

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Centre de Biophysique Moléculaire – CNRS UPR4301

THÈSE présentée par :
Dounia EL HAMRANI

soutenue le : **8 Décembre 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline : **Biologie**

**Evaluation quantitative par IRM et ^1H SRM de
l'exposition à des xénobiotiques chez le petit animal
dans un contexte clinique et environnemental**

THÈSE dirigée par :
Dr. Sandra MEME

CR1, CNRS UPR4301, Orléans

Co-encadrant :
Dr. William MEME

MCU, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :
Pr. Giulio GAMBAROTA
Dr. Bich-Thuy DOAN

PU, Université de Rennes 1
CR1, CNRS UMR8258/U1022, Paris Descartes

JURY :

Pr. Chantal PICHON
Dr. Sandra MEME
Pr. Giulio GAMBAROTA
Dr. Bich-Thuy DOAN
Pr. Jean-Marc CONSTANS

PU, Université d'Orléans, Présidente du jury
CR1, CNRS UPR4301, Orléans
PU, Université de Rennes 1
CR1, CNRS UMR8258/U1022, Paris Descartes
PU-PH, Université de Picardie Jules Verne/Centre
Hospitalier d'Amiens
Responsable du pôle recherche en imagerie et
biologie de Guerbet, Aulnay-sous-Bois

Dr. Philippe ROBERT

Remerciements

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au Centre de Biophysique Moléculaire (CBM, CNRS-UPR4301) au sein de l'équipe « Complexes métalliques et IRM » et ils ont été financés par une bourse de la Région Centre Val de Loire. Je tiens à remercier Dr Eva Jakob Toth de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et de son équipe durant mes trois années de thèse.

Je souhaite remercier Dr Bich-Thuy Doan et Pr Giulio Gambarota pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. J'adresse également mes remerciements aux Pr Jean-Marc Constans, Pr Chantal Pichon et Dr Philippe Robert pour accepter de participer à l'examen de ces travaux de thèse.

Je suis extrêmement reconnaissante à ma directrice de thèse Dr Sandra Mème pour avoir dirigé ma thèse durant ces trois années. Je lui adresse mes remerciements les plus chaleureux pour avoir accepté d'encadrer une biologiste et de m'avoir accordé sa confiance dans la réalisation de ces travaux. Merci pour les précieuses relectures scientifiques (et grammaticales !) ainsi que pour le soutien et la bonne humeur qui ont permis le bon déroulement de cette thèse.

Je remercie également chaleureusement Dr William Mème pour le co-encadrement de mes travaux de thèse. Merci pour sa disponibilité et ses corrections avisées. Un grand merci d'avoir été mon tuteur dans l'expérience extrêmement enrichissante de l'enseignement.

Je remercie les membres de mon équipe pour les échanges scientifiques (et moins scientifiques) ainsi que nos nombreuses célébrations autour de goûters faits maison : Sarah Lacerda, Frédéric Szeremeta, Saïda Majdoub, Jean-François Morfin, Célia Bonnet, Agnès Pallier, Kristina Djanasvili et Eva Jakab Toth.

Je tiens à remercier Dr Jean-Claude Beloeil pour les nombreuses conversations scientifiques et conviviales ainsi que de m'avoir fait bénéficier de ses conseils en tant qu'émérite.

J'adresse mes remerciements aux Dr Norah Defamie, Dr Marc Mesnil et Dr Amandine Chepied pour m'avoir accueillie chaleureusement dans leur équipe afin de me faire découvrir leurs travaux dans le traitement des souris et en histologie ainsi que pour nos nombreux échanges sur le projet des dérivés chlorés du bisphénol A.

Je tiens à remercier Dr Philippe Robert et Dr Véronique Vives pour notre collaboration stimulante sur le projet de l'accumulation cérébrale des agents de contraste linéaires. Cette collaboration a été extrêmement fructueuse et elle a grandement enrichi mes travaux de thèse.

Remerciements

Je tiens également à remercier Dr Didier Wecker pour le développement de la séquence de spectroscopie de diffusion et sa disponibilité à répondre à mes nombreuses questions tous le long de ma thèse.

Je remercie Dr Yann Le Fur (CRMBM, Marseille), Hélène Ratiney (CREATIS – INSA, Lyon) et Juliette Valette (CEA Saclay) pour avoir accepté d'échanger sur la quantification en ^1H SRM.

Je tiens également à remercier Dr Anne-Karine Bouzier-Sore et Dr Marie-Christine Beauvieux pour m'avoir initiée à la RMN lors de mon master et de m'avoir donné la motivation de poursuivre en thèse.

Je remercie mes co-bureaux de l'A308 qui ont rendu l'aventure de la thèse des plus sympathiques. A Sophie Laine, ma collègue sudiste avec toujours un gâteau « à la broche » dans le tiroir. A Maamar Jlali pour les pauses café accompagnées de nombreuses anecdotes historiques et de l'indispensable morceau de chocolat. A Patrick Malikidogo, le « cousin » qui me laissera en mémoire (beaucoup !) de ses expressions.

Un remerciement tout particulier à ma très chère amie « Albacita » Casas Mora, la plus galicienne des espagnoles, pour son soutien depuis le premier jour de la thèse et avec qui j'ai partagé de nombreux bons souvenirs orléanais, de repas faits maison, de vinyles, de rires et qui se poursuivront par beaucoup d'autres dans l'avenir.

La liste des belles rencontres orléanaises serait extrêmement longue, je tiens à remercier l'ensemble des personnes que j'ai pu rencontrer au CBM et à l'ADSO (Association des Doctorants Scientifiques Orléanais). Un merci tout particulier à la très bretonne Charlotte Rieux et au très normand Wilfried Badat pour leurs amitiés et aux nombreuses crêpes partagées.

Sur le chemin de la thèse, la fac de Bordeaux m'a apporté un lot de compagnons qui sont devenus des amis. Un merci chaleureux aux Bonobios pour votre soutien enthousiaste et votre humour corrosif : Antoine Pelletan, Terry Simon, Aloïs Lemelletier, Marguerite-Marie Le Pannérer, Armelle Godefroy. Un merci tout particulier à Laure Bourcier pour son soutien tout le long de mes études ainsi que de toujours m'offrir son hospitalité à Bordeaux. Un remerciement plus que chaleureux à Clémence Saint-Marc, amie de voyage, festival, pâtisserie, danse de la confiance... et pour toujours croire en moi !

