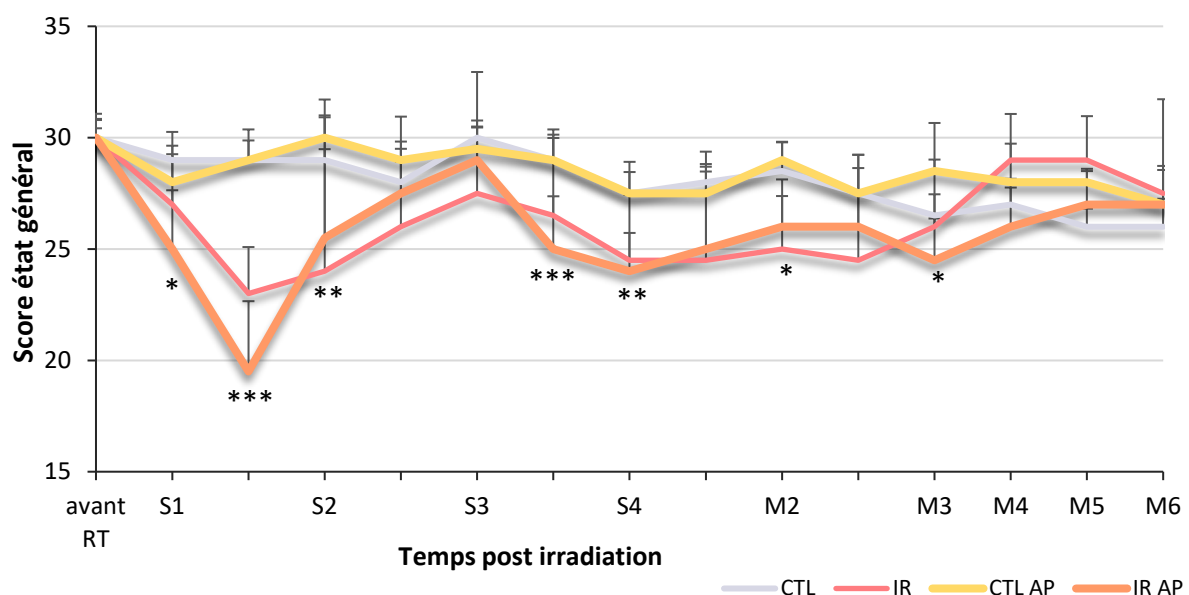


Figure 127 : Score d'état général des rats contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP) jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale. Le score d'état général évalue à la fois la posture (dos voûté, tête baissée), l'aspect du corps (poils...) mais aussi la tête (pelades, saignements, lésions cutanées), les yeux (porphyrine, yeux mi-clos), le nez (porphyrine, gonflement, salivation) et l'état des pattes avant (porphyrine, pelades). Chaque item est scoré selon 0 = absence ; 1 = présence ; 2 = forte présence. Un animal présentant un bon état général doit donc avoir un score proche de 6. Toutefois pour une meilleure lisibilité des résultats, le score de chaque animal à chaque temps d'étude a été soustrait de 30, ce qui amène à avoir le score maximal de 30 pour un rat avec un bon état général. Le temps post-irradiation représenté sur l'axe des abscisses est exprimé en semaines (S) ou en mois (M). Médiane + SD. CTL n=4-10 ; IR n=6-12 ; CTL AP n=4-10 et IR AP n=6-12 rats selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post hoc LSD de Fisher avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$. Les résultats statistiques présentés ici correspondent à la comparaison des groupes IR AP et CTL AP.

L'irradiation cérébrale induit donc, même chez les individus avec une pratique d'activité physique (IR AP), une atteinte aiguë de l'état général. En revanche, contrairement aux animaux irradiés seuls, les rats irradiés AP présentent une première phase de récupération au cours de la 2^e et la 3^e semaine suivant l'irradiation. De plus, le score présenté par ces animaux est similaire à celui des CTL AP dès M4 post-irradiation et dépasse le score des rats contrôles lors de la phase tardive (M5-M6). L'AP semble donc accélérer la récupération de l'état général des animaux lors des phases précoce et tardive, même si elle induit un plus grand déficit de façon aiguë chez les animaux irradiés.

- Evaluation de la survie

Le suivi de la survie des animaux tout au long du protocole nous a permis d'observer des différences significatives entre les quatre groupes d'étude. Les résultats confirment le fait que la mortalité chez les animaux irradiés seuls (IR) est significativement plus importante que chez les animaux contrôle (CTL) ($p=0,019$) (**Figure 128**). En revanche, les deux groupes soumis au protocole d'AP (CTL AP et IR AP) ne présentent aucune différence de taux de survie vis-à-vis du groupe de rats contrôle (**Figure 128**). La survie moyenne pour chaque groupe était respectivement de 195,08j (CTL) ; 200j (CTL AP) ; 186,09j (IR AP) et seulement de 168,3j (IR).

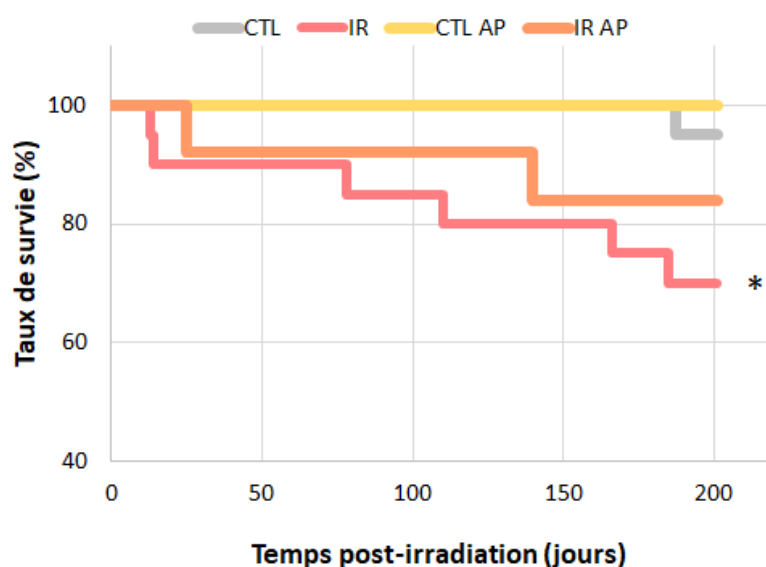


Figure 128 : Courbes de Kaplan-Meier illustrant la survie des individus contrôles (CTL), irradiés (IR) contrôles AP (CTL AP) et irradiés AP (IR AP) réalisée jusqu'à 6 mois après irradiation encéphalique. CTL, $n=25$; IR, $n=20$; CTL AP, $n=10$; IR AP, $n=12$. Test de log-rang, * $p < 0,05$.

La pratique de l'AP augmenterait ainsi les chances de survie après irradiation cérébrale.

I – 2 Fatigue et activité locomotrice

- Fatest

Le test de fatigue, Fatest, a été mis au point dans le but d'avoir un outil permettant de mesurer de façon quantitative la fatigue induite chez les animaux. Deux paramètres d'étude ont été retenus : 1) le score de fatigue obtenu par analyse de l'emplacement de l'animal sur le dispositif au bout de 5 sec et 2) le temps mis par chaque rat pour atteindre la plateforme au sommet du dispositif.

Tout d'abord le score de fatigue nous indique aucune différence entre les deux groupes contrôles (CTL et CTL AP) ainsi qu'entre les deux groupes irradiés (IR et IR AP). Néanmoins les rats irradiés présentent un score significativement plus faible que celui des contrôles à M2, M3 et M6 post-irradiation (**Figure 129 A**). En revanche les irradiés pratiquant une activité physique régulière (IR AP) présentent un score significativement plus faible que les CTL AP uniquement 3 semaines après irradiation (**Figure 129 A**). Ainsi les deux groupes irradiés (IR et IR AP) semblent présenter un moins bon score de fatigue vis-à-vis des contrôles de façon globale. Dès la 2^e semaine, et jusqu'à 6 mois, les irradiés auront un score plus faible que les contrôles. En revanche, les IR AP, même s'ils semblent également affectés à partir de la 2^e semaine, obtiennent un score de fatigue comparable à celui des contrôles lors de la phase tardive (M4-M6) (**Figure 129 A**). Alors que les irradiés sont significativement plus fatigués que les contrôles au regard de ce score à M6.

Ce score n'ayant pas pu être exploité lors de l'étude 1, il convient de comparer le deuxième paramètre pris en compte : le temps mis pour atteindre le sommet. Une nouvelle fois, les données obtenues ne montrent aucune différence significative entre les groupes CTL et CTL AP et IR et IR AP. En outre, les groupes IR et IR AP ont des profils similaires avec une augmentation significative du temps mis pour atteindre le sommet en S2, accompagnée d'une tendance en S3 vis-à-vis de leur groupe contrôle respectif (CTL ou CTL AP) (**Figure-129 B**). En revanche, les IR AP ne sont significativement pas différents des CTL AP (sauf en S2). Ainsi, si les animaux irradiés semblent mettre plus de temps que les animaux témoins tout au long de l'étude, les animaux irradiés AP expriment une fatigue aiguë puis récupèrent, ils mettent alors le même temps que les animaux contrôles pour atteindre le haut du dispositif (**Figure 129 B**).

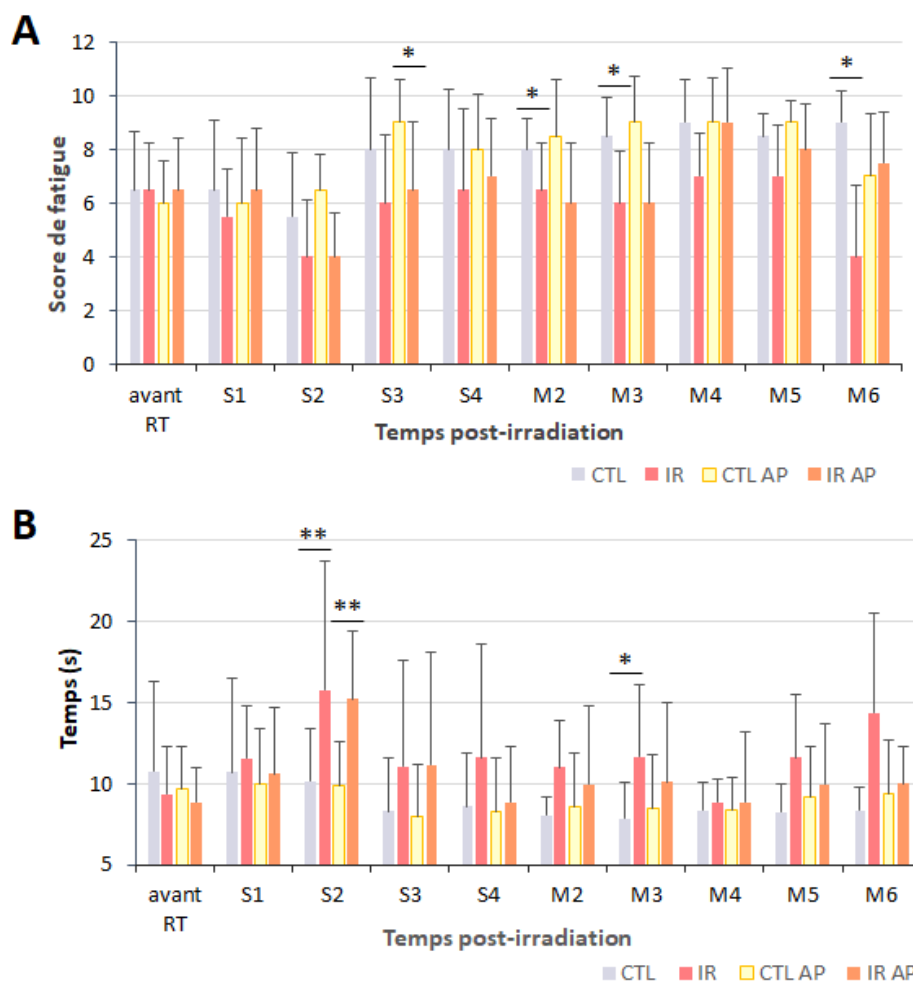
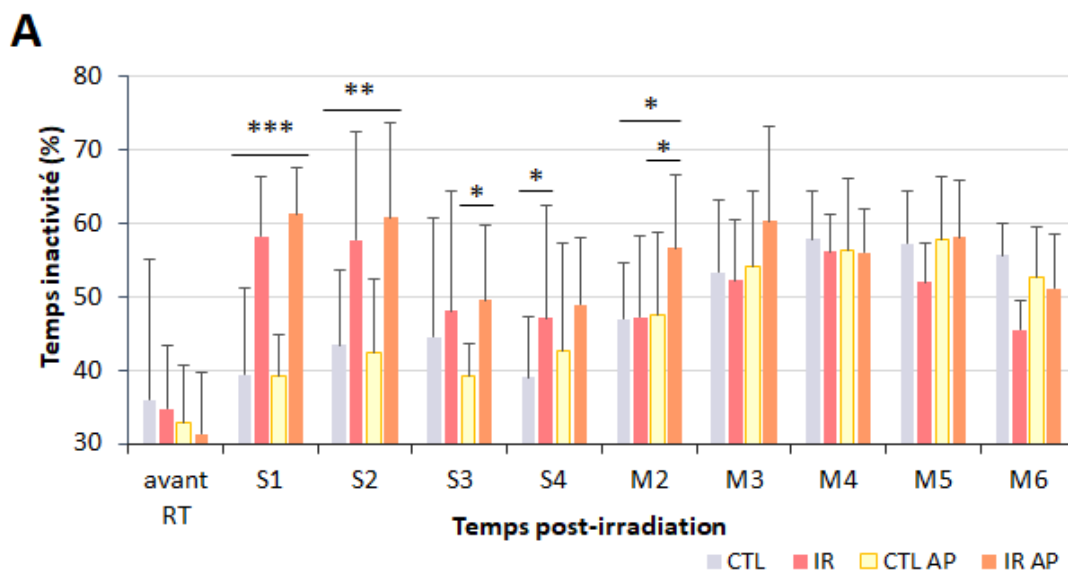


Figure 129 : Evaluation quantitative de l'état de fatigue avec le Fatest des rats contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP) jusqu'à 6 mois après irradiation cérébrale. (A) Score de fatigue obtenu par l'emplacement de l'animal sur le dispositif à 5sec. Médiane $\pm$ SD. (B) temps mis pour atteindre le sommet du dispositif. Temps post-irradiation présenté en abscisse exprimé en semaine (S) ou en mois (M). Moyenne $\pm$ SD ; CTL, n=3-10 ; IR, n=3-12 ; CTL AP, n=4-10 et IR AP, n=6-12 rats selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p<0,05$ et ** $p<0,01$.

Les deux paramètres étudiés confirment la présence d'une fatigue radio-induite dès la deuxième semaine et accentuée dans le temps après traitement. Toutefois nous observons un réel effet bénéfique de la pratique de l'AP après irradiation puisque celle-ci permet aux animaux inclus dans ce groupe une récupération de ces symptômes de façon précoce (S4 post-RT).

- Open field

L'évaluation de l'activité locomotrice met en évidence aucune différence entre les deux groupes contrôles (CTL et CTL AP). Les rats IR AP, à l'instar des IR, sont significativement plus inactifs que les CTL AP et CTL en S1 et S2 (**Figure-130 A**). De plus, les IR AP sont plus inactifs que les CTL AP en S3 et M2 post-irradiation (**Figure 130 A**). Alors qu'un mois après irradiation nous ne notons aucune différence entre les groupes contrôle et irradié. De plus, les IR AP apparaissent plus inactifs que les IR deux mois après irradiation (**Figure 130 A**). L'inactivité des rats IR par rapport aux CTL est associée à une distance parcourue nettement inférieure en S1, S2 et S4. De plus, nous observons une distance parcourue par les IR AP significativement inférieure à celle parcourue par les CTL AP lors du premier mois après irradiation (**Figure 130 B**). A partir du 2^e mois, nous ne relevons cependant aucune différence entre les groupes. En revanche, il y a de nombreuses différences entre les groupes en termes de vitesse de déplacement. En effet, si les animaux irradiés se déplacent globalement moins vite que les contrôles tout au long de l'étude. Les animaux IR AP ne présentent toutefois pas de différence significative vis-à-vis des CTL AP lors des phases aiguës et précoce (S1-S2 et S4) après irradiation (**Figure 130 C**). Ainsi, même si les IR AP sont significativement plus inactifs et parcourent une plus faible distance que les CTL AP lors de la phase aiguë, ils se déplacent à la même vitesse et inversement lors de la phase tardive (**Figure 130**).



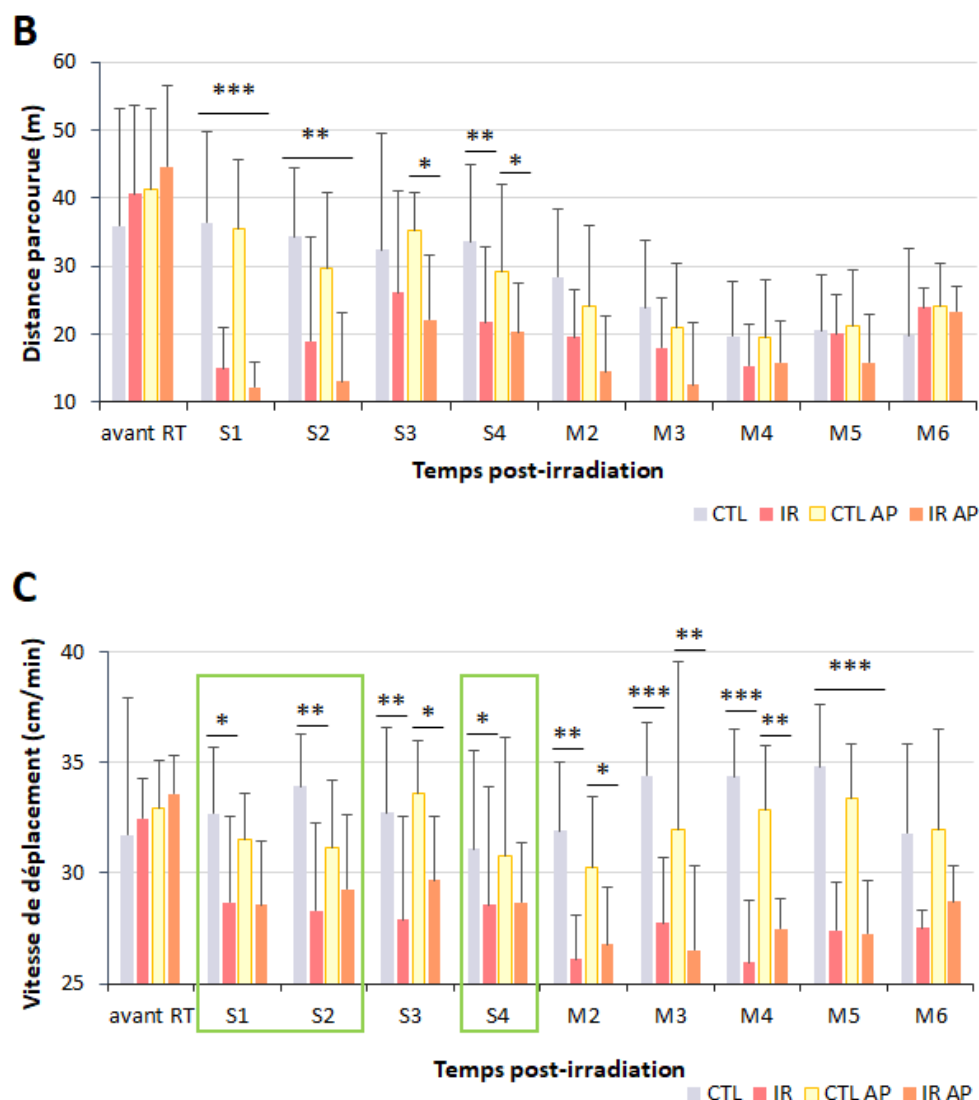


Figure 130 : Evaluation de l'activité locomotrice des animaux contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP) jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale avec le test de l'Open field. (A) Temps d'inactivité des rats. (B) Distance parcourue pendant la durée du test et (C) Vitesse de déplacement des rats. Temps post-irradiation présenté en abscisse exprimé en semaine (S) ou en mois (M). Moyenne $\pm$ SD ; CTL, n=8-14 ; IR, n=11-19 ; CTL AP, n=8-14 et IR AP, n=12-19 selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

L'évaluation de la fatigue par l'analyse conjointe des résultats du Fatest et de l'activité locomotrice des rats tout au long de l'étude met en évidence des altérations précoces induites par le traitement aux rayonnements ionisants durant les 3 premières semaines mais également de façon plus tardive deux mois après. Néanmoins, la pratique d'une AP, si elle n'apporte pas de bénéfices supplémentaires aux animaux contrôles, apparaît comme vecteur de récupération chez les animaux irradiés. En effet, ces derniers présentent des performances assimilables aux contrôles dès le 2^e mois post-irradiation et jusqu'à la fin de l'étude contrairement aux animaux irradiés seuls.

I – 3 Cognition

L'aspect cognitif des effets de l'irradiation cérébrale, a été évalué principalement par le prisme de la mémoire. Deux tests ont été retenus dans la batterie d'examens afin d'évaluer à la fois la mémoire à court terme et à long terme : le test de reconnaissance d'objet qui évalue ici la mémoire de référence à court terme et le test d'évitement passif évaluant la mémoire contextuelle à long terme.