Remerciements

Le chemin avant la thèse étant vraiment long, à mes amis de ma terre natale agenaïse. Merci à Fanny Trouvé, la norvégienne polyglotte pour notre très belle amitié et de m'avoir accueillie en terre Viking. Merci à Juliette Cornière et Jérôme Grondeux pour leurs soutiens et leur hospitalité à Chartres. Merci à Claire Giuseppi, ma plus vieille amie, dont j'applaudirai toujours les talents sur les planches. Merci à Rose et Jean-Claude Pujos pour leur affection et leur soutien dès mon plus jeune âge.

Le chemin avant la thèse étant vraiment très long, un merci à ma famille qui a toujours cru en moi. A mes grands frères, Hichame et Jamel, qui ont grandement contribué à forger mon caractère. A mon père, Mohamed, à son amour et sa fameuse phrase de motivation à toute épreuve « C'est la vie ! ». A ma mère, Naïma, je suis reconnaissante pour son amour et son soutien émotionnel inconditionnel. Je vous remercie de m'avoir élevée avec une ouverture d'esprit sur le monde et de toujours conserver la plus grande des curiosités pour la vie. Je vous dédie le fruit de mes longues années d'études.

« Tout est poison et rien n'est sans poison ; la dose seule fait que quelque chose n'est pas un poison. »

Paracelse

Sommaire

Introduction générale	1
1^{ère} partie : Caractérisation structurale et métabolique par IRM et ¹H SRM	6
Chapitre 1 : Caractérisation tissulaire par IRM	7
1.1. Les fondamentaux de l'IRM	8
1.1.1 Les principes de base de la RMN.....	8
1.1.2 Le codage spatial du signal et reconstruction de l'image	12
1.2. Imagerie morphologique	14
1.2.1 Les séquences utilisées en IRM	14
1.2.1.1 La séquence écho de spin	15
1.2.1.2 La séquence écho de gradient	17
1.2.2 Les pondérations : T1, T2 ou T2* et densité de proton	19
1.2.3 Les informations quantitatives obtenues des images IRM.....	21
1.3. Imagerie de diffusion	24
1.3.1 Imagerie pondérée en diffusion.....	24
1.3.2 Imagerie des tenseurs de diffusion.....	27
Chapitre 2 : Principe de la SRM et quantification des métabolites	30
2.1. Spectroscopie par Résonance Magnétique du proton <i>in vivo</i>	31
2.1.1 Les principes de base de la ¹ H SRM.....	31
2.1.2 La ¹ H SRM localisée monovoxel.....	33
2.1.2.1 Les séquences en ¹ H SRM localisée monovoxel.....	33
2.1.2.2 L'homogénéisation du champ magnétique constant	34
2.1.2.3 La suppression de l'eau	34
2.1.2.4 La suppression du signal en dehors du voxel d'intérêt.....	36
2.1.3 Les métabolites présents dans le cerveau et le foie par ¹ H SRM.....	36
2.1.3.1 Profil métabolique du cerveau	36
2.1.3.2 Profil métabolique du foie	41
2.2. Les étapes de post-traitement avant la quantification	43
2.2.1 Post-traitement dans le domaine fréquentiel.....	43
2.2.2 Post-traitement dans le domaine temporel	44
2.3. Les méthodes de quantification en SRM	45
2.3.1 La quantification relative par la méthode des ratios	45

2.3.1.1.	Ratios par la créatine, la choline ou le NAA dans le cerveau.....	46
2.3.1.2.	Ratios des lipides dans le foie.....	47
2.3.2.	La quantification absolue par la méthode ERETIC digital	48
2.3.3.	Les modèles d'ajustement.....	50
2.3.3.1.	LCModel.....	51
2.3.3.2.	jMRUI.....	52
2.4.	La spectroscopie pondérée en diffusion	55
2.4.1.	Principe de la spectroscopie pondérée en diffusion	55
2.4.2.	Les séquences DWS et le post-traitement des données	56
2.4.2.1.	Les séquences DWS utilisées dans la littérature	56
2.4.2.2.	Post-traitement des données	59
Bibliographie 1^{ère} partie.....		60
2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral.....		64
Chapitre 3 : Les agents de contraste à base de gadolinium en IRM et leur accumulation dans le cerveau.....		65
3.1.	Les agents de contraste en IRM	66
3.1.1.	Principe de base des agents de contraste.....	66
3.1.2.	Les agents de contraste à base de gadolinium	67
3.2.	L'accumulation des agents de contraste à base de gadolinium dans l'organisme	69
3.2.1.	Les effets indésirables connus	69
3.2.2.	Accumulation du gadolinium au niveau cérébral	70
3.2.2.1.	Mesure de l'hypersignal en IRM	70
3.2.2.2.	Variation de la vitesse de relaxation R1	72
3.2.2.3.	Mesure du dépôt de gadolinium dans le cervelet par ICP-MS	72
3.2.2.4.	Histologie.....	74
3.2.2.5.	Hypothèses de mécanismes de l'accumulation du gadolinium	74
3.2.3.	Conclusion	76
Chapitre 4 : Evaluation des injections répétées de gadodiamide dans les noyaux cérébelleux profonds chez le rat.....		78
4.1.	Matériels et méthodes	79
4.1.1.	Evaluation <i>in vitro</i> de l'effet du gadodiamide sur les spectres ¹ H.....	79
4.1.1.1.	Préparation des fantômes.....	79
4.1.1.2.	Acquisition ¹ H SRM et analyse des spectres.....	79

4.1.2.	Modèle animal des injections répétées.....	80
4.1.3.	Les expériences IRM et ^1H SRM <i>in vivo</i>	81
4.1.4.	Analyse des données IRM et ^1H SRM <i>in vivo</i>	83
4.1.4.1.	Ratio IRM	83
4.1.4.2.	Analyse des données ^1H SRM obtenues dans les NCP par plusieurs méthodes de quantification.....	83
4.1.5.	Analyse histologique des noyaux cérébelleux profonds à M13.....	85
4.1.6.	Analyse statistique	86
4.2.	Résultats & conclusions	87
4.2.1.	Etude de l'influence du gadodiamide sur les spectres ^1H	87
4.2.2.	Suivi sanitaire et des poids des animaux.....	88
4.2.2.1.	Suivi sanitaire	88
4.2.2.2.	Suivi des poids.....	89
4.2.2.3.	Conclusion	90
4.2.3.	Suivi longitudinal de l'hypersignal suite aux injections répétées de gadodiamide par IRM	91
4.2.3.1.	Ratio NCP/ Cortex cérébelleux	91
4.2.3.2.	Ratio NCP/ Tronc cérébral	92
4.2.3.3.	Comparaison des ratios.....	93
4.2.3.4.	Conclusion	93
4.2.4.	Comparaison des méthodes de quantification en ^1H SRM sur les données obtenues dans les NCP	94
4.2.4.1.	ERETIC digital	95
4.2.4.2.	LCModel.....	96
4.2.4.3.	QUEST	97
4.2.4.4.	AMARES.....	98
4.2.4.5.	Comparaison des méthodes de quantification en ^1H SRM.....	99
4.2.5.6.	Conclusion	101
4.2.5.	Analyse histologique.....	103
4.2.5.1.	Analyse morphologique par immunohistochimie.....	103
4.2.5.2.	Analyse quantitative de la créatine kinase B	105
4.2.5.3.	Conclusion	107
4.3.	Discussion et perspectives	108
Bibliographie 2^{ème} partie		112

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral..... 116

Chapitre 5 : Les effets du BPA et de ses dérivés chlorés 117

5.1. Bisphénol A : un perturbateur endocrinien ubiquitaire..... 118

5.1.1. Les voies d'exposition chez l'Homme..... 118

5.1.2. Les impacts biologiques du BPA 121

5.1.2.1. Perturbateur endocrinien 121

5.1.2.2. Impact du BPA sur la santé 122

5.2. Les effets du BPA au niveau hépatique 125

5.2.1. La détoxification du BPA par le foie 125

5.2.2. Le BPA et la stéatose hépatique..... 126

5.3. Les effets du BPA au niveau cérébral..... 127

5.3.1. Les modes d'action du BPA dans le cerveau 127

5.3.1.1. Les altérations morphologiques 127

5.3.1.2. Les perturbations neurochimiques..... 128

5.3.1.3. Les modifications comportementales 129

5.3.2. Les connexines 43 et le BPA 130

5.3.2.1. Définition et rôles des connexines..... 130

5.3.2.2. Impact du BPA sur la connexine 43 131

5.4. Les dérivés chlorés du BPA 132

5.4.1. Formation des dérivés chlorés dans l'eau potable 132

5.4.2. La bioaccumulation des dérivés chlorés du BPA chez l'Homme..... 134

5.4.3. Les propriétés des dérivés chlorés du BPA..... 135

5.5. Conclusion..... 135

Chapitre 6 : Evaluation d'une exposition périnatale au BPA et à ses dérivés dichlorés au niveau hépatique chez la souris..... 137

6.1. Matériels et Méthodes..... 138

6.1.1. Le modèle animal..... 138

6.1.2. Les expériences IRM et ¹H SRM..... 138

6.1.3. Analyse des données IRM et ¹H SRM 139

6.1.3.1. Analyse de texture des images du foie obtenues par IRM 140

6.1.3.2. Analyse spectrale et quantification..... 141

6.1.4. Analyse histologique..... 142

6.1.5. Les analyses statistiques 143

6.2. Résultats et conclusions	144
6.2.1. Evaluation de la structure hépatique par IRM et histologie	144
6.2.1.1. Analyse de texture des images IRM	144
6.2.1.2. Analyse histologique du foie	147
6.2.1.3. Conclusion	149
6.2.2. Evaluation quantitative de la composition lipidique du foie par ^1H SRM	150
6.2.2.1. Placement du voxel dans le foie	150
6.2.2.2. La composition lipidique en ^1H SRM	152
6.2.2.3. Conclusion	156
6.3. Discussion et perspectives	157
Chapitre 7 : Evaluation d'une exposition périnatale au BPA et à ses dérivés chlorés au niveau cérébral chez la souris	160
7.1. Matériels et méthodes	161
7.1.1. Le modèle animal	161
7.1.2. Les expériences DTI et ^1H SRM	162
7.1.3. Analyse des données DTI et ^1H SRM	163
7.1.3.1. Analyse des paramètres DTI	163
7.1.3.2. Quantification spectrale	164
7.1.4. L'optimisation <i>in vitro</i> et la validation <i>in vivo</i> de la séquence de diffusion spectroscopique	164
7.1.4.1. Optimisation <i>in vitro</i>	165
7.1.4.2. Validation <i>in vivo</i>	165
7.1.5. Les méthodes statistiques	166
7.2. Résultats et Conclusions	167
7.2.1. Evaluation de la structure cérébrale par DTI	167
7.2.1.1. Striatum	168
7.2.1.2. Cortex cérébral	170
7.2.1.3. Hippocampe	172
7.2.1.4. Conclusion	175
7.2.2. Evaluation du métabolisme hippocampique par ^1H SRM	177
7.2.2.1. Validation qualitative du placement du voxel	177
7.2.2.2. Effets du BPA et de ses dérivés chlorés sur le métabolisme de l'hippocampe ..	180
7.2.2.3. Conclusion	190

7.2.3. Etude par diffusion spectroscopique des effets du BPA dichlorés et du phénotype hétérozygote pour la connexine 43.....	192
7.2.3.1. Optimisation <i>in vitro</i>	193
7.2.3.2. Validation <i>in vivo</i> de la diffusion spectroscopique.....	198
7.2.3.3. Conclusion	201
7.3. Discussion et perspectives	203
Bibliographie 3^{ème} Partie.....	208
Annexe 1 : Les paramètres de texture	218
Annexe 2 : Communications scientifiques	221

Liste des abréviations

Liste des abréviations

ACP	Analyse en composantes principales
ADC	Coefficient de diffusion apparent
AG	Acide gras
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AMARES	Advanced method for accurate, robust and efficient spectral
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
Asp	Aspartate
ATP	Adénosine triphosphate
Bet	Bétaïne
BPA	Bisphénol A
CCC	Composés contenant de la choline
CHESS	Chemical shift selective
Cho	Choline
CK-BB	Créatine kinase B
Cr	Créatine
CTR	Contrôle
Cx	Connexine
DCBPA	Bisphénol A dichloré
DCN	Deep cerebellar nuclei
DTI	Imagerie des tenseurs de diffusion
DTJ	Dose tolérable journalière
DWI	Imagerie pondérée en diffusion
DWS	Spectroscopie pondérée en diffusion
EFSA	European food safety agency
EPA	Environmental Protection Agency
EPI	Imagerie écho-planaire
ER	Récepteur estrogénique
ERETIC	Electronic Reference to access <i>in vivo</i> concentration
ESM	Ecart standard à la moyenne
F	Femelle
FA	Fraction d'anisotropie
FDA	Food Drug administration