- Mémoire à court-terme (test de reconnaissance d'objet)

Trois paramètres ont été retenus pour l'analyse du test de reconnaissance d'objet : le temps d'exploration globale (des deux objets confondus) exprimé en pourcentage, l'indice de discrimination de l'objet nouveau et enfin la fréquence d'exploration de l'objet nouveau. Si les deux groupes contrôles ne présentent aucune différence en terme d'exploration globale tout au long de l'étude, les résultats montrent une atteinte de la discrimination de l'objet nouveau à M5 post-irradiation chez les individus CTL vis-à-vis des CTL AP. En revanche, M4 post-irradiation nous observons une fréquence d'exploration de l'objet nouveau nettement diminuée chez les CTL AP par rapport aux CTL (**Figure 131**). La comparaison des groupes contrôle et irradié conforte les résultats obtenus dans la 1^{ère} étude à savoir une atteinte de la mémoire à court terme radio-induite de façon aiguë (S1, S2) suivi d'une deuxième phase de troubles plus tardifs (M5). Nous n'observons aucune différence significative entre les groupes CTL AP e IR AP tout au long de l'étude, que ce soit dans la capacité à discriminer les objets ou la fréquence d'exploration de l'objet nouveau. Cependant, les IR AP explorent significativement plus les objets que leurs contrôles en S2 et M2 post-irradiation (**Figure 131 A**). Ils explorent également plus que les rats irradiés en S2. Cependant cela ne se traduit pas par une exploration accrue de l'objet nouveau. En effet, les animaux IR AP présentent un indice de discrimination et une fréquence d'exploration de l'objet nouveau inférieurs à ceux des irradiés seuls une semaine après irradiation (**Figure 131 B, C**).

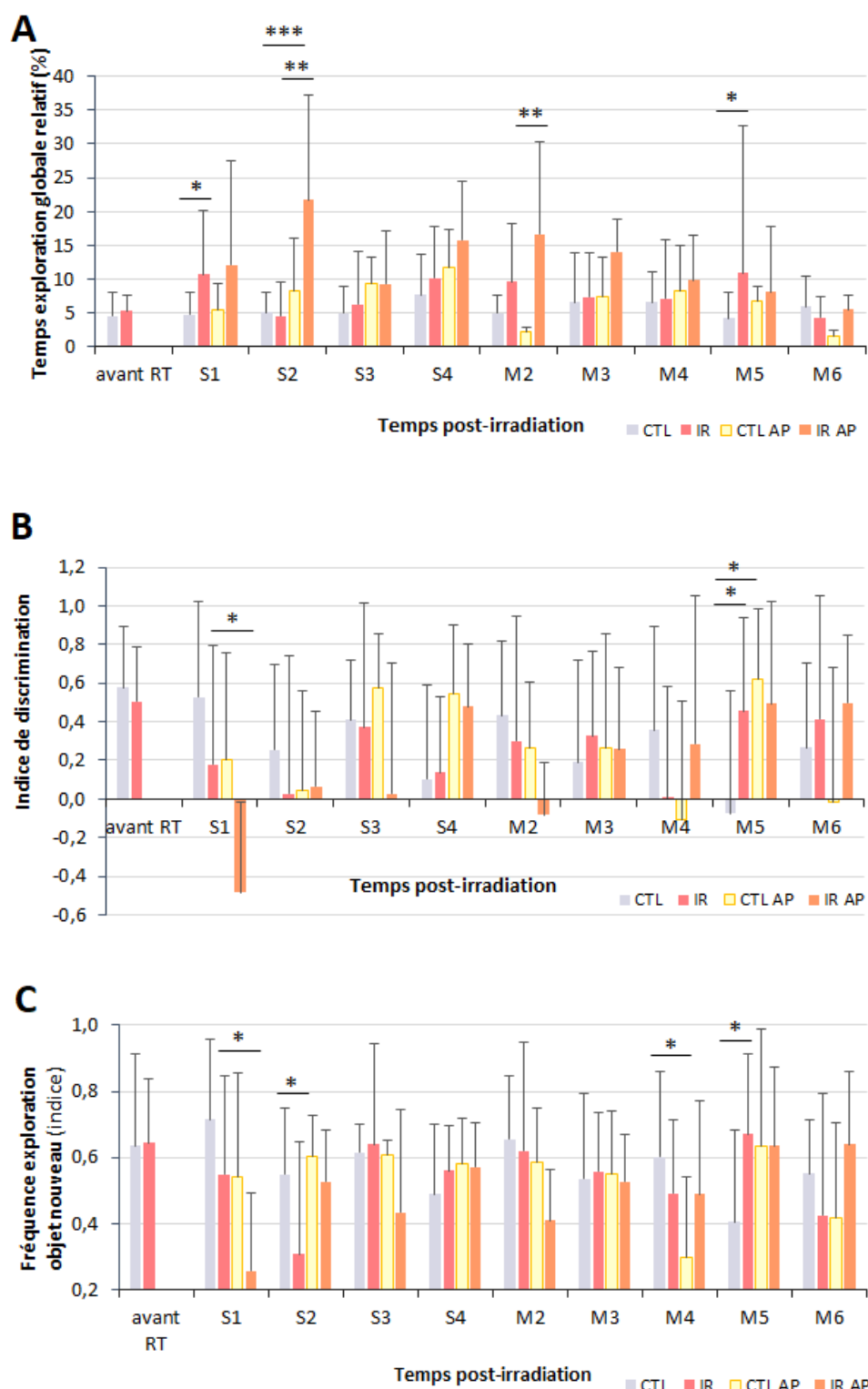


Figure 131 : Evaluation de la mémoire à court terme des animaux contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP) jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale avec le test de reconnaissance d'objet. Plusieurs paramètres ont été mesurés : **(A)** le temps d'exploration relatif des deux objets présentés (%) ($T_{\text{nouv.}} + T_{\text{fam.}}$) / 180, **(B)** l'indice de discrimination de l'objet nouveau calculé à partir des temps d'exploration de l'objet nouveau ($T_{\text{nouv.}}$) et familier ($T_{\text{fam.}}$) : $\frac{T_{\text{nouv.}} - T_{\text{fam.}}}{T_{\text{nouv.}} + T_{\text{fam.}}}$ et **(C)** l'indice de fréquence d'exploration de l'objet nouveau ($\frac{\text{Freq. nouv.}}{\text{Freq. nouv.} + \text{Freq. fam.}}$). Temps post-irradiation présentés en abscisse en semaine (S) ou en mois (M). Moyenne + SD ; CTL n=12 rats ; IR n= 11-14 ; CTL AP n=4 et IR AP n=6 rats selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,0001$.

En prenant en compte, l'ensemble de ces paramètres relevés lors du test de reconnaissance d'objet, il semble que les animaux irradiés soumis à une activité physique régulière présentent malgré tout, des déficits de la mémoire à court terme lors de la 1^{ère} semaine et du 2^e mois suivant le traitement. Néanmoins, les performances de ce groupe sont assimilables à celles des individus contrôles alors que l'étude 1 nous avait permis d'établir certains troubles de la mémoire à court terme plus tardifs (M4). De plus, l'AP permet de palier les déficits à la fin de la phase aiguë (S2).

- Mémoire à long-terme (test de l'évitement passif)

En soumettant l'ensemble des rats au test de l'évitement passif, nous souhaitons obtenir une mesure de la mémoire à long terme de façon longitudinale durant l'étude. Si la première étude nous a permis de mettre en lumière des atteintes tardives de la mémoire à long terme (M4 à M6) après irradiation, ici les résultats sont moins évidents à interpréter. En effet, les rats irradiés présentent un déficit vis-à-vis des contrôles uniquement deux mois après irradiation. De plus, la latence pour changer de compartiment des CTL est significativement plus faible que celle des CTL AP 6 mois après irradiation ce qui laisserait supposer un déficit mnésique chez les CTL et/ou un effet temps compensé par la pratique de l'activité physique. Enfin, les IR AP ont une latence significativement plus faible que celle des CTL AP et IR un mois après irradiation sans atteindre le seuil de significativité par rapport au groupe CTL (**Figure 132**).

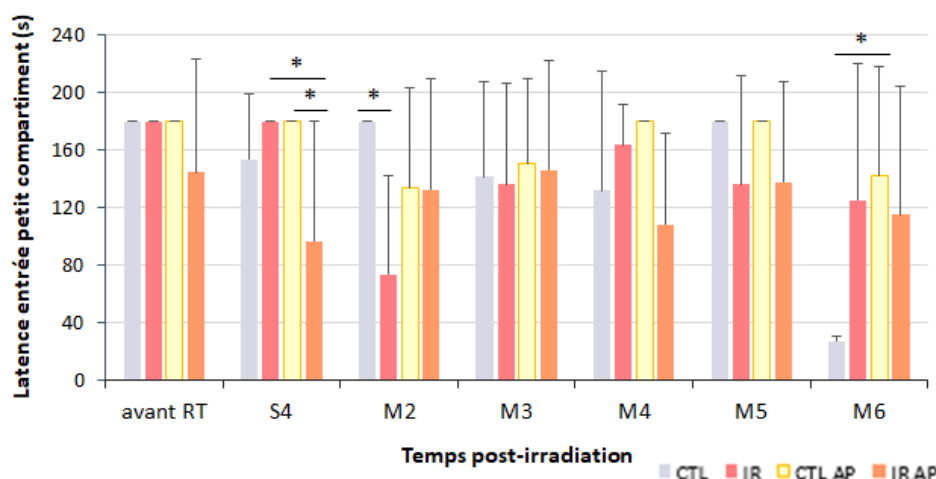


Figure 132 : Evaluation de la mémoire à long terme des rats contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP) avec le test de l'évitement passif jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale. Temps post-irradiation présenté en abscisse exprimé en semaine (S) ou en mois (M). Moyenne + SD. CTL n=3 ; IR n=3-6, CTL AP n=4 ; IR AP n=5 rats selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$.

Au regard des données obtenues, il paraît inapproprié de conclure sur l'effet de l'irradiation et/ou de l'AP sur la mémoire à long terme. D'une part le groupe IR AP semble présenter un déficit précoce (S4) par rapport à ces deux groupes témoins (CTL AP et IR), d'autre part, nous n'observons aucune différence significative entre les IR AP et les contrôles tout au long de l'étude. De plus, l'irradiation seule engendre des troubles mnésiques uniquement le 2^e mois suivant la WBRT alors que l'irradiation en condition AP induit des troubles uniquement le 1^{er} mois.

I – 4 Anxiété et anhédonie

• Open field

En mesurant le temps passé au centre de l'open field au cours d'une période exploratoire de 10 minutes, nous observons une diminution progressive au cours du temps dans l'ensemble des quatre groupes. Les deux groupes contrôles (CTL et CTL AP) ne sont significativement pas différents tout au long de l'étude. De plus, les animaux irradiés (IR et IR AP) passent significativement moins de temps au centre du dispositif que les CTL et CTL AP respectivement une semaine après irradiation (**Figure 133**). Néanmoins les IR AP passent plus de temps dans la zone centrale que les CTL AP avant irradiation mais moins que les irradiés uniquement en S2.

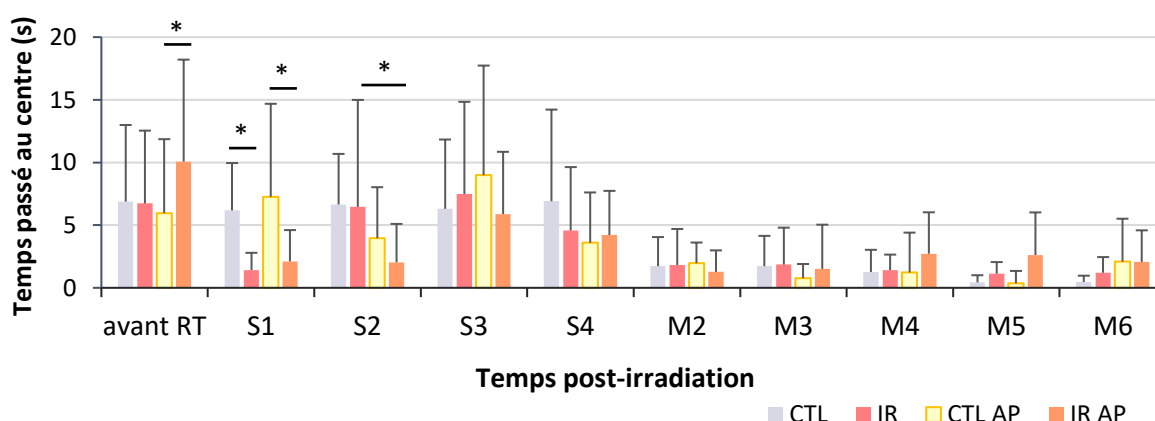


Figure 133 : Evaluation du comportement de type anxiété chez les rats contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP) avec le test de l'Open field. Le temps passé au centre de l'enceinte, connu pour être anxiogène pour les rongeurs, a été utilisé comme indicateur d'anxiété. Temps post-irradiation présenté en abscisse exprimé en semaine (S) ou en mois (M). Moyenne + SD ; CTL n=8-14 ; IR n=11-19 ; CTL AP n=8-14 et IR AP n=12-18 rats selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivi d'un test post-hoc LSD Fisher. * $p < 0,05$.

Ainsi, selon ce paramètre l'irradiation induit une anxiété lors de la phase aiguë (S1). En revanche, les animaux irradiés soumis à une AP semblent passer plus de temps que les autres groupes au centre du dispositif lors de la phase tardive (M4-M6) de l'étude.

- Splash test

Lors du splash test nous n'observons aucune différence entre les deux groupes irradiés tout au long de l'étude et ce, pour les deux paramètres considérés (% de temps passé à se toiletter et fréquence de toilettage). La comparaison des groupes contrôle et irradié nous indique que l'irradiation induit une diminution des comportements de toilettage à M4 (**Figure 134**) et une diminution de la fréquence de toilettage un mois post-irradiation (**Figure 134 B**). En outre, les rats du groupe CTL AP passent significativement moins de temps à se toiletter à M4 et se toilettent également moins fréquemment avant RT par rapport au groupe contrôle (**Figure 134**). Les CTL AP ont également tendance à passer moins de temps à se toiletter que les contrôles à partir de M2 après irradiation avec une fréquence moindre en M3, M4, M5 (**Figure 134**). A l'inverse, les résultats des IR AP sont comparables à ceux du groupe contrôle jusqu'au 2^e mois après irradiation, avant de brutalement s'effondrer tant en termes de pourcentage de temps que de fréquence de toilettage (**Figure 134**). Ainsi, les IR AP se toilettent aussi fréquemment que les CTL AP tout au long de l'étude mais moins longtemps lors de la phase tardive (M6) (**Figure 134 A**).

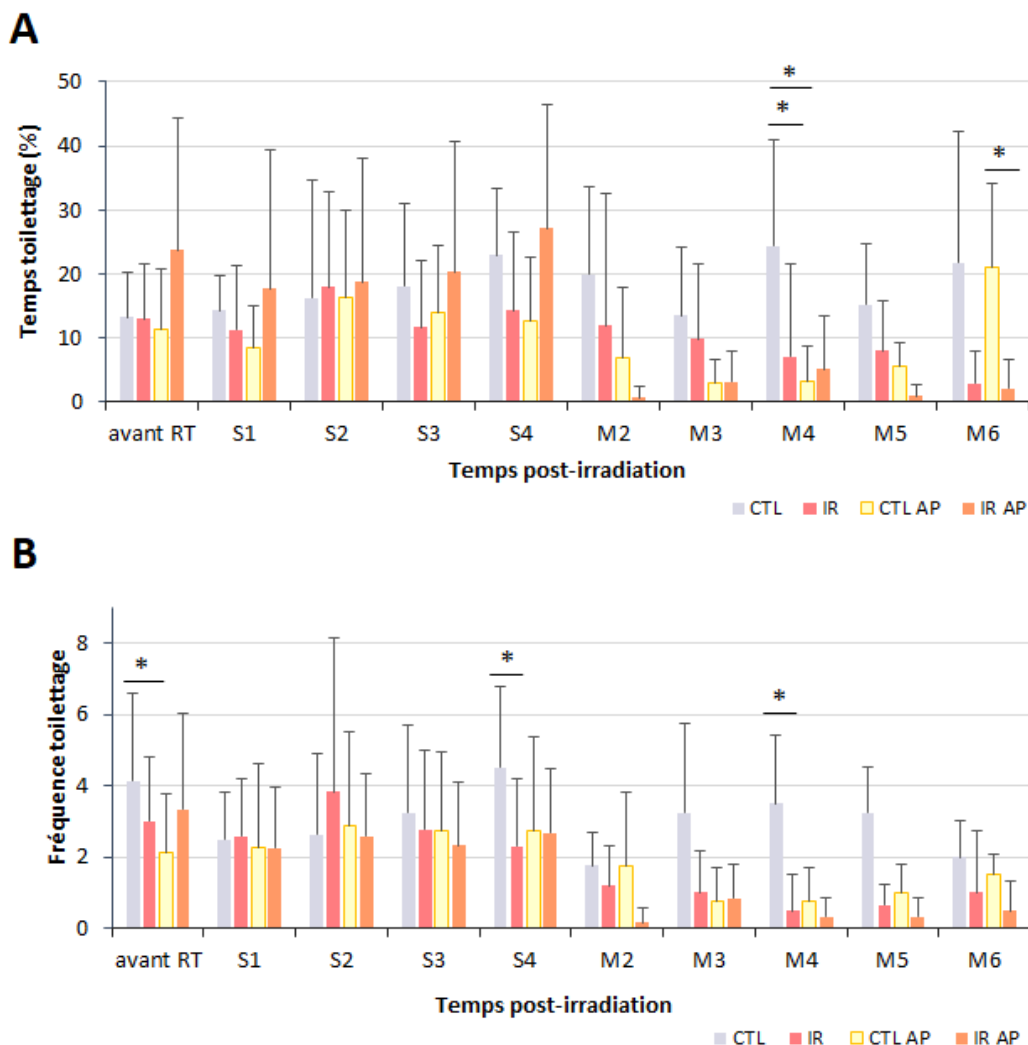


Figure 134 : Evaluation du comportement de type dépression à l'aide du Splash test chez les rats contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP). (A) pourcentage de temps passé à se toiletter. (B) fréquence de toilette. Moyenne + SD. CTL n=3-8 ; IR n=3-12 ; CTL AP n=4-8 ; IR AP n=6-12 rats selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$.

Il semblerait donc que les animaux AP, qu'ils soient irradiés ou non, répondent beaucoup moins à l'appétence de la solution sucrée que les animaux non soumis à une activité physique régulière. Cela pourrait traduire une certaine lassitude vis-à-vis de la tâche.

II – Evaluation par IRM de l'impact de l'activité physique sur les atteintes cérébrales radio-induites

II – 1 Impact de l'activité physique sur la vascularisation cérébrale : étude en IRM vasculaire

Nous nous sommes attardés à évaluer le volume sanguin cérébral dans chacune des régions d'intérêt suivantes : cortex, corps calleux, hippocampe, thalamus et striatum pour chaque groupe de rats 6 mois après irradiation afin d'une part de mesurer l'impact de l'irradiation sur le compartiment vasculaire et d'autre part d'évaluer l'apport de la pratique d'une activité physique régulière.

Tout d'abord, les groupes CTL et CTL AP présentent des valeurs de volume sanguin cérébral (VSC) similaires dans toutes les régions étudiées, excepté l'hippocampe (**Figure 135**). La comparaison des groupes contrôle et irradié nous indique que l'irradiation induit une diminution du VSC dans l'ensemble des ROI sélectionnées (**Figure 135**). Néanmoins, la comparaison des groupes CTL AP et IR AP indique une diminution du VSC après irradiation uniquement au niveau du corps calleux, de l'hippocampe et du thalamus. Aucune différence notable n'est relevée au niveau du cortex et du striatum 6 mois après irradiation.

De manière intéressante, nous observons plusieurs différences significatives entre les deux groupes irradiés. Tout d'abord au niveau du thalamus, le VSC des IR AP, bien qu'il soit inférieur à celui des CTL AP, est significativement supérieur à celui des IR (**Figure 135 D**). En outre, l'augmentation du VSC au niveau du cortex et du striatum chez les animaux irradiés pratiquant une AP vis-à-vis des irradiés seuls est assimilable aux valeurs obtenues chez les CTL AP dans ces structures (**Figure 135 A, E**).

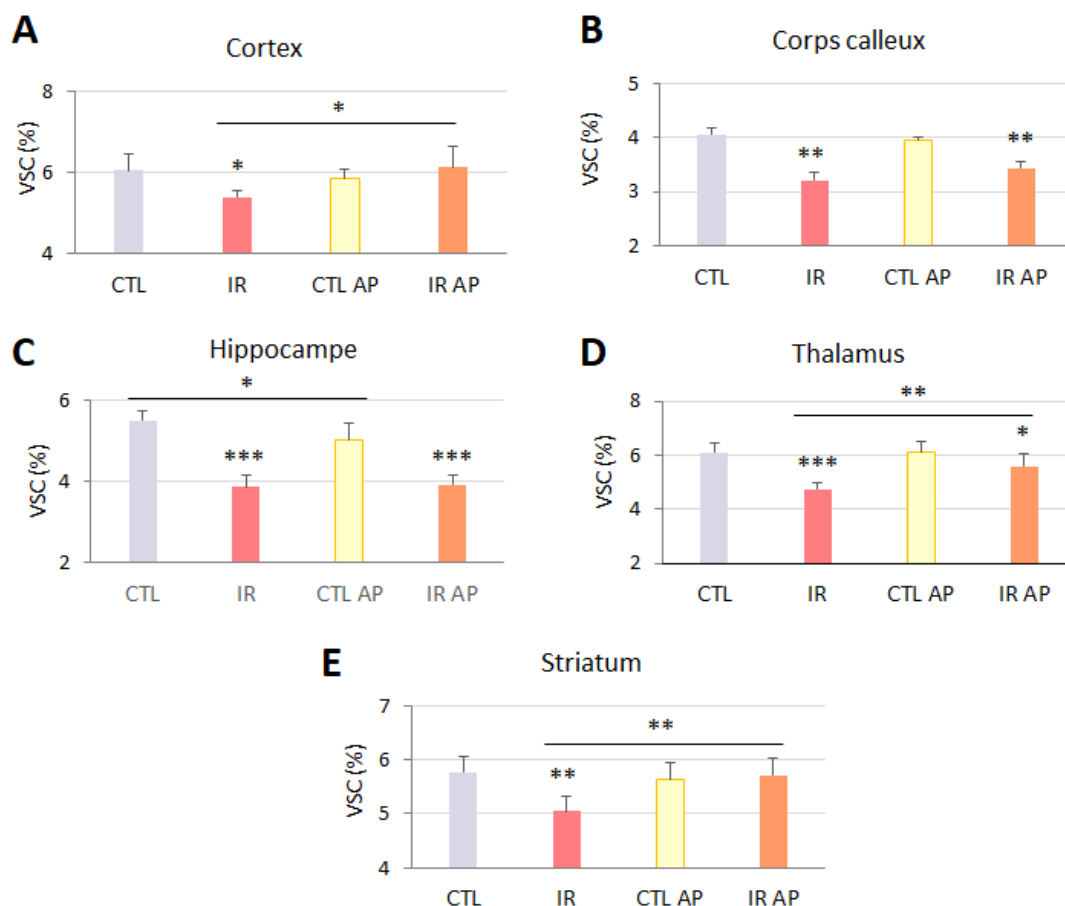


Figure 135 : Analyse par régions d'intérêt des effets de l'irradiation sur le volume sanguin cérébral (VSC) mesuré par IRM vasculaire. Valeurs de VSC chez les rats contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP) dans différentes structures cérébrales 6 mois après irradiation : **(A)** cortex, **(B)** hippocampe, **(C)** thalamus, **(D)** striatum et **(E)** corps calleux. Moyenne + SD ; N = 6 rats/groupe/temps. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,0001$.