Liste des abréviations

FID	Signal de précession libre
GABA	Acide γ aminobutyrique
GBCA	Agent de contraste à base de gadolinium
Gd	Gadolinium
GE	Echo de gradient
Glc	Glucose
Gln	Glutamine
Glu	Glutamate
Gly	Glycogène
GPC	Glycérophosphocholine
HE	Hématoxyline éosine
HPC	Hippocampe
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HZ	Hétérozygote
ICP-MS	Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif
IRM	Imagerie par résonance magnétique
jMRUI	Java-based MR user interface
Lac	Lactate
LA-ICP-MS	Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif avec ablation laser
LCModel	Linear Combination Model
MCBPA	Bisphénol A monochloré
M	Mâle
MD	Diffusivité moyenne
mI	Myo-inositol
MM	Macromolécules
NAA	N-acétyl aspartate
NAAG	N-acétyl aspartyl glutamate
NCP	Noyaux cérébelleux profonds
OVS	Outer volume selection
PCho	Phosphocholine
PCr	Phosphocréatine
ppm	Partie par million
PRESS	Point resolved spectroscopy

Liste des abréviations

PUBI	Index des liaisons des acides gras polyinsaturés
QUEST	Quantitation based on quantum estimation
RARE	Rapid acquisition with relaxation enhancement
RF	Radiofréquence
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROI	Région d'intérêt
SC	Fraction des acides gras saturés
SE	Echo de spin
SRM	Spectroscopie par résonance magnétique
ST	Phénol sulfotransférase
STEAM	Stimulated echo acquisition mode
Tau	Taurine
T1	Temps de relaxation de l'aimantation longitudinale
T2	Temps de relaxation de l'aimantation transversale
T3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine
TE	Temps d'écho
TF	Transformée de Fourier
TR	Temps de répétition
TSH	Thyréostimuline
TUBI	Index des liaisons des acides gras insaturés
TUFI	Index des acides gras insaturés
UGT	UDP-glucuronyl-transférase
VAPOR	Variable pulse power and optimized relaxation delays
WT	Wild type

Introduction générale

L'Imagerie et la Spectroscopie par Résonance Magnétique du proton (IRM et ^1H SRM) sont des techniques basées sur le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et ayant émergé depuis le milieu du 20^{ème} siècle. En 1971, Raymond Damadian démontra la première application médicale en utilisant les propriétés de la RMN pour distinguer le tissu sain du tissu tumoral chez le rat. En 1973, Paul C. Lauterbur fut le premier à utiliser la méthode RMN pour l'imagerie en produisant la première image de deux tubes tests. Parallèlement au développement de l'IRM, la SRM *in vivo* se développe dès 1974 dans le groupe de Rex E. Richards et George K. Radda à Oxford.

Dès les années 1980, l'IRM se démocratise très largement dans le domaine de la radiologie clinique de par l'absence de radiation ionisante et son excellent contraste entre les tissus mous. La SRM est une technique complémentaire à l'IRM pour l'identification des processus physiopathologiques par la caractérisation des métabolites dans le volume tissulaire sélectionné. L'IRM et la SRM sont utilisées à des fins de diagnostic en neurologie (e.g. accident vasculaire cérébral, sclérose en plaques) et dans la détection des dommages des tissus mous (e.g. cartilage, ligament). Elles permettent aussi le suivi longitudinal du grade tumoral ainsi que l'évaluation de l'efficacité et les effets secondaires de traitements (e.g. chimiothérapie).

L'IRM et la SRM ont été également utilisées en préclinique chez le petit animal pour le développement méthodologique (e.g. séquences, instrumentation) ainsi que dans la caractérisation des pathologies (e.g. cancer, maladies neurodégénératives) et l'évaluation de nouvelles molécules (e.g. agent de contraste, chimiothérapie).

Récemment, l'IRM et la SRM ont été proposées comme des méthodes innovantes en toxicologie pour caractériser *in vivo* les risques émergents des composés exogènes (polluants environnementaux, nouvelles entités chimiques)^{1,2}. En comparaison avec les techniques telles que la spectroscopie de masse et la chromatographie gazeuse ou liquide qui étudient la protéomique (l'ensemble des protéines) et la métabolomique (les composés organiques issus de réactions biochimiques), l'IRM et la SRM sont des techniques non invasives qui permettent d'obtenir des informations structurales et métaboliques sur un organe donné (e.g. foie, cerveau, rein et cœur).

¹ J Lindon, E Holmes, and J Nicholson, 'Toxicological Applications of Magnetic Resonance', *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 45.1-2 (2004), 109–43

² M. Tengowski and J. Kotyk, 'Risk Identification and Management: MRI as a Research Tool in Toxicology Studies of New Chemical Entities', *Progress in Drug Research.*, 62 (2005), 257–78.

De ce fait, les techniques IRM et ^1H SRM permettent de réduire le nombre d'animaux lors d'un suivi longitudinal ou d'étudier plusieurs organes en parallèle sur les mêmes animaux. L'équipe d'accueil de ces travaux de thèse « Complexes métalliques et IRM » (CBM, CNRS-UPR4301, Orléans, France) a développé une expertise dans les techniques IRM et ^1H SRM pour l'évaluation préclinique de pathologies et des agents de contraste chez le petit animal ainsi que dans la méthode d'analyse des images par les profils de texture.

Dans la perspective de ces travaux de thèse, nous avons souhaité évaluer à l'aide de ces outils les effets de l'exposition à des xénobiotiques dans un contexte clinique ou environnemental chez les rongeurs. Dans la première partie de cette thèse, il sera décrit les méthodes de quantification utilisées pour la caractérisation tissulaire par IRM dans le **chapitre 1** et pour l'évaluation du profil métabolique par ^1H SRM dans le **chapitre 2**.

Dans le cadre d'une exposition clinique à un xénobiotique, nous nous sommes intéressés aux agents de contraste à base de gadolinium (GBCA) utilisés en IRM. En effet, ils sont considérés comme une catégorie pharmaceutique extrêmement sûre mais une littérature a émergé depuis 2014 sur l'accumulation des GBCA au niveau du cerveau chez des patients ayant reçu des injections de GBCA lors de multiples examens IRM. Cette accumulation de GBCA cause un hypersignal observable dans les noyaux cérébelleux profonds sur les images pondérées en T1. Dans la deuxième partie de cette thèse, je présenterai dans le **chapitre 3** une revue bibliographique de l'accumulation des agents de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral.

Actuellement, de nombreuses interrogations restent en suspens sur la persistance à long terme de cette accumulation ainsi que sur les conséquences engendrées au niveau cérébral. Nous avons souhaité répondre à deux problématiques principales dans cette deuxième partie :

- *Est-ce que l'hypersignal mesuré dans les noyaux cérébelleux profonds sur les images pondérées en T1 persiste à long terme ?*
- *Est-ce que cette accumulation pourrait induire des modifications cellulaires détectables par ^1H SRM ?*

Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé un modèle d'exposition chronique et répétée à un agent de contraste linéaire (gadodiamide) chez le rat (en collaboration avec le département « Recherche et Innovation » de Guerbet, Aulnay-sous-Bois, France).