II – 2 Impact de l'activité physique sur la microstructure cérébrale : étude en IRM de diffusion

L'IRM de diffusion permet d'étudier la microstructure du cerveau à travers différents paramètres : la diffusivité moyenne (MD), la diffusion axiale (AD) et la diffusion radiale (RD).

- **Diffusivité moyenne (MD)**

La diffusivité moyenne rend compte de la vitesse de déplacement des molécules d'eau dans le tissu. L'irradiation induit une diminution de la MD de façon précoce avec une diminution dans l'ensemble des structures d'intérêt à M1, retrouvée également à M3 à l'exception du thalamus (**Figure 136**). 6 mois après l'irradiation panencéphalique, seul l'hippocampe est encore impacté par rapport à celui des contrôles (**Figure 136 C**).

De plus, nous observons une diminution de la MD chez les CTL AP en comparaison des contrôles, 1 mois post-irradiation dans ces structures d'intérêt sauf le thalamus (**Figure 136 A, B, C**).

La comparaison des deux groupes AP nous indique une diminution de la MD radio-induite 3 mois après l'exposition aux rayons au niveau du cortex et du thalamus (**Figure 136 A, D**) et dans l'ensemble des ROI sélectionnées à 6 mois (**Figure 136**). Néanmoins, la MD des IR AP est significativement supérieure à celle des irradiés au niveau du thalamus, 1 mois post-irradiation mais significativement supérieure au niveau du cortex à M6 (**Figure 136 D, A**).

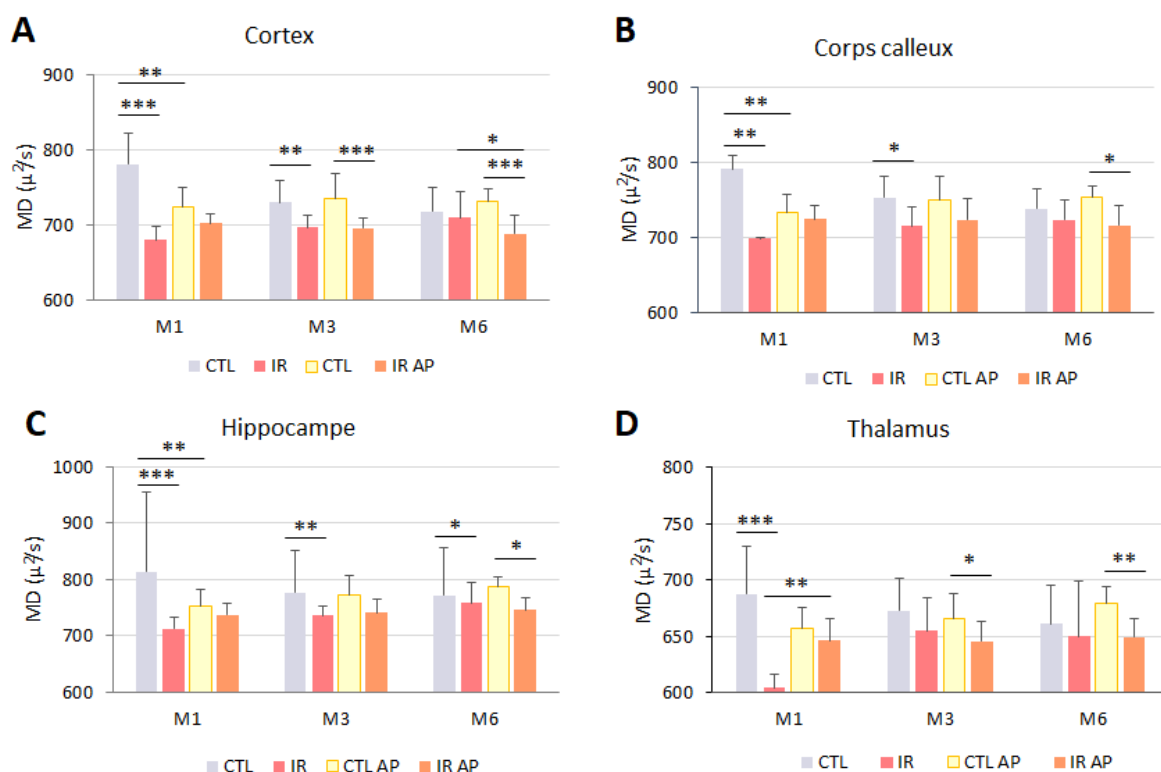


Figure 136 : Analyse par régions d'intérêt des effets de l'irradiation sur la diffusivité moyenne (MD) mesurée par IRM de diffusion. Evolution temporelle des valeurs de MD chez les rats contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP) dans différentes structures cérébrales : (A) cortex, (B) corps calleux, (C) hippocampe et (D) thalamus. Moyenne + SD ; CTL n=3-8 ; IR n=3-7 ; CTL AP n=3-9 et IR AP n=5-8 rats selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (temps et groupe) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,0001$.

D'une part ces résultats confortent ceux obtenus lors de la première étude, à savoir l'irradiation induit une augmentation de la densité cellulaire lors de la phase précoce (M1) qui pourrait s'expliquer par la présence accrue des cellules du système immunitaire. D'autre part, l'activité physique semble permettre l'atténuation de ces effets neuro-inflammatoires précoces radio-induits.

• La diffusivité axiale (AD)

L'irradiation cérébrale induit une diminution de la diffusivité axiale de façon précoce (M1, M3) dans l'ensemble des ROI mais également de façon tardive au niveau de l'hippocampe (**Figure 137**). Néanmoins, nous pouvons remarquer que la pratique de l'AP induit également une diminution précoce (M1) de l'AD dans la plupart de ces structures (corps calleux, cortex, hippocampe) en comparaison du groupe contrôle non soumis à un protocole d'AP (**Figure 137**). L'analyse de l'AD ne présente aucune différence entre les rats irradiés et IR AP tout au long de l'étude, quelle que soit la structure cérébrale considérée. En revanche, en comparant les IR AP et les CTL AP nous observons une diminution de l'AD radio-induite à M3 (cortex, thalamus) et à M6 dans l'ensemble des ROI (**Figure 137**).

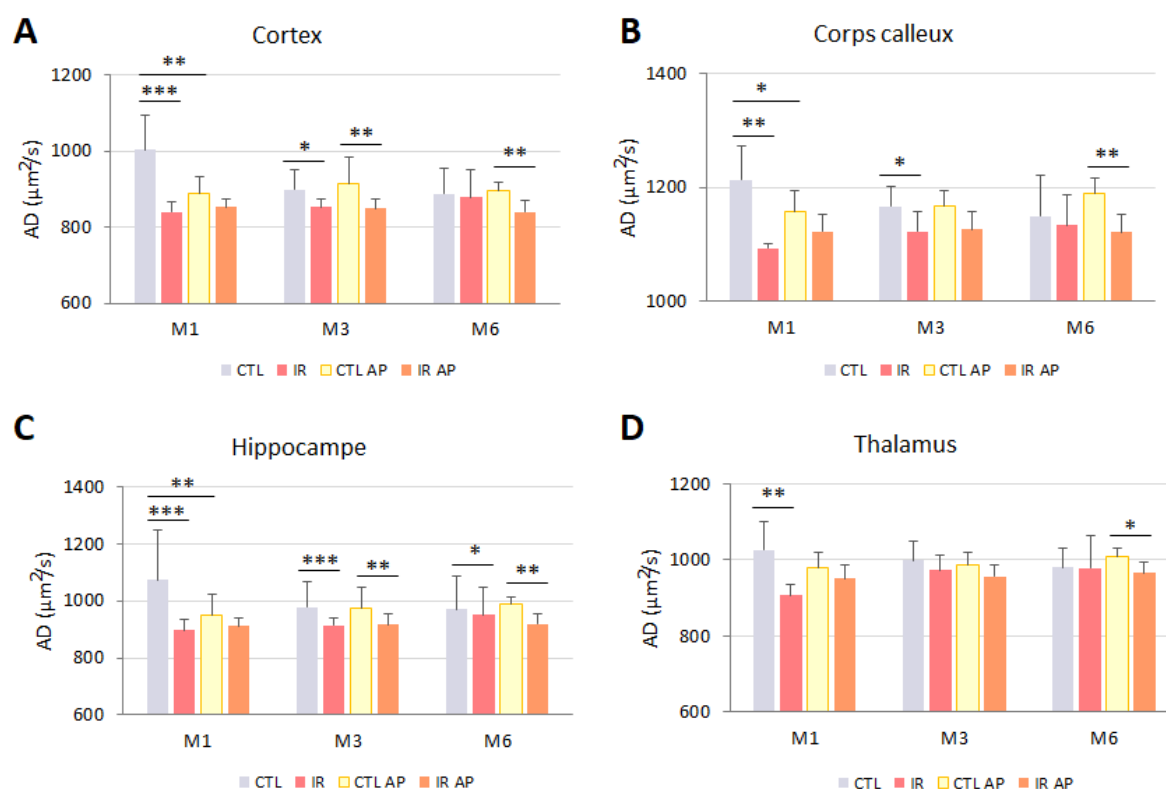


Figure 137 : Analyse par régions d'intérêt des effets de l'irradiation sur la diffusivité axiale (AD) mesurée par IRM de diffusion. Evolution temporelle des valeurs d'AD chez les rats contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP) dans différentes structures cérébrales : (A) cortex, (B) corps calleux, (C) hippocampe et, (D) thalamus. Moyenne + SD ; CTL n=3-8 ; IR n=3-7 ; CTL AP n=3-9 et IR AP n=5-8 rats selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,0001$.

La diffusivité axiale traduisant le coefficient de diffusion moyen des molécules d'eau perpendiculaires au tractus fibreux, nous pouvons alors supposer que l'irradiation induit une dégénérescence axonale ou une gliose essentiellement précoce. Tandis que la pratique de l'AP après irradiation semble permettre de retarder cette dégénérescence puisque les atteintes sont observées plus tardivement à partir de M3 dans certaines structures et à M6 dans l'ensemble des ROI.

- **La diffusivité radiale (RD)**

L'irradiation induit une diminution du coefficient de diffusion radiale à moyen et long terme (**Figure 138**). De plus, l'AP seule contribue également à diminuer la RD de façon précoce (corps calleux, cortex, hippocampe) mais également tardive au niveau du corps calleux. Néanmoins, la comparaison des deux groupes AP nous indique cette fois une diminution de la RD radio-induite à M3 au niveau du cortex et à M6 au niveau du cortex et du thalamus (**Figure 138 A, D**). En revanche, nous n'observons aucune différence significative au niveau du corps calleux et de l'hippocampe (**Figure 138 B, C**). De plus, si la RD des IR AP n'est pas différente de celle des irradiés au niveau du corps calleux et de l'hippocampe, elle est significativement supérieure un mois après irradiation au niveau du cortex et du thalamus (**Figure 138 A, D**).

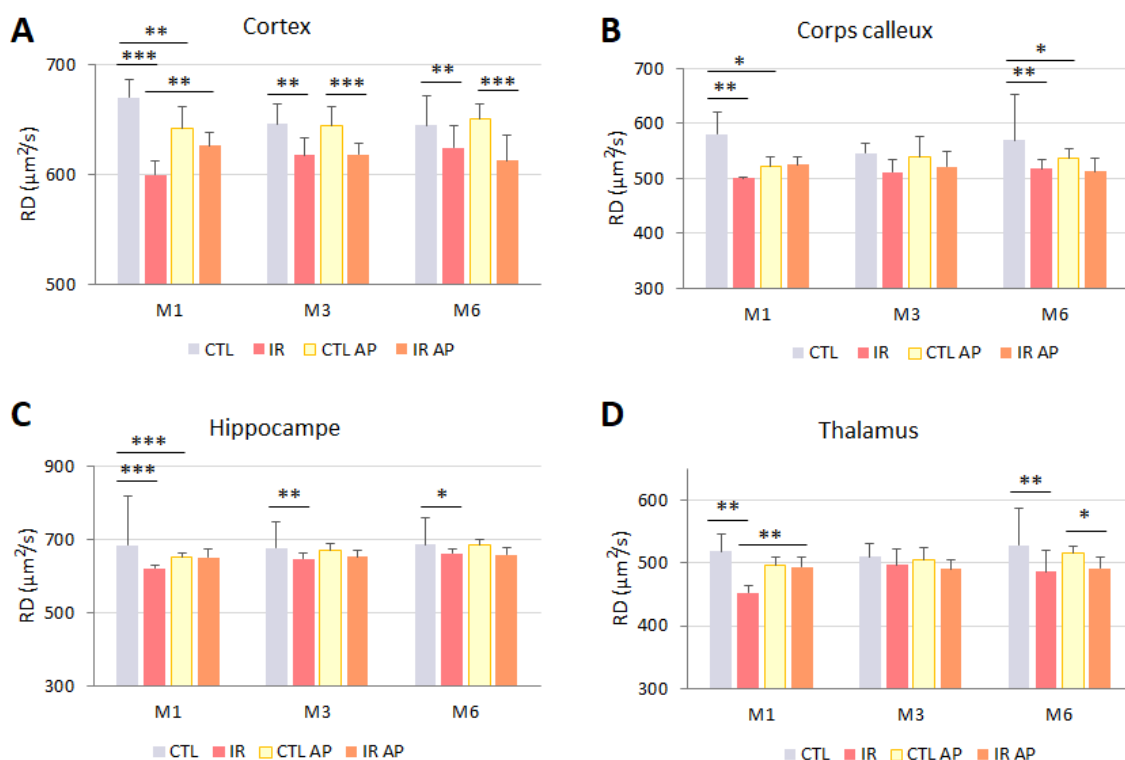


Figure 138 : Analyse par régions d'intérêt des effets de l'irradiation sur la diffusivité radiale (RD) mesurée par IRM de diffusion. Evolution temporelle des valeurs de RD chez les rats contrôles (CTL), irradiés (IR), contrôles activité physique (CTL AP) et irradiés activité physique (IR AP) dans différentes structures cérébrales : **(A)** cortex, **(B)** corps calleux, **(C)** hippocampe et **(D)** thalamus. Moyenne + SD ; CTL n=3-8 ; IR n=3-7 ; CTL AP n=3-9 et IR AP n=5-8 selon le temps étudié. ANOVA à 2 facteurs (effets groupe et temps) suivie d'un test post-hoc LSD Fisher avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,0001$.

Ainsi, la pratique de l'AP suite à une irradiation cérébrale permet de prévenir la diminution du coefficient de diffusion radiale radio-induite de façon précoce mais ne semble pas en mesure de le préserver sur du plus long terme.

Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus lors de notre étude préclinique sur les effets de l'activité physique, pratiquée de manière régulière et sur le long terme, dans un modèle de radiotoxicité cérébrale chez le rat adulte sont en faveur d'effets bénéfiques sur les atteintes neuropathologies radio-induites. En effet, nous avons observé que l'AP permet, d'une part, une amélioration de l'état général des animaux dans les premières semaines après irradiation puis de façon plus tardive et, d'autre part, cette intervention non-médicamenteuse augmente significativement le taux de survie après irradiation cérébrale. De manière très intéressante, l'AP permet de réduire la fatigue des animaux lors du premier mois après irradiation et

améliore aussi les atteintes locomotrices observées après irradiation panencéphalique. De plus, l'AP pratiquée chez les rats irradiés permettrait de palier les déficits de mémoire à court terme lors de la phase aiguë. L'étude réalisée par IRM nous a permis de mettre en évidence que le volume sanguin cérébral qui est diminué à 6 mois post-irradiation peut être amélioré par l'AP. Ces résultats laissant suggérer des effets protecteurs de l'AP vis-à-vis des dommages vasculaires radio-induits. De même, les données obtenues en IRM de diffusion, notamment à 1 mois après irradiation sont en faveur de bienfaits de l'AP au niveau de l'organisation microstructurale/cytoarchitecture du cerveau.

En résumé, les résultats de cette étude témoignent de l'intérêt de l'AP pour atténuer les atteintes neuropathologiques (dommages tissulaires, déficits cognitifs et fatigue) induites par l'irradiation cérébrale, notamment lors du premier mois. Toutefois, les bienfaits de l'AP dans la radiotoxicité cérébrale semblent s'amenuiser au cours du temps. De plus, toutes les données de comportement et d'imagerie ont été obtenues sur un faible échantillonnage, il sera donc nécessaire de conforter ces résultats en réalisant de nouvelles études pour augmenter le nombre d'animaux par groupe.

DISCUSSION

La radiothérapie (RT), qu'elle soit panencéphalique ou partielle, est une thérapie majeure des tumeurs primitives du cerveau et des métastases cérébrales. A cause du fort pouvoir pénétrant des rayons X, le tissu cérébral avoisinant la tumeur est également irradié, ce qui provoque des altérations neurologiques se traduisant par des atteintes anatomiques et fonctionnels engendrant des dysfonctionnements cognitifs qui impactent négativement la qualité de vie des patients long survivants.

La neurotoxicité radique se subdivise 3 phases d'apparition des lésions cérébrales : aiguë, précoce et tardive (Greene-schloesser & Robbins, 2012). Les symptômes dans la phase aiguë (œdème, somnolence, alopecie et fatigue), se manifestant dans les jours et semaines après la RT, sont cliniquement limités grâce à l'utilisation de nouvelles techniques de RT (IMRT, Radiothérapie stéréotaxique, Radiochirurgie, Hadronthérapie...) qui visent à déposer le maximum de dose dans la tumeur tout en épargnant le plus possible le tissu cérébral sain. Les atteintes cérébrales précoces surviennent 1 à 6 mois après l'irradiation. Elles regroupent la rupture de la BHE associée à une neuroinflammation, des altérations de la neurogenèse, un processus de démyélinisation transitoire ou une perte de fonction des oligodendrocytes. Toutes ces modifications cérébrales s'accompagnent d'une somnolence et de la survenue de déficits cognitifs mais peuvent pour certaines d'entre elles être réversibles. En revanche, les lésions cérébrales tardives, caractérisées par des anomalies vasculaires, une démyélinisation et finalement une nécrose de la substance blanche sont généralement observées plus de 6 mois après l'irradiation. Ces lésions tardives sont considérées comme progressives et irréversibles conduisant à un déclin cognitif qui touche les processus mnésiques et attentionnels, les capacités d'apprentissage ainsi que les fonctions exécutives (Makale et al., 2017). La qualité de vie des patients traités par RT s'est vue accorder une plus grande importance en neuro-oncologie, et aujourd'hui, est un critère de jugement indispensable dans la prise en charge des patients avant et après traitement.

La plainte cognitive, fréquemment observée après RT cérébrale, est mieux considérée et évaluée de nos jours par les neuro-oncologues et radiothérapeutes. Même si les atteintes neurologiques qui en sont à l'origine sont de plus en plus décrites et mieux comprises, il

n'existe pas d'arguments expérimentaux clairs permettant de conclure sur l'évolution temporelle des différents processus physiopathologiques sous-jacents à la RT et leurs conséquences sur l'apparition des déficits cognitifs. Par conséquent, de nouvelles recherches sont nécessaires pour identifier la chronologie des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués directement dans la mise en place progressive des dysfonctionnements cognitifs. Ainsi, l'identification précise des processus médiant la neurotoxicité radique devrait permettre de faire émerger de nouvelles thérapies puisqu'à ce jour il n'existe aucun traitement utilisé en clinique pour prévenir ou atténuer les effets neurotoxiques de la RT. De même, il est primordial de proposer des outils capables de détecter et de prédire les toxicités neurologiques induites par la RT pour améliorer la prise en charge des patients. C'est pourquoi les modèles animaux de radiotoxicité cérébrale sont essentiels pour répondre à ces problématiques car ils permettent d'envisager des études séquentielles associant des méthodologies complémentaires pour mieux appréhender les effets aigus, précoces et tardifs de l'irradiation, ainsi que l'identification et la validation de nouvelles thérapies pharmacologiques ou interventions non-médicamenteuses.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse était double :

- 1/ Développer un modèle animal représentatif des symptômes décrits par les patients traités par RT pour pouvoir évaluer l'intérêt de l'IRM pour la détection précise des lésions cérébrales radio-induites et identifier également de potentiels biomarqueurs sanguins de la radiotoxicité cérébrale ;
- 2/ Après avoir bien caractérisé de manière longitudinale et multiparamétrique ce modèle préclinique d'irradiation du tissu cérébral sain chez le rat adulte, l'utiliser pour tester des thérapies, notamment l'intérêt de l'activité physique (AP) pour atténuer/contrecarrer les dommages cérébraux et les déficits cognitifs induits par l'irradiation encéphalique.

1. Choix du modèle animal de radiotoxicité cérébrale

Les modèles animaux sont extrêmement importants pour comprendre les mécanismes des événements pathogènes induits par la RT et développer des thérapies plus efficaces. D'après la littérature, de nombreux modèles utilisant différentes espèces animales avec différentes doses et fractionnement de l'irradiation ont été évalués pour étudier la prévention, les mécanismes, la détection précoce ou encore le traitement des lésions

cérébrales radio-induites (Yang et al., 2017). En effet, en se focalisant sur les modèles rongeurs (rat et souris principalement), il existe une très grande diversité dans les modèles établis. Cette diversité s'exprime tout d'abord par le choix de la souche, le type de rayonnements ionisants utilisés (rayons X ou rayons γ) mais surtout par la dose d'irradiation déposée et si celle-ci est fractionnée ou non. Les doses exprimées dans ces études vont de moins de 5 Gy à 40 Gy. L'âge auquel les animaux sont irradiés varie lui aussi beaucoup d'une étude à l'autre, du stade de fœtus jusqu'à plusieurs mois considérés comme « stade adulte ». Cela s'explique en partie par le fait que les effets délétères de la RT cérébrale sont plus facilement identifiables des années après traitement dans un contexte de cancer infantile. De plus, le stade de maturation du cerveau est un paramètre important à prendre en compte dans le développement des modèles précliniques de radiotoxicité. En effet, le cerveau immature est connu pour être très sensible à l'exposition aux rayonnements ionisants. . Enfin, la durée de l'étude varie également beaucoup dans la littérature : de 24h à quelques semaines voire plusieurs mois (jusqu'à 10 à 11 mois dans l'étude de Peiffer et al, 2014) après irradiation cérébrale (Acharya et al., 2016; Acharya et al., 2016; Balentova et al., 2017; Brown et al., 2016; Kornev et al., 2005; McGinnis et al., 2017; Peiffer et al., 2014; Tseng et al., 2014; Ungvari et al., 2017; Wong-goodrich et al., 2010; Yang et al., 2017). Tous ces modèles animaux tendent à reproduire les problématiques observées en clinique, néanmoins, ils ont tous des limites (Yang et al., 2017). Bien que la plupart des expériences aient indiqué un dysfonctionnement cognitif après une irradiation cérébrale dans des modèles rongeurs, certaines études ont également montré une cognition normale voire améliorée après irradiation. C'est le cas par exemple, dans l'étude de Cheng *et al.*, qui a mis en évidence que l'irradiation de 5Gy permettait d'inhiber le déclin de la neurogenèse hippocampique lié à l'âge chez la souris (Cheng et al., 2016). En effet, certaines études n'ont pas trouvé de déficits mnésiques après irradiation en utilisant des tests comportementaux classiquement utilisés en recherche préclinique tels que le test de reconnaissance d'objets, l'évitement passif, l'apprentissage par inversion, le labyrinthe aquatique de Morris ou le conditionnement de la peur. Certaines études ont même avancé des preuves de l'amélioration des performances après un traitement par RT, notamment une réponse au conditionnement de la peur contextuelle améliorée, une diminution des déficits de mémoire de travail observés avec le test de reconnaissance d'objets ou encore de meilleures performances lors du test d'équilibre sur le rotarod (Tomé et al., 2015). Il existe plusieurs facteurs pouvant influencer l'évaluation d'un trouble cognitif tels que

le domaine comportemental spécifiquement évalué, la sensibilité du test, le moment auquel les individus sont testés après irradiation mais aussi leur âge, leur sexe, le volume cérébral irradié (l'irradiation est-elle panencéphalique ou focalisée), la dose totale administrée (en une seule dose ou fractionnée) (Li et al., 2017; Tomé et al., 2015) ; or, ces facteurs varient beaucoup d'une étude à l'autre. Cette importante diversité de protocoles expérimentaux et de modèles animaux rend difficile le croisement de données d'une étude à l'autre et souligne l'importance d'une approche multiparamétrique et à différentes échelles afin d'apporter une vue d'ensemble sur une problématique donnée.

Dans ces travaux de thèse, nous avons fait le choix de développer notre propre modèle animal et de le caractériser séquentiellement dans le temps à la fois au niveau comportemental mais aussi en étudiant les différents dommages cérébraux par IRM et immunohistologie. Nous avons choisi d'évaluer les effets de l'irradiation cérébrale chez le rat car celui-ci est plus adapté pour les études en imagerie par rapport à la souris du fait de la taille de son cerveau plus importante, permettant une meilleure sensibilité et spécificité de signaux obtenus en IRM. De plus, nous avons réalisé des irradiations cérébrales chez des animaux sains, c'est-à-dire non-porteurs de tumeurs, pour faciliter la compréhension des réponses à l'irradiation cérébrale. Bien évidemment, nous envisageons par la suite de transposer les résultats obtenus lors de cette thèse à un modèle animal plus complexe en y intégrant la tumeur cérébrale. Nous avons également voulu élaborer ce modèle de radiotoxicité cérébrale chez le rat adulte car la plupart des études dans ce domaine se concentrent sur l'animal juvénile (Tomé et al., 2015) alors qu'il est montré dans la littérature que les dommages de la substance blanche, associés aux déficits cognitifs (Bompaire et al., 2018), sont plus majorés lorsque la RT s'effectue sur des patients âgés (Makale et al., 2017). Concernant le protocole d'irradiation, nous avons fait le choix, au regard de la littérature et des traitements par RT utilisés en clinique, de réaliser une irradiation du cerveau entier à une dose de 30 Gy répartie en 3 fractions de 10Gy sur trois jours consécutifs. La dose d'irradiation a été choisie pour se rapprocher des doses utilisées en clinique, notamment pour les métastases cérébrales. De plus, il est rapporté dans la littérature que cette dose d'irradiation est non-létale, engendre des lésions de la substance blanche mais sans induire de radionécrose (Yang et al., 2017). Pour finir, le protocole d'irradiation a été établi par un système de planification du traitement (TPS) dans le but d'assurer une précision spatiale de la

dose déposée et une irradiation homogène dans l'ensemble du cerveau comme nous l'avons démontré par l'analyse dosimétrique combinée à l'analyse immunohistologique des cassures de l'ADN (marquage de γ H2AX).

L'ensemble des résultats obtenus avec ce modèle animal de radiotoxicité cérébrale, qui sont repris plus en détail dans les paragraphes suivants de la discussion, permettent à présent d'optimiser ce modèle animal. En effet, nous avons fait le choix d'irradier l'ensemble du cerveau afin de contrer une potentielle compensation interhémisphérique. Or, ce type de plan de traitement par RT ne se retrouve que dans le cadre des traitements des métastases cérébrales. Le traitement des tumeurs cérébrales primitives est davantage focalisé. Il semble donc pertinent d'aborder les mêmes problématiques dans un contexte d'irradiation focalisée. De plus, certains papiers ont rapporté l'influence de la présence de la tumeur sur les déficits observés et la réponse au traitement (Barker et al., 2015; McGinnis et al., 2017). Il serait donc intéressant de réaliser non plus une irradiation panencéphalique mais une irradiation ciblée en présence d'une tumeur afin de se rapprocher au mieux des conditions cliniques. Cette optimisation du modèle animal incluant une irradiation focalisée et en y intégrant une tumeur cérébrale fait d'ailleurs actuellement l'objet d'un autre sujet de thèse au laboratoire.

Enfin, le cerveau des rats présente certaines limites (taille, peu de substance blanche...), ce qui permet d'envisager l'intérêt du développement d'un modèle de radiotoxicité cérébrale chez un modèle plus proche de l'Homme tel qu'un petit primate non-humain (marmouset). En effet, le marmouset présente un ratio SB/SG et une physiologie vasculaire plus proches du cerveau humain et il présente également un répertoire comportemental plus riche. Ces travaux avaient été initiés lors de mon stage de Master 2 mais ont dû être mis de côté lors de la thèse, notamment à cause du temps relativement long à consacrer à l'apprentissage des différentes tâches cognitives (dispositif CANTAB) qui n'était pas compatible avec un travail de thèse.

2. Altérations comportementales

La fatigue étant une complication débilante et omniprésente du cancer et des traitements anticancéreux, nous nous sommes attachés à développer un modèle animal pouvant ensuite être soumis à une ou plusieurs stratégie(s) thérapeutique(s) pour réduire cette fatigue radio-induite. En effet, la recherche clinique sur les thérapies potentielles est

entravée par la variabilité des antécédents des patients, les différentes métriques pour mesurer la fatigue et les facteurs environnementaux qui peuvent l'affecter (Zombeck et al., 2013). Lors de nos travaux de recherche, l'utilisation du Fateest (test comportemental développé lors de ces travaux de thèse) d'une part, et l'étude de l'activité locomotrice d'autre part, nous ont permis de mettre en lumière une fatigue radio-induite dès la phase aiguë mais également persistante dans le temps. Ceci est en accord avec l'étude de Renner et collaborateurs qui montrait que les souris irradiées présentaient une diminution de la distance et de la vitesse de course quotidienne moyenne vis-à-vis des souris témoins (Renner et al., 2016). Ces résultats concordent avec les données de la littérature, puisque celle-ci mentionne clairement que la fatigue et la douleur sont associées à une diminution de l'activité physique chez les patients atteints de cancer même après traitement. La gestion de ces symptômes spécifiques pourrait aider à promouvoir le maintien de l'activité des patients tout au long du traitement et au-delà (Romero et al., 2018). Cela se traduit également dans notre modèle préclinique par une détérioration de l'état général des animaux irradiés comme en témoigne la perte de poids importante lors des premières semaines post-irradiation et la diminution significative de la survie.

Les différences observables et identifiées comme de la fatigue à court et long terme semblent être soutenues par des processus distincts. Nous avons alors longuement débattu sur la nature de cette fatigue, était-elle davantage « physique » ou « mentale », voire les deux mais comment les distinguer ? En effet, dans le domaine de la fatigue, la plupart des études physiologiques se concentrent sur la capacité des animaux à résister à l'effort (sur tapis roulant ou nage forcée), en supposant implicitement que les signes de fatigue proviennent de facteurs extérieurs (fatigue physique). En revanche, la composante de la fatigue qui est de l'ordre de l'affect et de la motivation est rarement prise en compte mais peut être étudiée par des analyses comportementales (Dantzer et al., 2013). Afin d'évaluer cette composante mentale, nous avons donc cherché à évaluer le comportement d'anhédonie grâce au *Splash test*. Les résultats obtenus indiquent des troubles dans la phase aiguë post-irradiation pouvant s'apparenter à un comportement de type dépression chez les animaux irradiés. Est-ce réellement l'expression d'une fatigue mentale ou la conséquence d'une fatigue physique radio-induite ? La fatigue pourrait également s'expliquer par une atteinte du sommeil puisque de récentes études ont montré que les patients atteints d'un cancer présentent des troubles

du sommeil (Repka & Hayward, 2018). Il serait donc intéressant d'étudier les cycles de sommeil, notamment avec des études d'actimétrie réalisées sur 24 heures, dans notre modèle animal de radiotoxicité cérébrale. Par ailleurs, même si l'étiologie de la fatigue radio-induite est peu connue, différentes hypothèses sont proposées telles que l'action des réponses immunitaires et inflammatoires, une fonte musculaire, des troubles du sommeil, une dépression, une anémie, voire des déséquilibres métaboliques induits par la tumeur, des dommages mitochondriaux ou encore une diminution de la disponibilité des substrats due à l'anorexie, des nausées ou des vomissements (Repka & Hayward, 2018). Il pourrait ainsi être envisagé que la fatigue radio-induite soit liée à des effets *abscopal* de l'irradiation qui affecteraient d'autres organes situés à distance et en dehors du volume irradié comme le système digestif ou les muscles squelettiques. Ces hypothèses de travail sont actuellement peu étudiées mais semblent pertinentes au regard de la littérature. La diminution de l'activité locomotrice des animaux irradiés dans notre étude nous a conduit à initier à la fin de ces travaux de thèse des expériences pour déterminer s'il existe un effet de l'irradiation cérébrale sur les muscles squelettiques, lesquels pourraient être à l'origine, en partie, de la fatigue radio-induite. Ces recherches ont amené à un nouveau sujet de thèse qui est en cours à ce jour dans le laboratoire.

Concernant la cognition, il existe de nombreuses études documentant les déficits cognitifs radio-induits chez des modèles de rongeurs mais il existe également un corpus plus restreint qui documente une cognition maintenue ou améliorée après exposition aux rayonnements ionisants (Tomé et al., 2015). Dans notre étude, nous avons pu constater que l'irradiation du cerveau entier chez des rats mâles adultes induit des déficits tardifs de la mémoire à long-terme et de la mémoire spatiale. De plus, bien que les résultats ne soient pas significatifs, la mémoire à court-terme tend à être aussi affectée dans les phases aiguë et précoce sans irradiation cérébrale. Ngen et collaborateurs ont également observé un déclin de la mémoire à court-terme 2 semaines après irradiation mais aucun effet n'était observé 10 semaines post-irradiation (Ngen et al., 2016). Cela supposerait que les déficits de mémoire à court terme soient transitoires alors que les déficits de mémoire à long terme seraient plus tardifs mais persistants. Néanmoins, il existe une grande variabilité dans les modèles de radiotoxicité cérébrale, ce qui peut expliquer l'hétérogénéité des résultats obtenus. Ainsi dans une étude chez le rat juvénile, les auteurs ont montré que les animaux irradiés présentent

d'importantes déficiences lors du test de reconnaissance d'objets. Ils en concluent que les cerveaux en développement des jeunes rats recevant des doses fractionnées présentent peu d'anomalies dans la phase subaiguë mais des altérations cognitives tardives (Brown et al., 2016).

Les troubles anxieux sont très fréquents et sont retrouvés chez 30% des patients porteurs d'une tumeur intracrânienne (Jouniaux-Delbez et al., 2010). Dans notre étude, nous avons essayé de visualiser le comportement de type anxiété en mesurant le temps que les rats passaient au centre de l'*Open field*. Les résultats obtenus ne présentaient aucune différence significative entre les groupes mais il faut prendre en compte la grande variabilité interindividuelle observée. Ces résultats sont toutefois comparables à ceux obtenus par l'équipe de McGinnis qui avait conclu que les souris recevant une RT seule ne montraient aucune différence significative de leur niveau d'anxiété par rapport aux souris ne recevant aucun traitement (McGinnis et al., 2017). Il semblerait donc que l'anxiété observée chez l'Homme soit davantage due à la présence de la tumeur ou à l'annonce du diagnostic. Toutefois, le test de l'*Open field* pourrait ne pas être assez robuste pour étudier l'anxiété chez le rat. Grâce à des dispositifs tels que le labyrinthe en croix surélevé, il a été observé que l'irradiation du cerveau entier (27 ou 34 Gy) induit une diminution du comportement exploratoire dans le labyrinthe en croix surélevé ce qui traduit une augmentation des comportements anxieux (Brown et al., 2016).

3. Altérations structurales et biomarqueurs d'imagerie

Classiquement les lésions cérébrales radio-induites tardives sont considérées comme étant dues à une réduction de la capacité de prolifération des cellules gliales ou endothéliales ainsi que des atteintes de la neurogenèse. La perte de l'un ou l'autre de ces types cellulaires pourrait finalement produire une nécrose de la substance blanche (Greene-schloesser & Robbins, 2012). Dans notre étude, nous observons tout d'abord une diminution globale du volume cérébral (atrophie d'environ 7%) dans la phase tardive (3 et 6 mois post-irradiation), accompagnée d'une diminution du volume sanguin cérébral marquée par la diminution de la surface des vaisseaux, en particulier au niveau de l'hippocampe. De nombreuses études précliniques ont démontré l'impact négatif de l'irradiation cérébrale sur la vascularisation (Brown, et al., 2005; Nivet et al. , 2019). Ainsi, l'irradiation réduit le nombre de cellules endothéliales, la densité des vaisseaux mais également la longueur des vaisseaux suite à une

irradiation fractionnée (8 x 5Gy). De plus, les rayonnements ionisants induisent de manière dose-dépendante une apoptose des cellules endothéliales. Cela se traduirait par une perméabilisation de la BHE et une augmentation de l'expression de VEGF (Jin et al., 2014). Le suivi longitudinal du volume sanguin cérébral nous a permis d'avoir une première indication sur l'état du système vasculaire tout au long de l'étude mais cette approche n'est pas suffisante. En effet, lors de notre étude, nous n'avons pas évalué l'intégrité de la BHE après irradiation, or il est connu que celle-ci joue un rôle dans le développement des troubles radio-induits (Yang et al., 2017). En effet, il a été démontré par IRM à contraste amélioré que l'irradiation induit une augmentation de la perméabilité de la BHE. Ceci se traduit par un rehaussement du signal T1 après injection d'un agent de contraste (gadolinium) dans les hémisphères cérébraux irradiés par rapport aux hémisphères non-irradiés dans les 15 minutes suivant l'administration de l'agent de contraste (Ngen et al., 2016).

D'autre part, notre modèle animal présente une dégénérescence axonale précoce (diminution AD et RD) accompagnée d'une activation astrocytaire impliquée dans les processus de neuroinflammation radio-induite, en particulier dans les régions de la substance blanche. La FA sur l'ensemble du cerveau ne semble pas impactée par l'irradiation, néanmoins celle-ci apparaît diminuée dès la 2^e semaine au niveau du cortex, de l'hippocampe, du thalamus et du corps calleux. Ceci concorde avec les travaux de Nagesh et collaborateurs qui ont montré qu'une irradiation cérébrale induisait une diminution de la FA au niveau du corps calleux. En revanche, les auteurs ont montré que la MD était augmentée suite à l'irradiation (Nagesh et al., 2008). L'immunomarquage de la protéine MBP nous indique que la surface de myéline semble diminuée à 2 semaines et 6 mois post-irradiation. L'activation astrocytaire (également dénommée astrogliose) n'est pas suffisante pour conclure avec assurance sur la présence d'une neuroinflammation. Nous envisageons donc de compléter ces données par des immunomarquages de la microglie à l'aide d'anticorps ciblant Iba1 et CD68 et également réaliser des dosages par ELISA des cytokines pro- et anti-inflammatoires sur les échantillons cérébraux que nous avons récoltés lors de notre étude. Par ailleurs, les analyses en IRM de diffusion ont mis en évidence que l'hippocampe était une des structures cérébrales qui est souvent impactée, voire même plus rapidement que d'autres régions cérébrales. L'hippocampe est connu pour être une niche neurogénique chez l'adulte, notamment avec la présence de cellules souches neurales et progéniteurs (NSCP) au niveau du gyrus denté de

l'hippocampe. Une des limites de nos analyses immunohistologiques est de ne pas avoir étudié la neurogenèse puisqu'elle est connue pour être très impactée par l'irradiation cérébrale et est associée aux déficits de mémoire observés après irradiation (Lazarini et al., 2009; Monje et al., 2002; Pineda et al., 2013).

Notre étude en imagerie par IRM anatomique, vasculaire et de diffusion pourrait être complétée par une étude en IRM fonctionnelle (IRMf) afin de visualiser des modifications fines survenant dans les réseaux neuronaux. De plus, la spectroscopie par résonance magnétique (SRM) pourrait être utilisée pour surveiller les altérations métaboliques induites par l'irradiation. En effet, la SRM est une technique non-invasive qui peut détecter et quantifier jusqu'à 20 métaboliques cérébraux tels que la taurine, le NAA ou le myoinositol. Elle pourrait alors permettre de définir un indicateur de la neurotoxicité radio-induite (Balentova et al., 2017; Pérès et al., 2018; Pospisil et al., 2017). En outre, l'utilisation de la TEP conjointement à l'IRM semble une approche intéressante pour quantifier et suivre la dynamique des neurotransmetteurs dans le cerveau (Ceccarini et al., 2020) puisqu'il a été montré des perturbations des neurotransmetteurs et de leurs récepteurs après irradiation cérébrale (Franco-Pérez et al., 2020).

Ainsi, les biomarqueurs retrouvés dans ce modèle préclinique sont des marqueurs diagnostiques mais nous ne pouvons pas conclure actuellement sur leur caractère prédictif car les tests comportementaux et l'imagerie n'ont pas nécessairement été faits sur les mêmes individus.

4. Biomarqueurs sanguins : focus sur le stress oxydatif

Il est connu que le stress oxydatif joue un rôle majeur dans la physiopathologie de la radiotoxicité cérébrale. En effet, il est bien décrit dans la littérature que la RT induit du stress oxydatif par deux mécanismes : tout d'abord, la génération d'espèces réactives via la radiolyse de l'eau qui conduit aux effets indirects des RI et aboutissant à amplifier les dommages à l'ADN et, ensuite, un mécanisme plus tardif via la sécrétion de radicaux libres qui vont activer les cellules impliquées dans la neuroinflammation (microglie et astrocytes) qui à leur tour vont également générer des ROS qui vont maintenir ou augmenter le stress oxydatif (Azzam et al., 2012). Pour ces raisons, nous avons souhaité évaluer le stress oxydatif par l'intermédiaire du dosage de différentes espèces réactives. L'étude de ces espèces réactives (ROS, RNS, RCS, RSS) à la fois au niveau cérébral et plasmatique nous a permis de montrer que les taux de ROS, bien

qu'ils soient diminués au niveau cérébral, sont augmentés au niveau plasmatique. Les taux de RNS, eux, ne présentent pas de différence après irradiation au niveau du cerveau mais sont significativement augmentés lors de la phase aiguë (2 semaines post-irradiation) et tardive (6 mois post-irradiation) au niveau plasmatique. Comme pour les ROS, les taux de RSS dans le tissu cérébral sont diminués après irradiation de façon aiguë et tardive alors qu'ils sont augmentés dans le plasma à ces mêmes temps. Nous avons pu mettre en évidence un déséquilibre sur le long terme de la balance nitroso(RNS)-redox(ROS) dans le plasma mais également constater des perturbations importantes des RSS dans le plasma et le cerveau suite à l'irradiation panencéphalique. Il serait intéressant de poursuivre nos recherches sur les rôles des H₂S après irradiation cérébrale. En effet, certaines études ont montré des effets neuroprotecteurs des H₂S *in vitro* vis-à-vis du stress oxydatif après la reperfusion d'un AVC (Kimura, 2013) tandis que d'autres études indiquent que l'augmentation aiguë de H₂S plasmatique chez les patients ayant subi un AVC peut engendrer une augmentation de la production de H₂S au niveau cérébral ce qui est facteur de moins bon pronostic (Zhang et al., 2017).