Dans le **chapitre 4**, il sera détaillé les résultats obtenus sur le suivi longitudinal à long terme (1 an post-injections) au niveau des noyaux profonds cérébelleux. Les données ont été obtenues par mesure de l'intensité du signal sur des images pondérées en T1 et par quantification du profil métabolique. Pour évaluer la robustesse des résultats obtenus en ^1H SRM, une comparaison a été effectuée entre plusieurs méthodes de quantification (ERETIC digital, LCModel, QUEST et AMARES). La discussion et les perspectives de nos résultats seront présentées en conclusion de ce chapitre.

Dans le cadre d'une exposition à un xénobiotique environnemental, nous nous sommes intéressés au bisphénol A (BPA) qui est un perturbateur endocrinien présent de manière ubiquitaire (e.g. contenants alimentaires, air, sol, eau) et dont les voies d'expositions chez l'Homme sont multiples. Récemment, il a été reporté que le traitement de l'eau potable par l'hypochlorite de sodium conduisait à la formation de dérivés chlorés du BPA. Or, ces dérivés chlorés présentent une activité œstrogénique plus importante que le composé parent BPA. Néanmoins, leurs impacts *in vivo* n'ont pas encore été évalués. Dans la troisième partie de cette thèse, je présenterai dans le **chapitre 5** une revue de la littérature sur la présence ubiquitaire dans l'environnement du BPA et ses multiples effets comme perturbateur endocrinien ainsi que l'état des connaissances actuelles sur les dérivés chlorés du BPA.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous nous sommes focalisés sur les effets d'une exposition pendant la période périnatale (gestation et lactation). En effet, il a été formulé la théorie de « l'origine fœtale des pathologies adultes » qui stipule que des expositions délétères pendant la période du développement intra-utérin peuvent induire des perturbations physiopathologiques à l'âge adulte et conduire à une augmentation de l'incidence de maladies.

Dans cette perspective, nous avons exploré les conséquences d'une exposition périnatale aux dérivés chlorés du BPA au niveau de deux organes clés : le foie et le cerveau. D'une part, de récentes études mettent en évidence que l'exposition au BPA peut induire une perturbation du métabolisme lipidique et conduire au développement de la stéatose hépatique (accumulation de lipides dans les hépatocytes). D'autre part, il a été rapporté dans la littérature des effets délétères du BPA dans le cerveau au niveau morphologique, neurochimique et comportemental. De plus, la connexine 43 (sous-unité principale des jonctions communicantes au niveau des astrocytes) apparaît comme une cible potentielle du BPA pour expliquer les effets observés au niveau cérébral chez les modèles animaux.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons voulu répondre aux problématiques suivantes :

- *Est-ce que l'exposition périnatale au BPA et/ou ses dérivés chlorés conduit à des modifications précoces dans la structure et la composition lipidique du foie ?*
- *Est-ce que l'exposition périnatale au BPA et/ou ses dérivés chlorés induit des perturbations précoces dans la microstructure et la composition neurochimique du cerveau? Les souris présentant un phénotype hétérozygote pour la connexine 43 sont-elles plus sensibles à ces xénobiotiques ?*

Nous avons exploré ces problématiques à l'aide d'un modèle de souris d'exposition périnatale au BPA et à ses dérivés chlorés (en collaboration avec l'équipe « Implications physiologiques et physiopathologiques des connexines », Laboratoire STIM, CNRS-ERL7368, Poitiers, France). Compte tenu des propriétés œstrogéniques du BPA et de ses dérivés chlorés, une comparaison entre les mâles et des femelles a été réalisée pour explorer des éventuelles différences liées au sexe.

Dans le **chapitre 6**, les effets au niveau hépatique ont été évalués : (i) la structure par analyse de texture des images en pondération de proton ; (ii) le calcul de la composition en acide gras par ^1H SRM.

Dans le **chapitre 7**, les perturbations au niveau cérébral ont été analysées : (i) la microstructure par imagerie des tenseurs de diffusion ; (ii) la composition neurochimique (homéostasie cellulaire, neurotransmetteurs et métabolites spécifiques à un compartiment cellulaire) par ^1H SRM. Nous avons également exploré l'hypothèse de la vulnérabilité du phénotype hétérozygote pour la connexine 43 lors d'une exposition périnatale au BPA et à ses dérivés chlorés. Les résultats obtenus en imagerie des tenseurs de diffusion et en ^1H SRM montrent des effets plus prononcés chez les mâles exposés au mélange de BPA dichlorés, nous avons souhaité caractériser plus précisément ces perturbations par la technique de diffusion spectroscopique qui détecte les anomalies de l'intégrité intracellulaire.

La discussion et les perspectives des résultats du foie et du cerveau seront présentées à la fin des **chapitres 6 et 7** respectivement.

1^{ère} partie : Caractérisation structurale et métabolique par IRM et ^1H SRM

Chapitre 1 : Caractérisation tissulaire par IRM

1.1. Les fondamentaux de l'IRM

1.1.1 Les principes de base de la RMN

La résonance magnétique nucléaire (RMN) met en jeu les noyaux des atomes et permet l'observation d'un grand nombre de composés chimiques. Les noyaux possèdent une propriété quantique intrinsèque appelée spin nucléaire, lequel possède un moment magnétique nucléaire $\vec{\mu}$.

Les noyaux sont capables de se comporter tels des petits aimants dans un champ magnétique à condition qu'ils possèdent un spin non nul (un nombre impair de protons et de neutrons), ce qui est le cas de l'hydrogène ¹H, du carbone ¹³C, du phosphore ³¹P et du fluor ¹⁹F (**Fig. 1.1**).

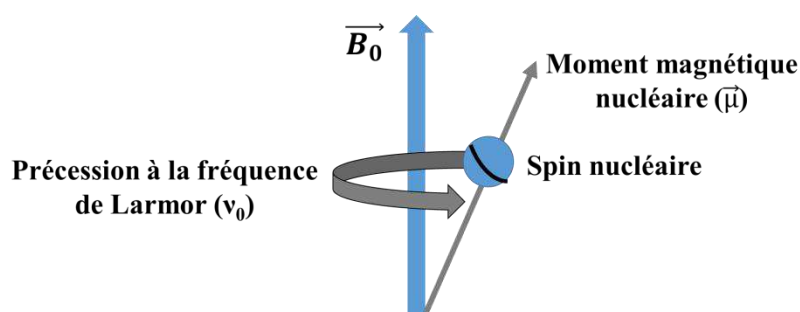


Figure 1.1 : Précession d'un spin nucléaire en présence d'un champ magnétique (B_0)
(adapté de Cleary and Guimaraes 2014)

Dans les systèmes biologiques, le noyau de l'atome d'hydrogène est l'élément le plus abondant. En effet, la plupart des tissus contiennent une concentration en protons de l'ordre de 80 M (Cleary and Guimaraes 2014). Le proton trouve ainsi de larges applications en spectroscopie (chimie analytique et SRM *in vivo*) et en imagerie par résonance magnétique (IRM). Dans le cadre de ces travaux de thèse, seul le proton en IRM et SRM *in vivo* est abordé.