5. L'activité physique comme stratégie thérapeutique pour la neurotoxicité radique

Le modèle animal développé et bien caractérisé au cours de ce travail de thèse est un modèle pertinent pour mener des études sur les effets délétères de la RT cérébrale puisque les rats irradiés présentent des troubles variables dans le temps tant au niveau comportemental que structural en accord avec les données cliniques et précliniques. Ceci nous a donc permis d'envisager de tester la pratique de l'activité physique (AP) après irradiation comme potentielle stratégie thérapeutique. En effet, des recherches réalisées chez l'Homme suggèrent que l'AP pourrait présenter des avantages pour la santé globale et les fonctions cognitives en particulier, notamment chez les sujets vieillissants (Cotman et al., 2002). Des études précliniques ont permis d'identifier les bases neurobiologiques des bienfaits de l'AP sur le cerveau. Il est alors apparu que l'AP volontaire permettait d'augmenter les niveaux de facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) et d'autres facteurs de croissance, stimuler la neurogenèse, augmenter la résistance aux agressions cérébrales et améliorer l'apprentissage et les performances mentales (Cotman et al., 2002).

Nous avons alors proposé d'évaluer la mise en place d'un protocole d'AP forcée régulière (tapis de course, 3 fois/semaine pendant 6 mois après irradiation) chez le rat exposé

à une irradiation cerveau entier pour contrer la fatigue, les troubles cognitifs radio-induits observés et étudier les changements cérébraux impliqués. Au niveau comportemental, nous avons montré que l'AP permet aux animaux de récupérer relativement rapidement de la fatigue radio-induite. Néanmoins, les rats irradiés soumis à l'AP semblent présenter des difficultés lors de la tâche de reconnaissance d'objets même si leurs performances ne sont significativement pas différentes de celles des rats contrôles soumis à l'AP. Comme mentionné dans la partie résultats, nous ne pouvons pas conclure sur les données obtenues avec le test de l'évitement passif. En effet, les rats irradiés présentent un déficit à 2 mois post-irradiation mais aucune altération lors de la phase tardive alors que la première étude avait justement permis de mettre en lumière l'impact progressif et tardif de la mémoire à long terme. A noter que pour cette deuxième étude, les animaux ont été soumis à la phase d'acquisition et à la première session de test avant RT, comme ce fut le cas dans l'étude 1, mais n'ont pas été retestés avant le 1^{er} mois. Même si le choc n'était pas répété, la remise dans le contexte environnemental permet-elle une meilleure rétention de l'information ? Ajouter à cela le fait que les rats irradiés soumis à l'AP présentent une forme d'anxiété lors de la phase aiguë mais passent plus de temps au centre de l'*Open field* lors de la phase tardive vis-à-vis de tous les autres groupes d'étude. L'accentuation de ce comportement exploratoire pourrait expliquer la diminution du temps de latence avant d'entrer dans le compartiment sombre lors du test de l'évitement passif. De plus, les rats irradiés ou contrôles soumis à l'AP répondent beaucoup moins à l'appétence de la solution sucrée lors du *Splash test*. Est-ce réellement le reflet d'un comportement anhédonique ou la représentation d'une certaine forme de lassitude vis-à-vis de la tâche ? Finalement, ces résultats restent préliminaires au vue du faible effectif d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux et ces résultats devront donc être confortés avec l'ajout d'une nouvelle cohorte d'animaux. En revanche, cette étude montre un très net bénéfice de l'AP sur l'état général et la survie après irradiation.

L'analyse par IRM nous a permis d'observer que l'augmentation de la MD présente 1 mois après irradiation cérébrale est atténuée par l'AP. Toutefois, il semblerait que l'AP ne permette que de retarder les atteintes de la microstructure cérébrale étudiée par IRM de diffusion puisque à 6 mois post-irradiation les valeurs des paramètres de diffusion étudiés sont similaires entre les rats irradiés soumis ou non à une AP. De plus, les résultats obtenus en IRM vasculaire témoignent que l'AP permet de stimuler la vascularisation altérée par

l'irradiation cérébrale aux temps tardifs post-irradiation. Comme pour les données comportementales, les résultats IRM ont été obtenus sur un faible échantillonnage, il sera donc nécessaire de conforter ces résultats en réalisant de nouvelles études pour augmenter le nombre d'animaux par groupe.

Au regard des résultats obtenus en comportement et en IRM, l'AP semble timidement pouvoir apporter des bienfaits suite à l'irradiation : les effets bénéfiques de l'AP sur les atteintes neurologiques sont perceptibles à 1 mois après irradiation mais ces effets s'amenuisent au fur et à mesure du temps. Toutefois, nous rappelons que nous avons fait le choix d'un protocole d'AP forcée régulière sur tapis de course (basé sur les travaux de Ghodrati-Jaldbakhan et al., 2017), et non d'une activité volontaire comme c'est le cas dans plusieurs études sur le sujet (Wogensen et al., 2015). Nous avons fait ce choix afin de pouvoir mieux contrôler les temps d'exercice pratiqué. Néanmoins, les études cliniques sur le sujet insistent sur le caractère adapté de la pratique de l'AP. L'activité physique adaptée (APA) passe également par l'augmentation de l'intensité ou de la durée de l'exercice ainsi que des changements de type d'AP proposée en fonction des capacités du patient. Or, dans notre étude, tous les rats étaient soumis à 30 min de course sur tapis roulant 3 fois par semaine tout au long de l'étude, sans augmentation de l'intensité, de la durée ou de la fréquence de l'exercice. En outre, l'AP n'était pas adaptée en fonction de chaque animal ce qui a pu entraîner une habitude à l'effort des animaux. Ceci pourrait donc pouvoir expliquer pourquoi notre modèle animal présente uniquement des bénéfices précoces de l'AP sur les troubles radio-induits. Il faudrait alors envisager de modifier le protocole afin que celui soit graduel tout au long de l'étude (jusqu'à 6 mois post-irradiation). Nous avons également choisi de débiter le protocole d'AP uniquement après irradiation afin de mimer la prise en charge clinique après traitements anticancéreux. Bien que cette prise en charge soit progressivement proposée dans certains centres, le moment auquel l'APA doit débiter pour maximiser son effet n'est pas encore déterminé et ce paramètre est difficile à évaluer en recherche clinique. C'est pourquoi, ce modèle animal représente un réel intérêt afin de pouvoir évaluer la fenêtre thérapeutique optimale de l'AP. A savoir vaut-il mieux débiter l'AP avant RT, pendant ou quelques semaines après le traitement une fois que le patient aura physiquement récupéré et surtout combien de temps maintenir ce protocole d'AP ?

Dans le but de se rapprocher de l'APA proposée aux patients, il conviendrait de proposer une AP spontanée aux rats testés avec la présence de roues d'exercice directement dans la cage d'hébergement. Ainsi, chaque animal pourrait aller à son rythme. De plus, l'optimisation de la stimulation cognitive afin de mimer la remédiation cognitive chez les patients pourrait se faire à travers l'enrichissement de l'environnement dans la cage d'hébergement. Fan et collaborateurs ont ainsi montré que les animaux irradiés à 10Gy vivants dans un milieu enrichi obtiennent de meilleurs résultats de coordination motrice lors de l'accélération du rotarod vis-à-vis des animaux irradiés hébergés dans un milieu standard (Fan et al., 2007).

Enfin, nous avons fait le choix d'évaluer l'intérêt thérapeutique de l'AP mais il peut être noté que notre modèle préclinique de radiotoxicité cérébrale pourrait également servir à tester des traitements médicamenteux tels que des molécules antioxydantes au regard du rôle clé que semble jouer le stress oxydatif dans la physiopathologie de la neurotoxicité radique. Notre modèle préclinique pourra également à terme être un pilier servant de référence dans l'évaluation de nouvelles modalités de RT telles que l'hadronthérapie (protonthérapie ou carbonethérapie) qui permet de maximiser le dépôt de dose à la tumeur en épargnant le plus possible le tissu sain avoisinant la tumeur. Bien que l'avantage balistique de l'hadronthérapie permette d'envisager une protection vis-à-vis des effets radiotoxiques sur le tissu cérébral, cette modalité de RT n'est pas encore beaucoup utilisée en clinique car des preuves cliniques et aussi précliniques sont actuellement nécessaires et demandées par la Haute Autorité de Santé. Avec l'implantation récente du centre CYCLHAD à Caen qui propose actuellement des traitements par protons et dans quelques années par ions carbone, nous pourrions avoir accès à ces traitements pour mener des études précliniques sur leurs impacts sur le tissu cérébral sain et comparer les résultats avec ceux d'une irradiation de référence (rayons X) obtenus au cours de cette thèse.

CONCLUSION GENERALE

L'irradiation cérébrale est couramment utilisée comme un traitement majeur des tumeurs cérébrales, qu'elles soient primitives ou métastatiques. Toutefois, des études à la fois précliniques et cliniques ont démontré les effets délétères des RI sur le tissu cérébral sain à l'origine de nombreux déficits cognitifs et dommages tissulaires et cellulaires.

Mes travaux de thèse ont donc tout d'abord permis de développer un modèle murin d'irradiation cérébrale fractionnée sur le cerveau entier qui a été caractérisé longitudinalement en s'appuyant à la fois sur des tests comportementaux, de l'imagerie, des analyses immunohistologiques et des dosages sanguins du stress oxydatif (espèces réactives et marqueurs indirects du stress oxydatif comme l'albumine et la 8-OHdG). Ce modèle pertinent, au regard des données cliniques et précliniques, nous a alors permis de tester le potentiel thérapeutique de la pratique de l'activité physique après irradiation cérébrale. Pour aller plus loin, ce modèle pourra être optimisé en réalisant une irradiation ciblée et également en présence d'une tumeur (la difficulté résidera alors dans la survie à long terme des animaux porteurs de tumeur) tout en mettant en place au mieux une activité physique spontanée ou à minima une graduation de l'intensité et/ou de la durée et/ou de la fréquence de l'activité physique proposée sur tapis de course tout au long de l'étude.

Ainsi ce modèle animal à présent bien caractérisé permettra de mener des études sur la compréhension fine de la physiopathologie de la radiotoxicité cérébrale et servira également de référence pour tester de nouvelles thérapies, qu'elles soient médicamenteuses ou non mais également pour évaluer l'intérêt de nouvelles modalités de radiothérapie (protonthérapie et carbonethérapie).

BIBLIOGRAPHIE

- Acharya, M. M., Baulch, J. E., Lusardi, T. A., Allen, B. D., Chmielewski, N. N., Baddour, A. A. D., ... Boison, D. (2016). Adenosine Kinase Inhibition Protects against Cranial Radiation-Induced Cognitive Dysfunction. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9(June), 1–10.
- Acharya, M. M., Green, K. N., Allen, B. D., Najafi, A. R., Syage, A., Minasyan, H., ... Limoli, C. L. (2016). Elimination of microglia improves cognitive function following cranial irradiation. *Scientific Reports*, 6(April), 31545.
- Ajithkumar, T., Price, S., Horan, G., Burke, A., & Jefferies, S. (2017). Prevention of radiotherapy-induced neurocognitive dysfunction in survivors of paediatric brain tumours: the potential role of modern imaging and radiotherapy techniques. *The Lancet Oncology*, 18(2), e91–e100.
- Alagband, Y., Cheeks, S. N., Allen, B. D., Montay-gruel, P., Doan, N., Petit, B., ... Limoli, C. L. (2020). Neuroprotection of Radiosensitive Juvenile Mice by Ultra-High Dose Rate FLASH Irradiation. *Cancers*, 12(1671), 1–21.
- Andrews, R. N., Metheny-Barlow, L. J., Peiffer, A. M., Hanbury, D. B., Tooze, J. A., Daniel Bourland, J., ... Mark Cline, J. (2017). Cerebrovascular Remodeling and Neuroinflammation is a Late Effect of Radiation-Induced Brain Injury in Non-Human Primates. *Radiation Research*, 187(5), 599–611.
- Armstrong, T. S., Cron, S. G., Vera Bolanos, E., Gilbert, M. R., & Kang, D. H. (2010). Risk factors for fatigue severity in primary brain tumor patients. *Cancer*, 116(11), 2707–2715.
- Asher, A., Fu, J. B., Bailey, C., & Hughes, J. K. (2016). Fatigue among patients with brain tumors. *CNS Oncology*, 5(2), 91–100.
- Attia, A., Page, B. R., Lesser, G. J., & Chan, M. (2014). Treatment of Radiation-Induced Cognitive Decline. *Current Treatment Options in Oncology*, 15(4), 539–550.
- Azzam, E. I., Jay-Gerin, J.-P., & Pain, D. (2012). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.*, 327(0), 48–60.
- Baan, R., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., ... WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. (2011). Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields. *The Lancet Oncology*, 12(7), 624–626.
- Balentova, S., & Adamkov, M. (2015). Molecular, cellular and functional effects of radiation-induced brain injury: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 27796–27815.
- Balentova, S., Hajtmanová, E., Filová, B., Borbélyová, V., Lehotský, J., & Adamkov, M. (2018). Effects of fractionated whole-brain irradiation on cellular composition and cognitive function in the rat brain. *International Journal of Radiation Biology*, 94(3), 238–247.
- Balentova, S., Hnilicová, P., Kalenská, D., Baranovičová, E., Muríň, P., Bittšanský, M., ... Adamkov, M. (2019). Metabolic and histopathological changes in the brain and plasma

- of rats exposed to fractionated whole-brain irradiation. *Brain Research*, 1708(December 2018), 146–159.
- Balentova, S., Mur, P., & Hajtmanov, E. (2017). *Effect of whole-brain irradiation on the specific brain regions in a rat model: metabolic and histopathological changes*. Neurotoxicology. Elsevier B.V.
- Balestrino, R., Rudà, R., & Soffietti, R. (2020). Brain metastasis from unknown primary tumour: Moving from old retrospective studies to clinical trials on targeted agents. *Cancers*, 12(11), 1–18.
- Barazzuol, L., Coppes, R. P., & van Luijk, P. (2020). Prevention and treatment of radiotherapy-induced side effects. *Molecular Oncology*, 14(7), 1538–1554.
- Barchana, M., Margalio, M., & Liphshitz, I. (2012). Changes in brain glioma incidence and laterality correlates with use of mobile phones - a nationwide population based study in israel. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(11), 5857–5863. 7
- Barker, H. E., Paget, J. T. E., Khan, A. A., & Harrington, K. J. (2015). The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nature Reviews Cancer*, 15(7), 409–425.
- Barsevick, A., Cleeland, C. S., Manning, D. C., O'Mara, A. M., Reeve, B. B., Scott, J. A., & Sloan, J. A. (2010). ASCPRO Recommendations for the Assessment of Fatigue as an Outcome in Clinical Trials. *Pain Symptom Management*, 39(6), 1086–1099.
- Basser, P. J., Mattiello, J., & LeBihan, D. (1994). MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophysical Journal*, 66(1), 259–267. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80775-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80775-1)
- Behling, R. (2015). *Modern Diagnostic X-Ray Sources*. *Modern Diagnostic X-Ray Sources*.
- Bekaert, L., Valable, S., Lechapt-Zalcman, E., Ponte, K., Collet, S., Constans, J. M., ... Guillamo, J. S. (2017). [18F]-FMISO PET study of hypoxia in gliomas before surgery: correlation with molecular markers of hypoxia and angiogenesis. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 44(8), 1383–1392.
- Bentzen, S. M. (2006). Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: Radiobiology meets molecular pathology. *Nature Reviews Cancer*, 6(9), 702–713.
- Bergo, E., Lombardi, G., Pambuku, A., Della Puppa, A., Bellu, L., D'avella, D., & Zagonel, V. (2016). Cognitive Rehabilitation in Patients with Gliomas and Other Brain Tumors: State of the Art. *BioMed Research International*, 2016.
- Bhowmik, A., Khan, R., & Ghosh, M. K. (2015). Blood brain barrier: A challenge for effectual therapy of brain tumors. *BioMed Research International*, 2015.
- Bolcaen, J., Descamps, B., Boterberg, T., Vanhove, C., & Goethals, I. (2017). PET and MRI guided irradiation of a glioblastoma rat model using a micro-irradiator. *Journal of Visualized Experiments*, 2017(130), 1–10.
- Bompaire, F., Lahutte, M., Buffat, S., Soussain, C., Ardisson, A. E., Terziev, R., ... Ricard, D. (2018). New insights in radiation-induced leukoencephalopathy: a prospective cross-sectional study. *Supportive Care in Cancer*, 26(12), 1–10. 9

- Bourhis, J., Montay-Gruel, P., Gonçalves Jorge, P., Bailat, C., Petit, B., Ollivier, J., ... Vozenin, M. C. (2019). Clinical translation of FLASH radiotherapy: Why and how? *Radiotherapy and Oncology*, 139, 11–17.
- Bovi, J. A. (2018). Prevention of Brain Metastases. *Frontiers in Neurology*, 9(September), 1–7.
- Braganza, M. Z., Kitahara, C. M., Berrington De González, A., Inskip, P. D., Johnson, K. J., & Rajaraman, P. (2012). Ionizing radiation and the risk of brain and central nervous system tumors: A systematic review. *Neuro-Oncology*, 14(11), 1316–1324.
- Brouland, J. P., & Hottinger, A. (2017). Nouvelle classification OMS 2016 des gliomes : quels changements ? *Rev Med Suisse*, 13, 1805–1809.
- Brown, P. D., Ahluwalia, M. S., Khan, O. H., Asher, A. L., Wefel, J. S., & Gondi, V. (2018). Whole-brain radiotherapy for brain metastases: Evolution or revolution? *Journal of Clinical Oncology*, 36(5), 483–491.
- Brown, R. J., Jun, B. J., Cushman, J. D., Nguyen, C., Beighley, A. H., Blanchard, J., ... McBride, W. H. (2016). Changes in Imaging and Cognition in Juvenile Rats After Whole-Brain Irradiation. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 96(2), 470–478.
- Brown, W. R., Thore, C. R., Moody, D. M., Robbins, M. E., & Wheeler, K. T. (2005). Vascular damage after fractionated whole-brain irradiation in rats. *Radiation Research*, 164(5), 662–668.
- Burnet, N. G., Thomas, S. J., Burton, K. E., & Jefferies, S. J. (2004). Defining the tumour and target volumes for radiotherapy. *Cancer Imaging*, 4(2), 153–161.
- Cacho-Díaz, B., Lorenzana-Mendoza, N. A., Chávez-Hernandez, J. D., González-Aguilar, A., Reyes-Soto, G., & Herrera-Gómez, Á. (2019). Clinical manifestations and location of brain metastases as prognostic markers. *Current Problems in Cancer*, 43(4), 312–323.
- Cardis, E. (2010). Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: Results of the INTERPHONE international case-control study. *International Journal of Epidemiology*, 39(3), 675–694.
- Carpentier, A. C. (2008). La chirurgie des gliomes cérébraux en 2008. *Cancer/Radiothérapie*, 12(6–7), 676–686.
- Ceccarini, J., Liu, H., Van Laere, K., Morris, E. D., & Sander, C. Y. (2020). Methods for Quantifying Neurotransmitter Dynamics in the Living Brain With PET Imaging. *Frontiers in Physiology*, 11(July), 1–8.
- Chai, Y., & Hei, T. K. (2008). Radiation induced bystander effect in vivo. *Acta Medica Nagasakiensia*, 53(SUPPL.), 65–69.
- Chapman, C. H., Zhu, T., Nazem-Zadeh, M., Tao, Y., Buchtel, H. A., Tsien, C. I., ... Cao, Y. (2016). Diffusion tensor imaging predicts cognitive function change following partial brain radiotherapy for low-grade and benign tumors. *Radiotherapy and Oncology*, 120(2), 234–240.
- Chaung, K. V., Sloan, A. E., & Choi, S. (2021). Limited brain metastases: A narrative review. *Annals of Palliative Medicine*, 10(5), 6016–6027.

- Cheng, Z., Li, Y. Q., & Wong, C. S. (2016). Effects of Aging on Hippocampal Neurogenesis after Irradiation. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 94(5), 1181–1189.
- Cherrier, M. M., Anderson, K., David, D., Higano, C. S., Gray, H., Church, A., & Willis, S. L. (2013). A randomized trial of cognitive rehabilitation in cancer survivors. *Life Sciences*, 93(17), 617–622.
- Chitti, B., Goyal, S., Sherman, J. H., Caputy, A., Sarfaraz, M., Cifter, G., ... Rao, Y. J. (2020). The role of brachytherapy in the management of brain metastases: a systematic review. *Journal of Contemporary Brachytherapy*, 12(1), 67–83.
- Choong, E. S., Turner, R. N., & Flatley, M. J. (2014). Radiotherapy: Basic principles and technical advances. *Orthopaedics and Trauma*, 28(3), 167–171.
- Clark, P. J., Brzezinska, W. J., Thomas, M. W., Ryzhenko, N. A., Toshkov, S. A., & Rhodes, J. S. (2008). Intact neurogenesis is required for benefits of exercise on spatial memory but not motor performance or contextual fear conditioning in C57BL/6J mice. *Neuroscience*, 155(4), 1048–1058.
- Collins, V. P. (2004). Brain tumours: Classification and genes. *Neurology in Practice*, 75(2).
- Conrad, C. D., Galea, L. A. M., Kuroda, Y., & McEwen, B. S. (1996). Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behavioral Neuroscience*, 110(6), 1321–1334.
- Constanzo, J., Midavaine, É., Fouquet, J., Lepage, M., Descoteaux, M., Kirby, K., ... Sarret, P. (2020). Brain irradiation leads to persistent neuroinflammation and long-term neurocognitive dysfunction in a region-specific manner. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 102(March), 109954.
- Coomans, M. B., van der Linden, S. D., Gehring, K., & Taphoorn, M. J. B. (2019). Treatment of cognitive deficits in brain tumour patients. *Current Opinion in Oncology*, 31(6), 540–547.
- Cotman, C. W., Berchtold, N. C., Barde, Y.-A., Lindvall, O., al., et, Schinder, A. F., ... al., et. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in Neurosciences*, 25(6), 295–301.
- Daguenet, E., Louati, S., Wozny, A. S., Vial, N., Gras, M., Guy, J. B., ... Magné, N. (2020). Radiation-induced bystander and abscopal effects: important lessons from preclinical models. *British Journal of Cancer*, 123(3), 339–348.
- Danhauer, S. C., Addington, E. L., Cohen, L., Sohl, S., Van Puymbroeck, M., Albinati, N. K., & Culos-Reed, S. N. (2019). Yoga for Symptom Management in Oncology: A Review of the Evidence Base and Future Directions for Research. *Cancer*, 125(12), 1979–1989.
- Dantzer, R., Meagher, M. W., & Cleeland, C. S. (2013). Translational approaches to treatment-induced symptoms in cancer patients. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 9(7), 414–426.
- Davis, D. L., Ahlbom, A., Hoel, D., & Percy, C. (1991). Is brain cancer mortality increasing in industrial countries? *American Journal of Industrial Medicine*, 19(4), 421–431.
- Davis, F., Il'Yasova, D., Rankin, K., McCarthy, B., & Bigner, D. D. (2011). Medical diagnostic radiation exposures and risk of Gliomas. *Radiation Research*, 175(6), 790–796.

- De Guzman, A. E., Gazdzinski, L. M., Alsop, R. J., Stewart, J. M., Jaffray, D. A., Wong, C. S., & Nieman, B. J. (2015). Treatment Age, Dose and Sex Determine Neuroanatomical Outcome in Irradiated Juvenile Mice. *Radiation Research*, 183(5), 541–549.
- De la Puente, P., Fettig, N., Luderer, M. J., Jin, A., Shah, S., Muz, B., ... Azab, A. K. (2018). INJECTABLE HYDROGELS FOR LOCALIZED CHEMO- AND RADIO-THERAPY IN BRAIN TUMORS. *J Pharm Sci*, 107(3), 922–933.
- De Lisio, M., Kaczor, J. J., Phan, N., Tarnopolsky, M. A., Boreham, D. R., & Parise, G. (2010). Exercise training enhances the skeletal muscle response to radiation-induced oxidative stress. *Muscle and Nerve*, 43(1), 58–64.
- Dellu, F., Mayo, W., Cherkaoui, J., Le Moal, M., & Simon, H. (1992). A two-trial memory task with automated recording: study in young and aged rats. *Brain Research*, 588(1), 132–139.
- Delmaire, C., Savatovsky, J., Boulanger, T., Dhermain, F., Le Rhun, E., Métellus, P., ... Petyt, G. (2015). Imagerie des métastases cérébrales. *Cancer/Radiothérapie*, 19(1), 16–19.
- Dennis, E. R., Bussière, M. R., Niemierko, A., Lu, M. W., Fullerton, B. C., Loeffler, J. S., & Shih, H. A. (2013). A comparison of critical structure dose and toxicity risks in patients with low grade gliomas treated with IMRT versus proton radiation therapy. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 12(1), 1–10.
- Duffau, H. (2011). The necessity of preserving brain functions in glioma surgery: The crucial role of intraoperative awake mapping. *World Neurosurgery*, 76(6), 525–527.
- Duman, J. G., Dinh, J., Zhou, W., Cham, H., Mavratsas, V. C., Pavešković, M., ... Grosshans, D. R. (2018). Memantine prevents acute radiation-induced toxicities at hippocampal excitatory synapses. *Neuro-Oncology*, 20(5), 655–665.
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats . 1 " Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31, 47–59.
- Fan, Y., Liu, Z., Weinstein, P. R., Fike, J. R., & Liu, J. (2007). Environmental enrichment enhances neurogenesis and improves functional outcome after cranial irradiation. *European Journal of Neuroscience*, 25(1), 38–46.
- Favaudon, V. (2000). Régulation du cycle cellulaire et de la mort cellulaire radio-induite. *CancerRadiothérapie*, 4, 355–368. Retrieved from 3
- Feiock, C., Yagi, M., Maidman, A., Rendahl, A., Hui, S., & Seelig, D. (2016). Central nervous system injury - A newly observed bystander effect of radiation. *PLoS ONE*, 11(9), 1–19.
- Fernandez-Palomo, C., Mothersill, C., Bräuer-Krisch, E., Laissue, J., Seymour, C., & Schültke, E. (2015). γ -H2AX as a marker for dose deposition in the brain of wistar rats after synchrotron microbeam radiation. *PLoS ONE*, 10(3), 1–17.
- Feuvret, L., Antoni, D., Biau, J., Truc, G., Noël, G., & Mazon, J. (2016). Référentiels d'irradiation des gliomes. *Cancer / Radiothérapie*, 20, S69–S79.
- Filley, A. C., Henriquez, M., & Dey, M. (2017). Recurrent glioma clinical trial, CheckMate-143: the game is not over yet. *Oncotarget*, 8(53), 91779–91794.

- Fiordelisi, M. F., Cavaliere, C., Auletta, L., Basso, L., & Salvatore, M. (2019). Magnetic Resonance Imaging for Translational Research in Oncology. *Journal of Clinical Medicine*, 8(11), 1883.
- Franco-Pérez, J., Montes, S., Sánchez-Hernández, J., & Ballesteros-Zebadúa, P. (2020). Whole-brain irradiation differentially modifies neurotransmitters levels and receptors in the hypothalamus and the prefrontal cortex. *Radiation Oncology*, 15(1), 1–13.
- Fuentes, R., Osorio, D., Expósito Hernandez, J., Simancas-Racines, D., Martinez-Zapata, M. J., & Bonfill Cosp, X. (2018). Surgery versus stereotactic radiotherapy for people with single or solitary brain metastasis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2018(8).
- Galanis, E., & Buckner, J. (2000). Chemotherapy for high-grade gliomas, 82, 1371–1380.
- Galldiks, N., Law, I., Pope, W. B., Arbizu, J., & Langen, K. J. (2017). The use of amino acid PET and conventional MRI for monitoring of brain tumor therapy. *NeuroImage: Clinical*, 13, 386–394.
- Garbow, J. R., Tsien, C. I., & Beeman, S. C. (2018). Preclinical MRI: Studies of the irradiated brain. *Journal of Magnetic Resonance*, 292, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2018.03.011>
- Gérard, J. P., Thariat, J., Giraud, P., & Cosset, J. M. (2010). Histoire de l'évolution des techniques de radiothérapie. *Bulletin Du Cancer*, 97(7), 743–751.
- Gérard, M., Jumeau, R., Pichon, B., Biau, J., Blais, E., Horion, J., & Noël, G. (2017). Contraintes de dose en radiothérapie conformationnelle fractionnée et en radiothérapie stéréotaxique dans les hippocampes, le tronc cérébral et l'encéphale : limites et perspectives. *Cancer/Radiotherapie*, 21(6–7), 636–647.
- Ghafouri, S., Fathollahi, Y., Javan, M., Shojaei, A., Asgari, A., & Mirnajafi-Zadeh, J. (2016). Effect of low frequency stimulation on impaired spontaneous alternation behavior of kindled rats in Y-maze test. *Epilepsy Research*, 126, 37–44.
- Ghaseddin, A., & Peters, K. B. (2015). Use of bevacizumab in recurrent glioblastoma. *CNS Oncology*, 4(3), 157–169.
- Ghodrati-Jaldbakhan, S., Ahmadelipour, A., Rashidy-Pour, A., Vafaei, A. A., Miladi-Gorji, H., & Alizadeh, M. (2017). Low- and high-intensity treadmill exercise attenuates chronic morphine-induced anxiogenesis and memory impairment but not reductions in hippocampal BDNF in female rats. *Brain Research*, 1663, 20–28.
- Gittleman, H. R., Ostrom, Q. T., Rouse, C. D., Dowling, J. A., De Blank, P. M., Kruchko, C. A., ... Barnholtz-Sloan, J. S. (2015). Trends in central nervous system tumor incidence relative to other common cancers in adults, adolescents, and children in the United States, 2000 to 2010. *Cancer*, 121(1), 102–112.
- Greene-schloesser, D., & Robbins, M. E. (2012). Radiation-induced cognitive impairment- from bench to bedside, 37–44.
- Gudkov, S. V., Shilyagina, N. Y., Vodeneev, V. A., & Zvyagin, A. V. (2015). Targeted radionuclide therapy of human tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1), 1–19.
- Haberer, S., Assouline, A., & Mazon, J. J. (2010). Gliomes cérébraux. *Cancer/Radiotherapie*,

- 14(SUPPL. 1), S14–S22.
- Han, W., Umekawa, T., Zhou, K., Zhang, X.-M., Ohshima, M., Dominguez, C. A., ... Blomgren, K. (2016). Cranial irradiation induces transient microglia accumulation, followed by long-lasting inflammation and loss of microglia. *Oncotarget*, 7(50), 82305–82323.
- Han, Z., Davis, N., Fuchs, L., Anderson, A. W., Gore, J. C., & Dawant, B. M. (2013). Relation between brain architecture and mathematical ability in children: A DBM study. *Magnetic Resonance Imaging*, 31(10), 1645–1656.
- Hartmann, J., Wölfelschneider, J., Stache, C., Buslei, R., Derer, A., Schwarz, M., ... Frey, B. (2016). Novel technique for high-precision stereotactic irradiation of mouse brains. *Strahlentherapie Und Onkologie*, 192(11), 806–814.
- Herholz, K., Langen, K. J., Schiepers, C., & Mountz, J. M. (2012). Brain tumors. *Seminars in Nuclear Medicine*, 42(6), 356–370.
- Herold, F., Müller, P., Gronwald, T., & Müller, N. G. (2019). Dose–Response Matters! – A Perspective on the Exercise Prescription in Exercise–Cognition Research. *Frontiers in Psychology*, 10(November), 1–17.
- Hiraoka, K., Sumiyoshi, A., Nonaka, H., Kikkawa, T., Kawashima, R., & Osumi, N. (2016). Regional volume decreases in the brain of Pax6 heterozygous mutant rats: MRI deformation-based morphometry. *PLoS ONE*, 11(6), 1–17.
- Hoffmann, C., Distel, L., Knippen, S., Gryc, T., Schmidt, M. A., Fietkau, R., & Putz, F. (2018). Brain volume reduction after whole-brain radiotherapy: Quantification and prognostic relevance. *Neuro-Oncology*, 20(2), 268–278.
- Hsiao, Y. T., Yi, P. L., Li, C. L., & Chang, F. C. (2012). Effect of cannabidiol on sleep disruption induced by the repeated combination tests consisting of open field and elevated plus-maze in rats. *Neuropharmacology*, 62(1), 373–384.
- Hühn, D., Bolck, H. A., & Sartori, A. A. (2013). Targeting DNA double-strand break signalling and repair: recent advances in cancer therapy. *Swiss Medical Weekly*, 143.
- Hwang, D. S., Kwak, H. B., Ko, I. G., Kim, S. E., Jin, J. J., Ji, E. S., ... Kwon, O. Y. (2016). Treadmill exercise improves memory function depending on circadian rhythm changes in mice. *International Neurourology Journal*, 20, 141–149.
- Hwang, S. Y., Jung, J. S., Kim, T. H., Lim, S. J., Oh, E. S., Kim, J. Y., ... Han, I. O. (2006). Ionizing radiation induces astrocyte gliosis through microglia activation. *Neurobiology of Disease*, 21(3), 457–467.
- Jacob, J., Durand, T., Feuvret, L., Mazon, J. J., Delattre, J. Y., Hoang-Xuan, K., ... Maingon, P. (2018). Cognitive impairment and morphological changes after radiation therapy in brain tumors: A review. *Radiotherapy and Oncology*, 128(2), 221–228.
- Jacotte-Simancas, A., Costa-Miserachs, D., Torras-Garcia, M., Coll-Andreu, M., & Portell-Cortés, I. (2013). Effect of voluntary physical exercise and post-training epinephrine on acquisition of a spatial task in the barnes maze. *Behavioural Brain Research*, 247, 178–181.
- Jakubovic, R., Sahgal, A., Soliman, H., Milwid, R., Zhang, L., Eilaghi, A., & Aviv, R. I. (2014).

- Magnetic resonance imaging-based tumour perfusion parameters are biomarkers predicting response after radiation to brain metastases. *Clinical Oncology*, 26(11), 704–712.
- Ji, J. F., Ji, S. J., Sun, R., Li, K., Zhang, Y., Zhang, L. Y., & Tian, Y. (2014). Forced running exercise attenuates hippocampal neurogenesis impairment and the neurocognitive deficits induced by whole-brain irradiation via the BDNF-mediated pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(2), 646–651.
- Ji, S., Tian, Y., Lu, Y., Sun, R., Ji, J., Zhang, L., & Duan, S. (2014). Irradiation-induced hippocampal neurogenesis impairment is associated with epigenetic regulation of bdnf gene transcription. *Brain Research*, 1577, 77–88.
- Jin, X., Liang, B., Chen, Z., Liu, X., & Zhang, Z. (2014). The dynamic changes of capillary permeability and upregulation of VEGF in rats following radiation-induced brain injury. *Microcirculation*, 21(2), 171–177.
- Joly, F., Giffard, B., Rigal, O., De Ruiter, M. B., Small, B. J., Dubois, M., ... Castel, H. (2015). Impact of Cancer and Its Treatments on Cognitive Function: Advances in Research from the Paris International Cognition and Cancer Task Force Symposium and Update since 2012. *Journal of Pain and Symptom Management*, 50(6), 830–841.
- Jouniaux-Delbez, N., Delgadillo, D., & Taillibert, S. (2010). Dépression , anxiété , fatigue et troubles cognitifs : leur contribution à la qualité de vie des patients atteints de tumeurs cérébrales - Revue de la littérature. *Psycho-Oncology*, 4, 116–122.
- Kantor, G., Laprie, A., Huchet, A., Loiseau, H., Dejean, C., & Mazon, J. J. (2008). Radiothérapie des tumeurs gliales : techniques et indications. *Cancer/Radiothérapie*, 12(6–7), 687–694.
- Kimura, H. (2013). Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. *Neurochemistry International*, 63(5), 492–497.
- Kleinerman, R. A. (2006). Cancer risks following diagnostic and therapeutic radiation exposure in children. *Pediatric Radiology*, 36(2), 121–125.
- Kluger, H. M., Chiang, V., Mahajan, A., Zito, C. R., Sznol, M., Tran, T., ... Jilaveanu, L. B. (2018). Long-term survival of patients with melanoma with active brain metastases treated with pembrolizumab on a phase II trial. *Journal of Clinical Oncology*, 37(1), 52–60.
- Kornev, M. ., Kulikova, E. ., & Kul'bakh, O. . (2005). The Cellular Composition of the Cerebral Cortex of Rat Fetuses after Fractionated Low-Dose Irradiation. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 35(6).
- Kovács, N., Szigeti, K., Hegedus, N., Horváth, I., Veres, D. S., Bachmann, M., ... Máthé, D. (2018). Multimodal PET/MRI imaging results enable monitoring the side effects of radiation therapy. *Contrast Media and Molecular Imaging*, 2018, 4–9.
- Kovalchuk, A., Mychasiuk, R., Muhammad, A., Hossain, S., Ilnytskyy, S., Ghose, A., ... Kolb, B. (2015). Liver irradiation causes distal bystander effects in the rat brain and affects animal behaviour. *Oncotarget*, 7(4), 4385–4398.
- Lagerwaard, F. J., Levendag, P. C., Nowak, P. J. C. M., Eijkenboom, W. M. H., Hanssens, P. E. J., & Schmitz, P. I. M. (1999). Identification of prognostic factors in patients with brain

- metastases: A review of 1292 patients. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 43(4), 795–803.
- Lamirault, C., Doyère, V., Juchaux, M., Pouzoulet, F., Labiod, D., Dendale, R., ... Prezado, Y. (2020). Short and long-term evaluation of the impact of proton minibeam radiation therapy on motor, emotional and cognitive functions. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14.
- Lange, M., Rigal, O., Clarisse, B., Giffard, B., Sevin, E., Barillet, M., ... Joly, F. (2014). Cognitive dysfunctions in elderly cancer patients: A new challenge for oncologists. *Cancer Treatment Reviews*, 40(6), 810–817.
- Latorzeff, I., Antoni, D., Gaudaire-Josset, S., Feuvret, L., Tallet-Richard, A., Truc, G., & Noël, G. (2016). Radiothérapie des métastases cérébrales. *Cancer/Radiothérapie*, 20, S80–S87.
- Lawrence, Y. R., Li, X. A., el Naqa, I., Hahn, C. A., Marks, L. B., Merchant, T. E., & Dicker, A. P. (2010). Radiation Dose-Volume Effects in the Brain. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 76(3 SUPPL.), 20–27.
- Lazarini, F., Mouthon, M. A., Gheusi, G., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J. C., Lamarque, S., ... Lledo, P. M. (2009). Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PLoS ONE*, 4(9), 1–11.
- Le Bihan, D., & Lima, M. (2015). Diffusion magnetic resonance imaging: What water tells us about biological tissues. *PLoS Biology*, 13(7), 1–13.
- Lescher, S., Schniewindt, S., Jurcoane, A., Senft, C., & Hattingen, E. (2014). Time window for postoperative reactive enhancement after resection of brain tumors: Less than 72 hours. *Neurosurgical Focus*, 37(6), 1–6.
- Levin, G. T., Greenwood, K. M., Singh, F., Tsoi, D., & Newton, R. U. (2016). Exercise Improves Physical Function and Mental Health of Brain Cancer Survivors: Two Exploratory Case Studies. *Integrative Cancer Therapies*, 15(2), 190–196.
- Li, J., Bentzen, S. M., Renschler, M., & Mehta, M. P. (2007). Regression after whole-brain radiation therapy for brain metastases correlates with survival and improved neurocognitive function. *Journal of Clinical Oncology*, 25(10), 1260–1266.
- Li, X.-Y., Chen, L.-S., Zhang, L.-Y., & Tian, Y. (2017). The Current Utilization of Cognitive Tests in the Research of Radiation-Induced Cognitive Dysfunction in Rodent Models. *Brain Disorders & Therapy*, 6(2).
- Lonardi, S., Tosoni, A., & Brandes, A. A. (2005). Adjuvant chemotherapy in the treatment of high grade gliomas. *Cancer Treatment Reviews*, 31(2), 79–89.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., ... Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820.
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., ... Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231–1251.
- Lym, R. L., Ostrom, Q. T., Kruchko, C., Couce, M., Brat, D. J., Louis, D. N., & Barnholts-Sloan, J. S. (2015). Completeness and concordancy of WHO grade assignment for brain and central

- nervous system tumors in the United States, 2004–2011. *Neuro-Oncology*, 123(1), 43–51.
- Makale, M. T., McDonald, C. R., Hattangadi-Gluth, J. A., & Kesari, S. (2016). Mechanisms of radiotherapy-associated cognitive disability in patients with brain tumours. *Nature Reviews Neurology*, 13(1), 52–64.
- Makale, M. T., McDonald, C. R., Hattangadi-Gluth, J., & Kesari, S. (2017). Brain irradiation and long-term cognitive disability: Current concepts. *Nature Reviews Neurology*, 13(1), 52–64.
- Malard, E., Valable, S., Bernaudin, M., Pérès, E., & Chatre, L. (2021). *The Reactive Species Interactome in the Brain. Antioxidants & Redox Signaling* (Vol. 35).
- Mancuso, M., Pasquali, E., Leonardi, S., Tanori, M., Rebessi, S., Di Majo, V., ... Saran, A. (2008). Oncogenic bystander radiation effects in Patched heterozygous mouse cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34), 12445–12450.
- Matsuya, Y., Tsutsumi, K., Sasaki, K., Yoshii, Y., Kimura, T., & Date, H. (2016). Modeling cell survival and change in amount of DNA during protracted irradiation. *Journal of Radiation Research*, 1–11.
- McGinnis, G. J., Friedman, D., Young, K. H., Torres, E. R. S., Thomas, C. R., Gough, M. J., ... Raber, J. (2017). Neuroinflammatory and cognitive consequences of combined radiation and immunotherapy in a novel preclinical model. *Oncotarget*, 8(6), 9155–9173.
- Merlin, J.-L. (2008). Les inhibiteurs de tyrosine kinase en oncologie : Médicaments anticancéreux (1e partie). *La Lettre Du Pharmacologue (Boulogne)*, 22(2), 51–62.
- Métellus, P., Tallet, A., Dhermain, F., Reyns, N., Carpentier, A., Spano, J. P., ... Le Rhun. (2015). Stratégie globale de prise en charge des métastases cérébrales: Une approche multidisciplinaire. *Cancer/Radiothérapie*, 19(1), 61–65.
- Miranda-Filho, A., Piñeros, M., Soerjomataram, I., Deltour, I., & Bray, F. (2017). Cancers of the brain and CNS: Global patterns and trends in incidence. *Neuro-Oncology*, 19(2), 270–280.
- Mirjolet, C., Merlin, J. L., Truc, G., Noël, G., Thariat, J., Domont, J., ... Maingon, P. (2019). RILA blood biomarker as a predictor of radiation-induced sarcoma in a matched cohort study. *EBioMedicine*, 41, 420–426.
- Mitchell, P., Ellison, D. W., & Mendelow, A. D. (2005). Surgery for malignant gliomas: Mechanistic reasoning and slippery statistics. *Lancet Neurology*, 4(7), 413–422.
- Monet, P., Franc, J., Brasseur, A., Desblache, J., Saliou, G., Deramond, H., & Lehmann, P. (2009). Arterial spin labeling: State of the art. *Journal de Radiologie*, 90(9 C1), 1031–1037.
- Monje, M. (2008). Cranial Radiation Therapy and Damage to Hippocampal Neurogenesis. *Siop Education Book 2008*, 31–37.
- Monje, M. L., Mizumatsu, S., Fike, J. R., & Palmer, T. D. (2002). Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nature Medicine*, 8(9), 955–962.
- Montay-Gruel, P., Acharya, M. M., Petersson, K., Alikhani, L., Yakkala, C., Allen, B. D., ... Limoli,