Le principe de la RMN est caractérisé par trois étapes : la polarisation, la résonance et la relaxation (Kastler and Anstett 2011; Helm, Merbach, and Tóth 2013; Currie et al. 2013; Cleary and Guimaraes 2014).

(1) Polarisation : Sous l'effet du champ magnétique constant de l'aimant $\vec{B}_0$, les moments magnétiques des noyaux $\vec{\mu}$ sont orientés en majorité parallèlement à $\vec{B}_0$ (état de basse énergie) et en minorité antiparallèlement (état de haute énergie) (Cleary and Guimaraes 2014).

Ce phénomène est appelé la levée de la dégénérescence et cela donne une aimantation macroscopique résultante $\vec{M}_0$ qui est parallèle à $\vec{B}_0$ (par convention, l'axe z) (**Fig. 1.2**).

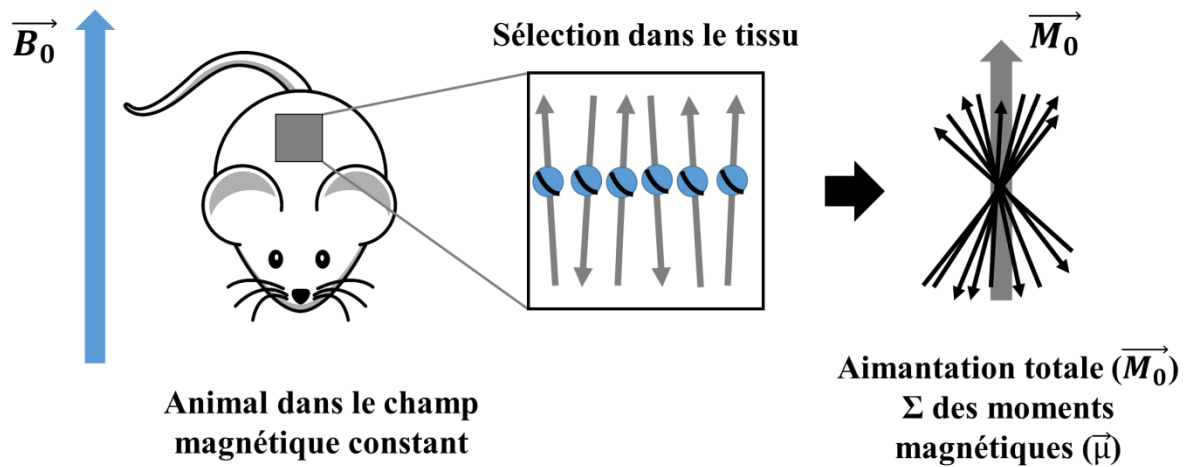


Figure 1.2 : Levée de la dégénérescence sous l'effet du champ magnétique constant B_0
(adapté de Cleary and Guimaraes 2014)

De plus, les spins ont un mouvement de précession angulaire autour de l'axe $\vec{B}_0$ à la fréquence de résonance spécifique du noyau étudié, appelée fréquence de Larmor (**Fig. 1.1**). La fréquence de Larmor est définie par l'équation 1.1.

$$\nu_0 = \frac{\gamma \|\vec{B}_0\|}{2\pi} \quad [1.1]$$

Elle est dépendante de γ qui est le rapport gyromagnétique caractéristique de la nature du noyau étudié et de la force du champ magnétique de l'aimant $\vec{B}_0$. Par exemple, le ¹H possède un ratio gyromagnétique ($\gamma/2\pi$) de 42,58 MHz.T⁻¹.

(2) Résonance : Le champ magnétique $\vec{B}_0$ est beaucoup plus grand que $\vec{M}_0$, cela est donc impossible de détecter l'aimantation des spins le long de l'axe y. Afin de détecter le signal des spins, une impulsion de radiofréquence (RF) appelée $\vec{B}_1$ est appliquée afin de faire basculer l'aimantation des spins dans le plan perpendiculairement à $\vec{B}_0$ (**Fig. 1.3**).

La mesure pourra être ainsi faite dans le plan xy grâce à une bobine de réception placée à proximité de l'échantillon (ou du sujet). L'impulsion RF est un champ électromagnétique oscillant et il doit être à la fréquence de Larmor afin d'obtenir la résonance du noyau étudié.

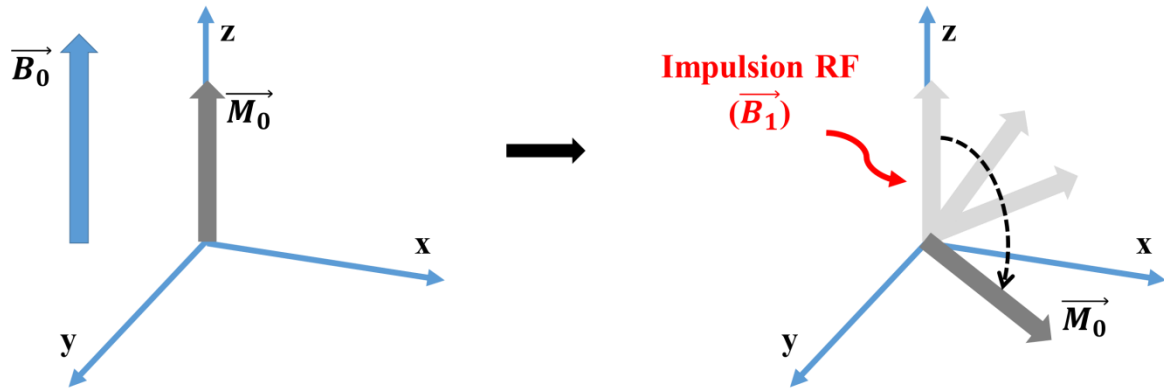


Figure 1.3 : Phénomène de résonance induit par une impulsion de radiofréquence ($\vec{B}_1$)

(3) Relaxation : Le système revient à l'équilibre dès l'arrêt de l'impulsion excitatrice $\vec{B}_1$. L'aimantation longitudinale augmente exponentiellement dans l'axe z avec la constante de temps T1 (relaxation spin-réseau avec $T_2 < T_1$) (**Fig. 1.4A**) alors que l'aimantation transversale décroît exponentiellement dans le plan xy avec la constante de temps T2 (relaxation spin-spin) (**Fig. 1.4B**). La constante de temps T2* correspond au signal de l'aimantation transversale auquel s'ajoute les inhomogénéités du champ magnétique externe $\vec{B}_0$ qui accélèrent le déphasage des spins.