- C. L. (2019). Long-term neurocognitive benefits of FLASH radiotherapy driven by reduced reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 166(22), 10943–10951.
- Montay-Gruel, P., Bouchet, A., Jaccard, M., Patin, D., Serduc, R., Aim, W., ... Vozenin, M. C. (2018). X-rays can trigger the FLASH effect: Ultra-high dose-rate synchrotron light source prevents normal brain injury after whole brain irradiation in mice. *Radiotherapy and Oncology*, 129(3), 582–588.
- Montay-Gruel, P., Markarian, M., Allen, B. D., Baddour, J. D., Giedzinski, E., Jorge, P. G., ... Acharya, M. M. (2020). Ultra-High-Dose-Rate FLASH Irradiation Limits Reactive Gliosis in the Brain. *Radiation Research*, 194(6), 636–645.
- Moore, S. C., Lee, I.-M., Weiderpass, E., Campbell, P. T., Sampson, J. N., Kitahara, C. M., ... Patel, A. V. (2016). Association of Leisure-Time Physical Activity With Risk of 26 Types of Cancer in 1.44 Million Adults. *JAMA Internal Medicine*, 176(6), 816.
- Mothersill, C., Fernandez-Palomo, C., Fazzari, J., Smith, R., Schültke, E., Bräuer-Krisch, E., ... Seymour, C. (2014). Transmission of signals from rats receiving high doses of microbeam radiation to cage mates: An inter-mammal bystander effect. *Dose-Response*, 12(1), 72–92.
- Mothersill, C., Smith, R. W., Agnihotri, N., & Seymour, C. B. (2007). Characterization of a radiation-induced stress response communicated in vivo between zebrafish. *Environmental Science and Technology*, 41(9), 3382–3387.
- Mouton, L., Etienne, O., Feat-Vetel, J., Barrière, D. A., Pérès, E. A., Boumezbeur, F., ... Le Bihan, D. (2021). Noninvasive Assessment of Neurodevelopmental Disorders after in Utero Irradiation in Mice: An in Vivo Anatomical and Diffusion MRI Study. *Radiation Research*, 195(6), 568–583.
- Münsterberg, H. (1896). The X-Rays, 3, 161–163.
- Nagasawa, H., & Little, J. B. (1992). Induction of Sister Chromatid Exchanges by Extremely Low Doses of α -Particles. *Cancer Research*, 52(22), 6394–6396.
- Nagesh, V., Tsien, C. I., Chenevert, T. L., Ross, B. D., Lawrence, T. S., Junick, L., & Cao, Y. (2008). Radiation-Induced Changes in Normal-Appearing White Matter in Patients With Cerebral Tumors: A Diffusion Tensor Imaging Study. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 70(4), 1002–1010.
- Nambiar, D., Rajamani, P., & Singh, R. P. (2011). Effects of phytochemicals on ionization radiation-mediated carcinogenesis and cancer therapy. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 728(3), 139–157.
- Nardella, C., Clohessy, J. G., Alimonti, A., & Pandolfi, P. P. (2011). Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*, 11(7), 503–511.
- Naylor, A. S., Bull, C., Nilsson, M. K. L., Zhu, C., Bjork-Eriksson, T., Eriksson, P. S., ... Kuhn, H. G. (2008). Voluntary running rescues adult hippocampal neurogenesis after irradiation of the young mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38), 14632–14637.

- Nehoff, H., Parayath, N. N., McConnell, M. J., Taurin, S., & Greish, K. (2015). A combination of tyrosine kinase inhibitors, crizotinib and dasatinib for the treatment of glioblastoma multiforme. *Oncotarget*, 6(35), 37948–37964.
- Ngen, E. J., Wang, L., Gandhi, N., Kato, Y., Armour, M., Zhu, W., ... Artemov, D. (2016). A preclinical murine model for the early detection of radiation-induced brain injury using magnetic resonance imaging and behavioral tests for learning and memory: with applications for the evaluation of possible stem cell imaging agents and therapies. *Journal of Neuro-Oncology*, 128(2), 225–233.
- Nieman, B. J., Elizabeth De Guzman, A., Gazdzinski, L. M., Lerch, J. P., Mallar Chakravarty, M., Pipitone, J., ... Mabbott, D. J. (2015). White and gray matter abnormalities after cranial radiation in children and mice. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 93(4), 882–891.
- Nivet, A., Schlienger, M., Clavère, P., & Huguet, F. (2019). Effects of high-dose irradiation on vascularization: Physiopathology and clinical consequences. *Cancer/Radiotherapie*, 23(2), 161–167.
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathologica*, 109(1), 93–108.
- Okonogi, N., Oike, T., Shirai, K., Tamaki, T., Noda, S., Suzuki, Y., & Nakano, T. (2014). Current Advances in Radiotherapy for Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme. *Journal of Neurology & Neurophysiology*, 5(1), 1–6.
- Olsen, R. H. J., Weber, S. J., Akinyeke, T., & Raber, J. (2017). Enhanced cued fear memory following post-training whole body irradiation of 3-month-old mice. *Behavioural Brain Research*, 319, 181–187.
- Olson, R. A., Chhanabhai, T., & McKenzie, M. (2008). Feasibility study of the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) in patients with brain metastases. *Supportive Care in Cancer*, 16(11), 1273–1278.
- Orth, M., Lauber, K., Niyazi, M., Friedl, A. A., Li, M., Maihöfer, C., ... Belka, C. (2014). Current concepts in clinical radiation oncology. *Radiation and Environmental Biophysics*, 53(1), 1–29.
- Ostrom, Q. T., Fahmideh, M. A., Cote, D. J., Muskens, I. S., Schraw, J. M., Scheurer, M. E., & Bondy, M. L. (2019). Risk factors for childhood and adult primary brain tumors. *Neuro-Oncology*, 21(11), 1357–1375. 3
- Ostrom, Q. T., Patil, N., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2020). CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro-Oncology*, 22(Supplement_1), IV1-IV96.
- Parihar, V. K., Allen, B. D., Caressi, C., Kwok, S., Chu, E., Tran, K. K., ... Limoli, C. L. (2016). Cosmic radiation exposure and persistent cognitive dysfunction. *Scientific Reports*, 6(October), 34774.
- Parihar, V. K., & Limoli, C. L. (2013). Cranial irradiation compromises neuronal architecture in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(31), 12822–12827.

- Park, H. S., Kim, C. J., Kwak, H. B., No, M. H., Heo, J. W., & Kim, T. W. (2018). Physical exercise prevents cognitive impairment by enhancing hippocampal neuroplasticity and mitochondrial function in doxorubicin-induced chemobrain. *Neuropharmacology*, 133, 451–461.
- Pazzaglia, S., Briganti, G., Mancuso, M., & Saran, A. (2020). Neurocognitive Decline Following Radiotherapy : Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cancers*, 12(146), 1–13.
- Peiffer, A. M., Creer, R. M., Linville, C., Olson, J., Kulkarni, P., Brown, J. A., ... Brunso-Bechtold, J. E. (2014). Radiation-induced cognitive impairment and altered diffusion tensor imaging in a juvenile rat model of cranial radiotherapy. *International Journal of Radiation Biology*, 90(9), 799–806.
- Pérès, E. A., Etienne, O., Grigis, A., Boumezbeur, F., Boussin, F. D., & Le Bihan, D. (2018). 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.
- Philips, A., Henshaw, D. L., Lamburn, G., & O'Carroll, M. J. (2018). Brain tumours: Rise in glioblastoma multiforme incidence in England 1995-2015 Suggests an Adverse Environmental or Lifestyle Factor. *Journal of Environmental and Public Health*, 2018.
- Pieters, R. S., Ding, L., Bushe, H., & Aronowitz, J. (2017). Principles of Radiation Oncology. *Cancer Concepts: A Guidebook for the Non-Oncologist*, 0–5.
- Pineda, J. R., Daynac, M., Chicheportiche, A., Cebrian-Silla, A., Sii Felice, K., Garcia-Verdugo, J. M., ... Mouthon, M. A. (2013). Vascular-derived TGF- β increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain. *EMBO Molecular Medicine*, 5(4), 548–562.
- Piskunov, A. ., Nikitin, K. ., & Potapov, A. . (2015). Cellular and Molecular Mechanisms of Radiation-Induced Brain Injury : Can Peripheral Markers Be Detected? *Zhurnal Voprosy Neirokhirurgii Imeni N. N. Burdenko*, 79(1), 83–89.
- Pospisil, P., Kazda, T., Hynkova, L., Bulik, M., Dobiaszkova, M., Burkon, P., ... Jancalek, R. (2017). Post-WBRT cognitive impairment and hippocampal neuronal depletion measured by in vivo metabolic MR spectroscopy: Results of prospective investigational study. *Radiotherapy and Oncology*, 122(3), 373–379.
- Pouget, J. P., Georgakilas, A. G., & Ravanat, J. L. (2018). Targeted and Off-Target (Bystander and Abscopal) Effects of Radiation Therapy: Redox Mechanisms and Risk/Benefit Analysis. *Antioxidants and Redox Signaling*, 29(15), 1447–1487.
- Puttemans, J., Lahoutte, T., D'huyvetter, M., & Devoogdt, N. (2019). Beyond the barrier: Targeted radionuclide therapy in brain tumors and metastases. *Pharmaceutics*, 11(8), 1–23.
- Renner, M., Feng, R., Springer, D., Chen, M.-K., Ntamack, A., Espina, A., & Saligan, L. N. (2016). A Murine Model of Peripheral Irradiation-Induced Fatigue. *Behavioral Brain Research*, 307, 218–226.
- Repka, C. P., & Hayward, R. (2018). Effects of an Exercise Intervention on Cancer-Related Fatigue and Its Relationship to Markers of Oxidative Stress. *Integrative Cancer Therapies*,

17(2), 503–510.

- Richards, R. S., Roberts, T. K., McGregor, N. R., Dunstan, R. H., & Butt, H. L. (2000). Blood parameters indicative of oxidative stress are associated with symptom expression in chronic fatigue syndrome. *Redox Report*, 5(1), 35–41.
- Riera-Domingo, C., Audigé, A., Granja, S., Cheng, W. C., Ho, P. C., Baltazar, F., ... Mazzone, M. (2020). Immunity, Hypoxia, and Metabolism-the Ménage à Trois of Cancer: Implications for Immunotherapy. *Physiological Reviews*, 100(1), 1–102.
- Riyahi, S., Choi, W., Liu, C.-J., Zhong, H., Wu, A. J., Mechalakos, J. G., & Lu, W. (2018). Quantifying local tumor morphological changes with Jacobian map for prediction of pathologic tumor response to chemo-radiotherapy in locally advanced esophageal cancer. *Physics in Medicine and Biology*, 63(14).
- Robbins, M. E., Bourland, J. D., Cline, J. M., Wheeler, K. T., & Deadwyler, S. A. (2011). A model for assessing cognitive impairment after fractionated whole-brain irradiation in nonhuman primates. *Radiation Research*, 175(4), 519–525.
- Robbins, M. E., Brunso-Bechtold, J. K., Peiffer, A. M., Tsien, C. I., Bailey, J. E., & Marks, L. B. (2012). Imaging Radiation-Induced Normal Tissue Injury. *Radiat Res*, 177(4), 449–466.
- Rodgers, S. P., Trevino, M., Zawaski, J. A., Gaber, M. W., & Leasure, J. L. (2013). Neurogenesis, exercise, and cognitive late effects of pediatric radiotherapy. *Neural Plasticity*, 2013.
- Rola, R., Raber, J., Rizk, A., Otsuka, S., Vandenberg, S. R., Morhardt, D. R., & Fike, J. R. (2004). Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Experimental Neurology*, 188(2), 316–330.
- Romero, S. A. D., Jones, L., Bauml, J. M., Li, Q. S., Cohen, R. B., & Mao, J. J. (2018). Decreased Physical Activity After Cancer. *Support Care Cancer*, 26(10), 3423–3430.
- Sacks-Zimmerman, A., Duggal, D., & Liberta, T. (2015). Cognitive Remediation Therapy for Brain Tumor Survivors with Cognitive Deficits. *Cureus*, 7(10).
- Salazar, O. M., Philip Rubin, M. D., Feldstein, M. L., & Pizzutiello, R. (1979). High dose radiation therapy in the treatment of malignant gliomas: Final Report. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 5(10), 1733–1740.
- Sampson, J. H., Gunn, M. D., Fecci, P. E., & Ashley, D. M. (2020). Brain immunology and immunotherapy in brain tumours. *Nature Reviews Cancer*, 20(1), 12–25.
- Saran, F., Chinot, O. L., Henriksson, R., Mason, W., Wick, W., Cloughesy, T., ... Nishikawa, R. (2016). Bevacizumab, temozolomide, and radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma: Comprehensive safety results during and after first-line therapy. *Neuro-Oncology*, 18(7), 991–1001.
- Scaringi, C., Agolli, L., & Minniti, G. (2018). Technical advances in radiation therapy for brain tumors. *Anticancer Research*, 38(11), 6041–6045.
- Schroeder, T., Bittrich, P., Kuhne, J. F., Noebel, C., Leischner, H., Fiehler, J., ... Gellißen, S. (2020). Mapping distribution of brain metastases: does the primary tumor matter? *Journal of Neuro-Oncology*, 147(1), 229–235.

- Selzer, E., & Hebar, A. (2012). Basic principles of molecular effects of irradiation. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 162(3–4), 47–54.
- Shah, P. P., White, T., Khalafallah, A. M., Romo, C. G., Price, C., & Mukherjee, D. (2020). A systematic review of tumor treating fields therapy for high-grade gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 148(3), 433–443.
- Shaw, M. G., & Ball, D. L. (2013). Treatment of brain metastases in lung cancer: Strategies to avoid/reduce late complications of whole brain radiation therapy. *Current Treatment Options in Oncology*, 14(4), 553–567.
- Sher, D. J., Henson, J., Avutu, B., Hochberg, F., Batchelor, T., Martuza, R., ... Chakravarti, A. (2008). The Added Value of Concurrently-Administered Temozolomide Versus Adjuvant Temozolomide Alone in Newly-Diagnosed Glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 88(1), 43–50.
- Siamak Haghdoo. (2005). *Biomarkers of oxidative stress and their application for assessment of individual radiosensitivity*.
- Simmons, D. A., Lartey, F. M., Schüller, E., Rafat, M., King, G., Kim, A., ... Loo, B. W. (2019). Reduced cognitive deficits after FLASH irradiation of whole mouse brain are associated with less hippocampal dendritic spine loss and neuroinflammation. *Radiotherapy and Oncology*, 139, 4–10.
- Smart, D. D. (2017). Radiation Toxicity in the Central Nervous System: Mechanisms and Strategies for Injury Reduction. *Seminars in Radiation Oncology*, 27(4), 332–339. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2017.04.006>
- Smith, R. W., Moccia, R. D., Seymour, C. B., & Mothersill, C. E. (2018). Irradiation of rainbow trout at early life stages results in a proteomic legacy in adult gills. Part A; proteomic responses in the irradiated fish and in non-irradiated bystander fish. *Environmental Research*, 163(December 2017), 297–306.
- Snider, J. W., & Mehta, M. (2016). Principles of radiation therapy. *Handbook of Clinical Neurology*, 134, 131–147.
- Soffietti, R., Abacioglu, U., Baumert, B., Combs, S. E., Kinhult, S., Kros, J. M., ... Weller, M. (2017). Diagnosis and treatment of brain metastases from solid tumors: Guidelines from the European Association of neuro-oncology (EANO). *Neuro-Oncology*, 19(2), 162–174.
- Spasic, E., Buchheit, I., Bernier, V., & Noël, A. (2011). Comparaison dosimétrique de la radiothérapie conformationnelle, la radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité, la radiothérapie conformationnelle en conditions stéréotaxiques et la radiothérapie en conditions stéréotaxiques robotisée des . *Cancer/Radiothérapie*, 15(4), 287–293.
- Sperduto, P. W., Berkey, B., Gaspar, L. E., Mehta, M., & Curran, W. (2008). A New Prognostic Index and Comparison to Three Other Indices for Patients With Brain Metastases: An Analysis of 1,960 Patients in the RTOG Database. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 70(2), 510–514.
- Sperduto, P. W., Kased, N., Roberge, D., Xu, Z., Shanley, R., Luo, X., ... Mehta, M. (2012). Summary report on the graded prognostic assessment: An accurate and facile diagnosis-specific tool to estimate survival for patients with brain metastases. *Journal of Clinical*

- Oncology*, 30(4), 419–425.
- Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C., ... Mirimanoff, R. O. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*, 10(5), 459–466.
- Stupp, R., & Roila, F. (2009). Malignant glioma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 20(SUPPL. 4), 126–128.
- Suckert, T., Beyreuther, E., Müller, J., Azadegan, B., Meinhardt, M., Raschke, F., ... Dietrich, A. (2021). Late Side Effects in Normal Mouse Brain Tissue After Proton Irradiation. *Frontiers in Oncology*, 10(January), 1–17.
- Sultana, N., Sun, C., Katsube, T., & Wang, B. (2020). Biomarkers of Brain Damage Induced by Radiotherapy. *Dose-Response*, 18(3), 1–10.
- Sun, R., Sbai, A., Ganem, G., Boudabous, M., Collin, F., Marcy, P. Y., ... Thariat, J. (2014). Effets non ciblés (bystander, abscopal) de la radiothérapie externe: Potentielles implications pour le clinicien? *Cancer/Radiothérapie*, 18(8), 770–778. 4
- Talbot, C. J., Veldwijk, M. R., Azria, D., Batini, C., Bierbaum, M., Brengues, M., ... Bourgier, C. (2019). Multi-centre technical evaluation of the radiation-induced lymphocyte apoptosis assay as a predictive test for radiotherapy toxicity. *Clinical and Translational Radiation Oncology*, 18, 1–8.
- Tan, A. C., Ashley, D. M., López, G. Y., Malinzak, M., Friedman, H. S., & Khasraw, M. (2020). Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(4), 299–312.
- Tan, D. C., Roth, I. M., Wickremesekera, A. C., Davis, P. F., Kaye, A. H., Mantamadiotis, T., ... Tan, S. T. (2019). Therapeutic Targeting of Cancer Stem Cells in Human Glioblastoma by Manipulating the Renin-Angiotensin System. *Cells*, 8(11).
- Tang, F., Wang, J., Tang, Z., Kang, M., Deng, Q., & Yu, J. (2016). Quality of Life and Its Association with Physical Activity among Different Types of Cancer Survivors. *Plos One*, 11(11), e0164971.
- Thompson, M. K., Poortmans, P., Chalmers, A. J., Faivre-Finn, C., Hall, E., Huddart, R. A., ... Coles, C. E. (2018). Practice-changing radiation therapy trials for the treatment of cancer: where are we 150 years after the birth of Marie Curie? *British Journal of Cancer*, 119(4), 389–407.
- Tilak, M., Holborn, J., New, L. A., Lalonde, J., & Jones, N. (2021). Receptor tyrosine kinase signaling and targeting in glioblastoma multiforme. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–35.
- Tillner, F., Thute, P., Bütof, R., Krause, M., & Enghardt, W. (2014). Pre-clinical research in small animals using radiotherapy technology - a bidirectional translational approach. *Zeitschrift Fur Medizinische Physik*, 24(4), 335–351.
- Tomé, W. A., Gökhan, Ş., Gulinello, M. E., Brodin, N. P., Heard, J., Mehler, M. F., & Guha, C.