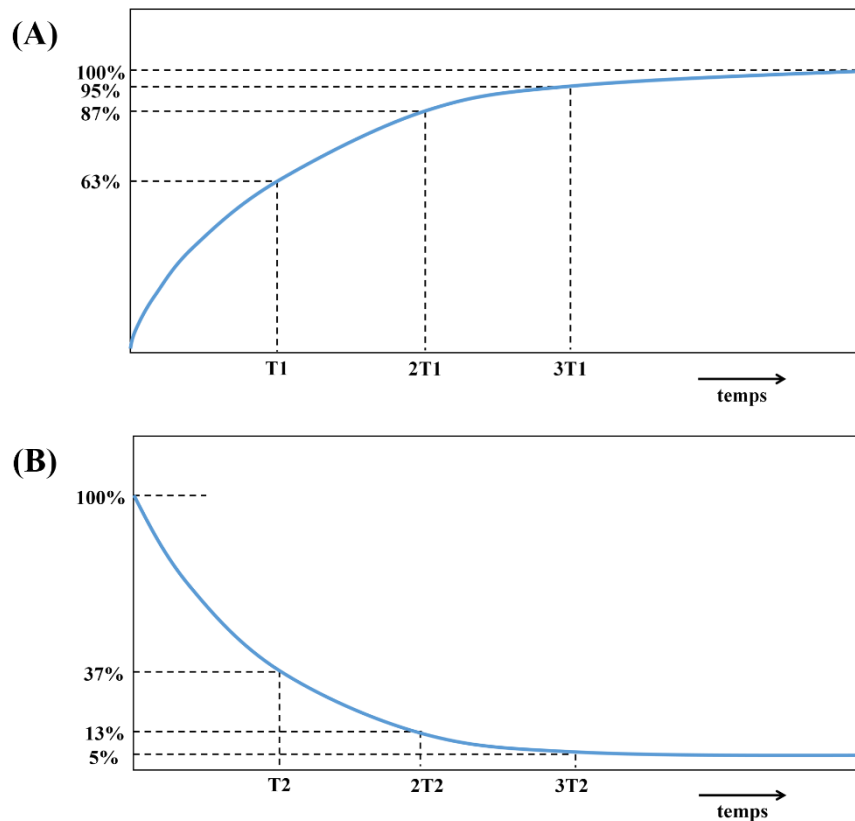


Figure 1.4 : (A) Courbe exponentielle croissante de la récupération de l'aimantation longitudinale en fonction de T1 ; (B) Courbe exponentielle décroissante de la disparition de l'aimantation transversale en fonction de T2.

Les retours à l'équilibre dans le plan xy (M_{xy}) et le long de l'axe z (M_z) sont respectivement définis par les équations 1.2 et 1.3.

$$M_{xy} = M_0 e^{-t/T_2} \quad [1.2]$$

$$M_z = M_0 (1 - e^{-t/T_1}) \quad [1.3]$$

Les noyaux restituent l'énergie dans la bobine réceptrice sous la forme d'un courant électrique dans l'échelle de temps. Après une conversion analogique/numérique, le signal obtenu est une sinusoïde amortie dans le domaine temporel appelé le signal de précession libre (Free Induction Decay ; FID) (Fig. 1.5).

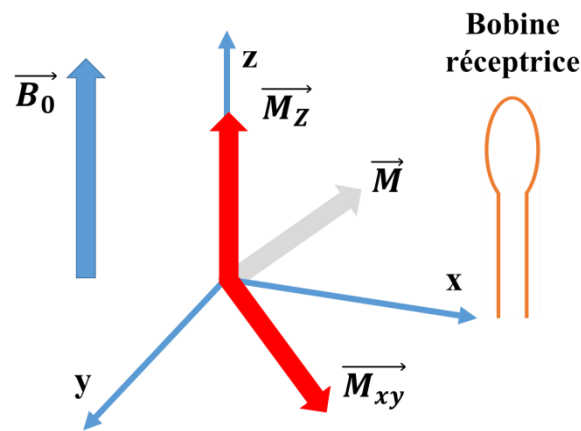


Figure 1.5 : Retour à l'équilibre de l'aimantation dans l'axe z et le plan xy

Après traitement de la FID par une opération mathématique qui est la transformée de Fourier (TF), un spectre de fréquences contenues dans le signal est obtenu dans l'espace fréquentiel (Fig.1.6).

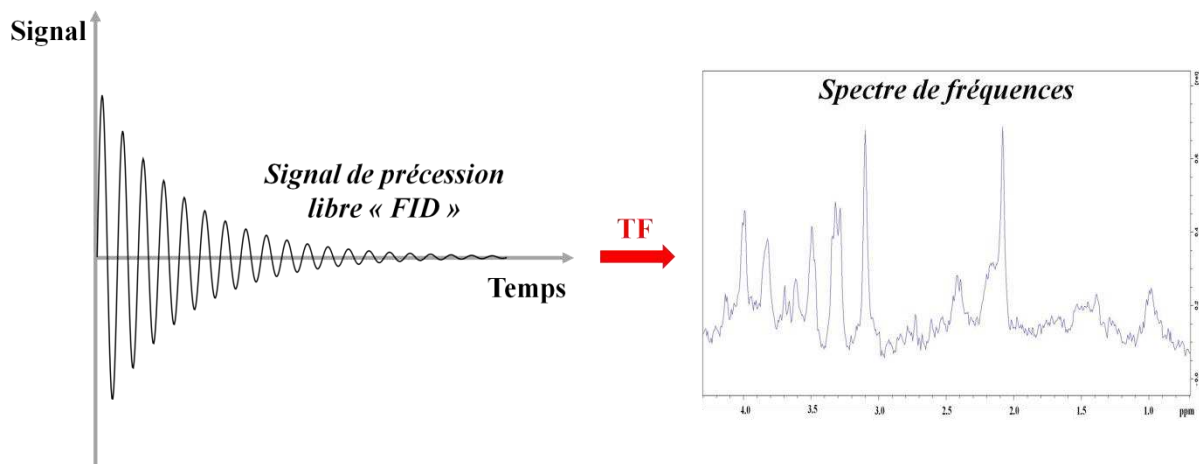


Fig. 1.6 : Obtention du spectre de fréquences par transformée de fourrier (TF) du signal de précession libre

1.1.2. Le codage spatial du signal et reconstruction de l'image

L'IRM peut générer une image en montrant la distribution spatiale de la densité des spins du noyau étudié, classiquement les protons de l'eau. La localisation du signal RMN dans les trois dimensions est réalisée en utilisant trois gradients linéaires de champs magnétiques : gradient de sélection de coupe (G_{ss}), gradient de codage de phase (G_{ϕ}) et gradient codage de fréquence (G_{ω}) (**Fig. 1.7**).