- (2015). Hippocampal-dependent neurocognitive impairment following cranial irradiation observed in pre-clinical models: current knowledge and possible future directions. *The British Journal of Radiology*, 89(1057), 20150762.
- Trivedi, R., Khan, A. R., Rana, P., Haridas, S., Hemanth Kumar, B. S., Manda, K., ... Khushu, S. (2012). Radiation-induced early changes in the brain and behavior: Serial diffusion tensor imaging and behavioral evaluation after graded doses of radiation. *Journal of Neuroscience Research*, 90(10), 2009–2019.
- Troprès, I., Grimault, S., Vaeth, A., Grillon, E., Julien, C., Payen, J. F., ... Décorps, M. (2001). Vessel size imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, 45(3), 397–408.
- Tsao-Wei, D. D., Hu, J., Groshen, S. G., & Chamberlain, M. C. (2012). Conditional survival of high-grade glioma in Los Angeles County during the year 1990-2000. *Journal of Neuro-Oncology*, 110(1), 145–152.
- Tsao, M. N., Xu, W., Wong, R. K. S., Lloyd, N., Laperriere, N., Sahgal, A., ... Chow, E. (2018). Whole brain radiotherapy for the treatment of newly diagnosed multiple brain metastases. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2018(1).
- Tseng, B. P., Giedzinski, E., Izadi, A., Suarez, T., Lan, M. L., Tran, K. K., ... Limoli, C. L. (2014). Functional consequences of radiation-induced oxidative stress in cultured neural stem cells and the brain exposed to charged particle irradiation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(9), 1410–22.
- Turnquist, C., Harris, B. T., & Harris, C. C. (2020). Radiation-induced brain injury: current concepts and therapeutic strategies targeting neuroinflammation. *Neuro-Oncology Advances*, 2(1), 1–10. <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdaa057>
- Ungvari, Z., Tarantini, S., Hertelendy, P., Noa Valcarcel-Ares, M., Fülöp, G. A., Logan, S., ... Yabluchanskiy, A. (2017). Cerebromicrovascular dysfunction predicts cognitive decline and gait abnormalities in a mouse model of whole brain irradiation-induced accelerated brain senescence. *GeroScience*, 33–42.
- van Lonkhuizen, P. J. C., Klaver, K. M., Wefel, J. S., Sitskoorn, M. M., Schagen, S. B., & Gehring, K. (2019). Interventions for cognitive problems in adults with brain cancer: A narrative review. *European Journal of Cancer Care*, 28(3).
- Wang, M., Ma, H., Wang, X., Guo, Y., Xia, X., Xia, H., ... Xie, Y. (2015). Integration of BOLD-fMRI and DTI into radiation treatment planning for high-grade gliomas located near the primary motor cortexes and corticospinal tracts. *Radiation Oncology*, 10(1), 1–7.
- Wang, R., Zhou, T., Liu, W., & Zuo, L. (2018). Molecular mechanism of bystander effects and related abscopal/ cohort effects in cancer therapy. *Oncotarget*, 9(26), 18637–18647.
- Wang, S., Wu, E. X., Qiu, D., Leung, L. H. T., Lau, H. F., & Khong, P. L. (2009). Longitudinal diffusion tensor magnetic resonance imaging study of radiation-induced white matter damage in a rat model. *Cancer Research*, 69(3), 1190–1198.
- Warrington, J. P., Csiszar, A., Mitschelen, M., Lee, Y. W., & Sonntag, W. E. (2012). Whole brain radiation-induced impairments in learning and memory are time-sensitive and reversible by systemic hypoxia. *PLoS ONE*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030444>

- Weber, D. C., Lim, P. S., Tran, S., Walser, M., Bolsi, A., Kliebsch, U., ... Pica, A. (2020). Proton therapy for brain tumours in the area of evidence-based medicine. *The British Journal of Radiology*, 93(1107), 20190237.
- Weller, M., Felsberg, J., Hartmann, C., Berger, H., Steinbach, J. P., Schramm, J., ... Loeffler, M. (2009). Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: A prospective translational study of the German Glioma Network. *Journal of Clinical Oncology*, 27(34), 5743–5750. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.0805>
- Wen, P. Y., Schiff, D., Kesari, S., Drappatz, J., Gigas, D. C., & Doherty, L. (2006). Medical management of patients with brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, 80(3), 313–332.
- Wilke, C., Grosshans, D., Duman, J., Brown, P., & Li, J. (2017). Radiation-induced cognitive toxicity: Pathophysiology and interventions to reduce toxicity in adults. *Neuro-Oncology*, 20(5), 597–607.
- Wilson, C. M., Gaber, M. W., Sabek, O. M., Zawaski, J. A., & Merchant, T. E. (2009). Radiation-Induced Astrogliosis and Blood-Brain Barrier Damage Can Be Abrogated Using Anti-TNF Treatment. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 74(3), 934–941.
- Winklewski, P. J., Sabisz, A., Naumczyk, P., Jodzio, K., Szurowska, E., & Szarmach, A. (2018). Understanding the physiopathology behind axial and radial diffusivity changes-what do we know? *Frontiers in Neurology*, 9(FEB). <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00092>
- Winocur, G., Wojtowicz, J. M., Huang, J., & Tannock, I. F. (2014). Physical exercise prevents suppression of hippocampal neurogenesis and reduces cognitive impairment in chemotherapy-treated rats. *Psychopharmacology*, 231(11), 2311–2320.
- Wogensen, E., Malá, H., & Mogensen, J. (2015). The Effects of Exercise on Cognitive Recovery after Acquired Brain Injury in Animal Models : A Systematic Review. *Neural Plasticity*, 2015, 22.
- Wong-goodrich, S. J. E., Pfau, M. L., Flores, C. T., Fraser, J. A., Williams, C. L., & Jones, L. W. (2010). Voluntary Running Prevents Progressive Memory Decline and Increases Adult Hippocampal Neurogenesis and Growth Factor Expression After Whole-Brain Irradiation. *Cancer Research*, 70(22), 9329–9338. h
- Wong, P., Leppert, I. R., Roberge, D., Boudam, K., Brown, P. D., Muanza, T., ... Mihalcioiu, C. (2016). A pilot study using dynamic contrast enhanced-MRI as a response biomarker of the radioprotective effect of memantine in patients receiving whole brain radiotherapy. *Oncotarget*, 7(32), 50986–50996.
- Yang, L., Yang, J., Li, G., Li, Y., Wu, R., Cheng, J., & Tang, Y. (2017). Pathophysiological Responses in Rat and Mouse Models of Radiation-Induced Brain Injury. *Molecular Neurobiology*, 1–11.
- Yang, S., Chun, M. H., & Son, Y. R. (2014). Effect of virtual reality on cognitive dysfunction in patients with brain tumor. *Annals of Rehabilitation Medicine*, 38(6), 726–733.
- Zhang, J. Y., Ding, Y. P., Wang, Z., Kong, Y., Gao, R., & Chen, G. (2017). Hydrogen sulfide therapy in brain diseases: From bench to bedside. *Medical Gas Research*, 7(2), 113–119. 7

- Zimmer, P., Baumann, F. T., Oberste, M., Wright, P., Garthe, A., Schenk, A., ... Wolf, F. (2016). Effects of exercise interventions and physical activity behavior on cancer related cognitive impairments: A systematic review. *BioMed Research International*, 2016.
- Ziu, M., Kim, B. Y. S., Jiang, W., Ryken, T., & J, O. J. (2020). *The role of radiation therapy in treatment of adults with newly diagnosed glioblastoma multiforme: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline update*. *Journal of Neuro-Oncology* (Vol. 150). Springer US.
- Zombeck, J. A., Fey, E. G., Lyng, G. D., & Sonis, S. T. (2013). A clinically translatable mouse model for chemotherapy-related fatigue. *Comparative Medicine*, 63(6), 491–497.
- Zucchella, C., Capone, A., Codella, V., De Nunzio, A. M., Vecchione, C., Sandrini, G., ... Bartolo, M. (2013). Cognitive rehabilitation for early post-surgery inpatients affected by primary brain tumor: A randomized, controlled trial. *Journal of Neuro-Oncology*, 114(1), 93–100.

ANNEXES

Curriculum Vitae

Gwenn ROPARS

Doctorante en Sciences de la Vie et de la Santé (4^e année)

+33 (0)6 70 46 06 91

ropars@cyceron.fr

UMR 6030 – UNICAEN – CNRS – CEA

ISTCT « Imagerie et Stratégies Thérapeutiques des pathologies Cérébrales et Tumorales »
Equipe CERVOxy

FORMATION UNIVERSITAIRE

2017-2021 **Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé. UMR 6030 ISTSCT, Caen France, Université Caen - Normandie.**

« Intérêt de l'activité physique pour contrer la toxicité induite par une irradiation encéphalique : Etudes longitudinales et multiparamétriques chez le rat. »

Direction : Pr Omar TOUZANI et co-encadrement du Dr Elodie PERES.

Financement : allocation doctorale d'établissement (bourse du MESRI), CDD initial de 3 ans à temps plein prolongé de 11 mois.

2015-2017 **Master Sciences Biomédicales, Spécialité Neurosciences et Sciences des Comportements, Parcours Sciences des Comportements, Université Caen – Normandie, Mention Bien (3/16).**

- **Stage de Recherche, master 2 (octobre 2016 – juin 2017), FRE-2001 ISTCT, équipe CERVOxy, Caen, France** : « *Mise en place d'outils d'évaluation des effets cognitifs de la radiothérapie chez le primate non humain (le marmouset)* », sous la direction du Pr Omar TOUZANI.
- **Stage de Recherche, master 1 (avril – mai 2016), UMR6301 ISTCT, équipe CERVOxy, Caen, France** : « *Analyse bibliographique des tests cognitifs chez le primate non humain* », sous la direction du Pr Omar TOUZANI.

2011-2015 **Licence Sciences de la Vie, mention Biologie-Biochimie, parcours Biologie Cellulaire et Physiologie Animale, Université de Nantes, France**

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Articles scientifiques

MRI and plasma biomarkers for the detection of radiation-induced brain injury associated to cognitive deficits in the rat. Ropars G, Dwiri FA, Brunaud C, Toutain J, Chazalviel L, Kauffmann F, Naveau M, Chatre L, Petit E, Valable S, Bernaudin M, Touzani O, Pérès EA. **Article à soumettre**

Articles en co-auteur

Physical activity attenuates the brain irradiation-induced skeletal muscle damage in the rat. Julie Bécam, Gwenn Ropars, Fatima-Azzahra Dwiri, Jérôme Toutain, Laurent Chazalviel, Mikaël Naveau, Samuel Valable, Myriam Bernaudin, Omar Touzani*, Elodie A. Pérès*. **Article à soumettre**

Communications orales

1. 22nd Annual Meeting of the LARC-Neuroscience network (12 octobre 2018, Rouen, France). Longitudinal study of whole brain radiation-induced fatigue and cognitive deficits in the rat. Ropars G, Le Gal R, Bernaudin M, Touzani O, Pérès E.
2. 12èmes journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest (15-17 mai 2019, Deauville, France). Etude multiparamétrique des effets de l'irradiation cérébrale chez le rat : des altérations tissulaires jusqu'aux déficits cognitifs. Gwenn ROPARS, Rozenn LE GAL, Fatima-Azzahra DWIRI, Jérôme TOUTAIN, Carole BRUNAUD, Edwige PETIT, Samuel VALABLE, Myriam BERNAUDIN, Omar TOUZANI*, Elodie A PÉRÈS*.
3. Journées de l'Ecole Doctorale (21-22 mai 2019, Caen, France). Kinetic studies of radiation-induced fatigue and cognitive impairments associated to tissue damages after whole brain radiation in the rat. Gwenn Ropars, Rozenn Le Gal, Fatima-Azzahra Dwiri, Myriam Bernaudin, Omar Touzani, Elodie Pérès.
4. Fifth Conference on Precision Image-Guided Small Animal RadioTherapy (9 -11 mars 2020, Munich, Allemagne). MRI biomarkers for the detection of radiation-induced brain injury associated to cognitive deficits. G. Ropars, F.A. Dwiri, R. Le Gal, J. Toutain, C. Brunaud, M. Naveau, E. Petit, M. Bernaudin, S. Valable, O. Touzani*, E.A. Pérès* > Reporté en raison du covid.

Communications orales en co-auteur

1. Journée de travail Cancéropôle Nord-Ouest, Axe 3 « Imagerie et adaptation thérapeutique » : Place de l'imagerie médicale dans la précision thérapeutique (17 décembre 2020, e-congrès). Relevance of multiparametric MRI to accurately detect radiation-induced brain injury in the rat. Brunaud C., Valable S., Dwiri F.A., Ropars G., Toutain J., Bernaudin M., Touzani O., Pérès E.A.
2. Congrès annuel de l'association des Neuro-Oncologues d'Expression Française (ANOCEF) (2-3 juillet 2021). MRI biomarkers for the detection of radiation-induced brain injury. Elodie A.

Pérès, Gwenn Ropars, Fatima-Azzahra Dwiri, Carole Brunaud, Jérôme Toutain, Mikaël Naveau, Edwige Petit, Samuel Valable, Myriam Bernaudin, Omar Touzani.

Communications affichées lors de Congrès

1. LARC Neurosciences (18 octobre 2019, Nantes, France). Kinetics of radiation-induced motor and cognitive impairments in the adult rat model. Gwenn Ropars, Fatima-Azzahra Dwiri, Rozenn Le Gal, Jérôme Toutain, Myriam Bernaudin, Samuel Valable, Omar Touzani*, Elodie A. Pérès*.
2. Journée Normande de Recherche Biomédicale, JNRb (19 novembre 2019, Caen, France). An animal model to evaluate radiation-induced damage on the healthy brain. Gwenn Ropars, Fatima-Azzahra Dwiri, Rozenn Le Gal, Jérôme Toutain, Myriam Bernaudin, Samuel Valable, Omar Touzani*, Elodie A. Pérès*.

Communications affichées lors de Congrès en co-auteur

1. 17th European Network for Light Ion Hadron Therapy (ENLIGHT) (1-3 juillet 2019, Caen, France). Multiparametric and longitudinal characterization of whole-brain irradiation model in rat. Pérès E, Ropars G, Dwiri FA, Toutain J, Brunaud C, Naveau M, Petit E, Bernaudin M, Valable S, Touzani O*, Myriam Bernaudin*, Samuel Valable*.
2. 16th International Congress of Radiation Research (ICRR 2019) (25-29 juillet 2019, Manchester, UK). Multiparametric and longitudinal characterization of whole-brain irradiation model in rat. Touzani O, Ropars G, Dwiri FA, Toutain J, Brunaud C, Naveau M, Petit E, Bernaudin M*, Valable S*, Pérès E*.
3. LARC Neurosciences (18 octobre 2019, Nantes, France). Is MRI sensitive enough to detect radiation-induced brain alterations? Fatima-Azzahra Dwiri, Gwenn Ropars, Jérôme Toutain, Carole Brunaud, Mikaël Naveau, Myriam Bernaudin, Samuel Valable, Omar Touzani*, Elodie Pérès*.
4. Journée Normande de Recherche Biomédicale, JNRb (19 novembre 2019, Caen, France). MRI biomarkers for the detection of radiation-induced brain injury. Fatima-Azzahra Dwiri, Gwenn Ropars, Jérôme Toutain, Carole Brunaud, Mikaël Naveau, Myriam Bernaudin, Samuel Valable, Omar Touzani*, Elodie A. Pérès*.
5. 13èmes journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest (13-15 mai 2020, Deauville, France). Intérêt de l'IRM multiparamétrique pour détecter les dommages cérébraux induits par la radiothérapie. Fatima-Azzahra DWIRI, Gwenn ROPARS, Jérôme TOUTAIN, Carole BRUNAUD, Mikaël NAVEAU, Edwige PETIT, Myriam BERNAUDIN, Samuel VALABLE, Omar TOUZANI*, Elodie PERES*.

6. 13èmes journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest (13-15 mai 2020, Deauville, France). L'activité physique réduit la sarcopénie observée après irradiation cérébrale chez le rat. Julie Bécam, Gwenn Ropars, Fatima-Azzahra Dwiri, Jérôme Toutain, Laurent Chazalviel, Mikaël Naveau, Samuel Valable, Myriam Bernaudin, Omar Touzani, Elodie A. Pérès.
7. NeuroFrance2021 (19-21 mai 2021, Paris (visio), France). The physical activity reduces the brain irradiation-induced skeletal muscle damage in the rat. Julie Bécam, Gwenn Ropars, Fatima-Azzahra Dwiri, Jérôme Toutain, Laurent Chazalviel, Mikaël Naveau, Samuel Valable, Myriam Bernaudin, Omar Touzani, Elodie A. Pérès.
8. Congrès annuel de l'association des Neuro-Oncologues d'Expression Française (ANOCEF) (2-3 juillet 2021, Rennes, France). Brain irradiation-induced skeletal muscle damage: Effects of physical activity. Julie BÉCAM, Gwenn ROPARS, Fatima-AzzahraDWIRI, Jérôme TOUTAIN, Laurent CHAZALVIEL, Mikaël NAVEAU, Samuel VALABLE, Myriam BERNAUDIN, Omar TOUZANI, Elodie A. PÉRÈS.
9. 5ème congrès SFRMBM (Société Française de Résonance Magnétique en Biologie & Médecine) (27-29 septembre 2021, Lyon, France). Intérêt de l'IRM multiparamétrique pour détecter les lésions cérébrales induites par l'irradiation chez le rat. Carole Brunaud, Samuel Valable, Fatima-Azzahra Dwiri, Gwenn Ropars, Jérôme Toutain, Mikaël Naveau, Marianne Léger, Thomas Freret, Myriam Bernaudin, Omar Touzani, Elodie A. Pérès.
10. 5ème congrès SFRMBM (Société Française de Résonance Magnétique en Biologie & Médecine) (27-29 septembre 2021, Lyon, France). L'IRM de diffusion du muscle squelettique : une méthode pertinente pour détecter les effets à distance induits par l'irradiation cérébrale chez le rat. Julie Bécam, Gwenn Ropars, Fatima-Azzahra Dwiri, Jérôme Toutain, Laurent Chazalviel, Mikaël Naveau, Samuel Valable, Myriam Bernaudin, Omar Touzani, Elodie A. Pérès.
11. Société Française de Radiothérapie Oncologique (SFRO) 2021 (6-8 octobre 2021, Paris (Visio), France). Modèle préclinique de radiotoxicité cérébrale : évaluation longitudinale et multiparamétrique des atteintes tissulaires et cognitives chez le rat adulte. Elodie A. Pérès, Gwenn Ropars, Fatima-Azzahra Dwiri, Carole Brunaud, Jérôme Toutain, Mikaël Naveau, Edwige Petit, Samuel Valable, Myriam Bernaudin, Omar Touzani.

Intérêt de l'activité physique pour contrer la toxicité induite par une irradiation encéphalique : Etudes longitudinales et multiparamétriques chez le rat.

La radiothérapie (RT) est une thérapie majeure des tumeurs cérébrales primitives ou métastatiques avec un gain de survie indéniable. Toutefois, les patients survivants au cancer éprouvent des séquelles après RT, dont une fatigue et des déficits cognitifs qui deviennent irréversibles et altèrent la qualité de vie des patients. Il est donc nécessaire de mener des recherches qui visent à identifier la chronologie d'apparition des dommages cérébraux, leurs implications dans les troubles cognitifs et proposer de nouvelles thérapies. De même, il est primordial de proposer des outils capables de détecter et de prédire les toxicités neurologiques induites par la RT pour améliorer la prise en charge des patients. Dans ce contexte, l'objectif de la thèse est double : 1/ développer et caractériser un modèle préclinique de radiotoxicité cérébrale chez le rat adulte et identifier de potentiels biomarqueurs d'imagerie et sanguins et 2/ évaluer la pratique d'une activité physique (AP) comme thérapie pour atténuer les lésions cérébrales et les déficits cognitifs radio-induits. Ainsi, nous avons réalisé des évaluations temporelles (jusqu'à 6 mois post-irradiation cérébrale, 30 Gy) de l'état général et comportemental de l'animal (fatigue, locomotion, mémoire) et les modifications de différents paramètres IRM (anatomique, vasculaire et de diffusion) associées à une étude sur les espèces réactives quantifiées dans le cerveau et le plasma. Les rats ont été soumis ou non à une AP forcée réalisée régulièrement et à long terme avec un tapis de course. Nous avons alors montré que l'irradiation cérébrale engendre une fatigue radio-induite associée à des déficits de la locomotion et de la mémoire à court et à long terme. Les paramètres mesurés par IRM de diffusion et IRM vasculaire semblent pertinents pour détecter précocement et tardivement, respectivement, les dommages cérébraux radio-induits, tout comme le stress oxydatif mesurable au niveau plasmatique. Des bienfaits de l'AP sont observés sur les atteintes neuropathologies induites par l'irradiation. A terme, ce modèle animal qui a été démontré pertinent vis-à-vis des symptômes décrits en clinique sera utilisé pour tester de nouvelles thérapies.

Mots-clés : Radiothérapie – Déficits cognitifs – Lésions cérébrales – Modèle animal – Biomarqueurs IRM – Biomarqueurs sanguins – Activité physique

Interest of physical activity to counteract toxicities induced by brain irradiation: Longitudinal and multiparametric studies in the rat.

Radiotherapy (RT) is a major therapy for primary or metastatic brain tumors with an undeniable gain in survival. However, cancer survivors have sequelae after RT, including fatigue and cognitive deficits that become irreversible and affect patient's quality of life. It is therefore necessary to conduct research aimed at identifying the chronology of the onset of brain damage, its implications in cognitive disorders and proposing new therapies. Likewise, it is essential to provide tools capable of detecting and predicting neurological toxicities induced by RT in order to improve patient care. In this context, the objective of the thesis is double: 1 / to develop and characterize a preclinical model of cerebral radiotoxicity in adult rats and to identify potential imaging and blood biomarkers and 2 / to evaluate the practice of a physical activity (PA) as therapy to alleviate brain damage and radiation-induced cognitive deficits. Thus, we carried out temporal evaluations (up to 6 months post-brain irradiation, 30 Gy) of the general and behavioral state of the animal (fatigue, locomotion, memory) and the modifications of various MRI parameters (anatomical, vascular and diffusion) associated with a study of reactive species quantified in brain and plasma. The rats were or were not subjected to regular and long-term forced PA with a treadmill. We then showed that brain irradiation causes radiation-induced fatigue associated with locomotion and short- and long-term memory deficits. The parameters measured by diffusion MRI and vascular MRI seem relevant to detect early and late, respectively, radiation-induced brain damage, as well as oxidative stress measurable at the plasma level. Benefits of PA are observed on neuropathological damage induced by radiation. Ultimately, this animal model, which has been shown to be relevant to the symptoms described in the clinic, will be used to test new therapies.

Keywords: Radiation therapy - Cognitive deficits – Radiation-induced brain injury – Animal model – MRI biomarkers – Blood biomarkers – Physical activity