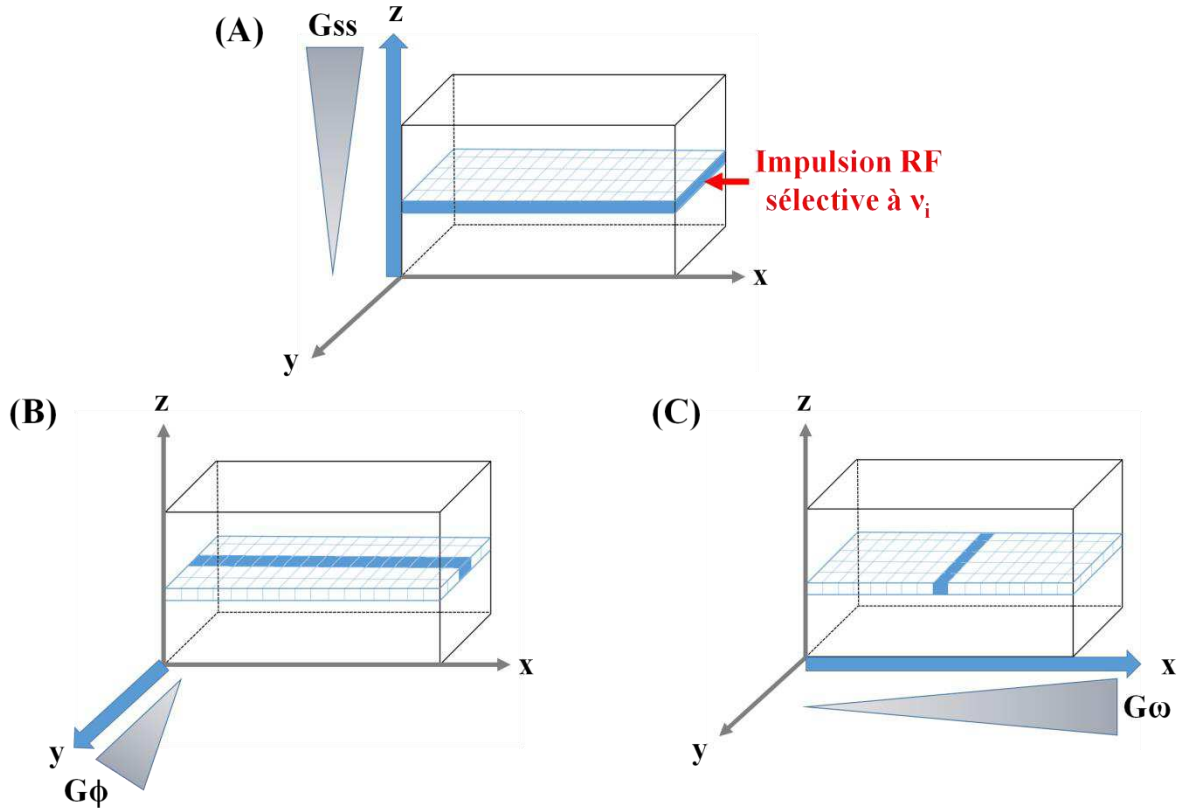


Figure 1.7 : Les gradients du codage spatial en IRM
(A) sélection de coupe ; (B) codage de phase ; (C) codage de fréquence
 (adapté de Kastler and Anstett 2011)

Ces gradients sont superposés au champ magnétique statique $\vec{B}_0$ et ils sont appliqués sur de très courtes durées par des bobines de gradients (Kastler and Anstett 2011; Helm, Merbach, and Tóth 2013; Currie et al. 2013). Le champ magnétique obtenu lorsqu'ils sont activés dans l'espace x, y, z peut être décrit par l'équation 1.4.

$$\vec{B}_{(x,y,z)} = \vec{B}_0 + \Delta\vec{B}_{(x,y,z)} = \vec{B}_0 + (G_x \cdot x)\vec{x} + (G_y \cdot y)\vec{y} + (G_z \cdot z)\vec{z} \quad [1.4]$$

Avec les vecteurs unitaires selon les trois axes ($\vec{x}, \vec{y}, \vec{z}$) et les trois valeurs de gradients correspondantes (G_x, G_y, G_z).

(1) **Le gradient de sélection de coupe G_{ss} (ou G_z)** permet de sélectionner un plan de coupe à l'intérieur d'un volume et il est appliqué dans la direction perpendiculaire au plan d'intérêt choisi. Une impulsion RF sélective est utilisée pour sélectionner la fréquence de Larmor ν_i des protons du plan d'intérêt.

(2) **Le gradient de codage de phase G_ϕ (ou G_y)** sélectionne les différentes lignes à l'intérieur du plan de coupe. L'application de G_ϕ va modifier les fréquences de précession des spins et induire ainsi un décalage des phases entre les lignes. A l'arrêt de G_ϕ , les protons situés sur la même ligne (perpendiculaire à G_ϕ) auront la même phase.

(3) **Le gradient de codage de fréquence G_ω (ou G_x)** permet de sélectionner les différentes colonnes à l'intérieur du plan de coupe. Il est appliqué perpendiculairement au gradient de codage de phase et simultanément au recueil du signal. L'application de G_ω va modifier les fréquences de précession et conduire à des colonnes de protons avec des vitesses de précession identiques. Il faut souligner que l'impulsion RF excite simultanément tous les protons de la coupe mais seulement un signal en écho est enregistré pour une ligne (étape de l'encodage de phase). Par conséquent, la séquence (comprenant sélection de coupe, gradient de phase et gradient de fréquence) doit être répétée plusieurs fois afin d'attribuer un signal à chaque ligne de l'image.

A chaque répétition, la même sélection de coupe et de codage de fréquence sont réalisés mais une incrémentation du gradient codage de phase est effectuée. Dans la **figure 1.8**, un exemple d'une image 3x3 pixels (3 lignes : L1, L2, L3 ; 3 colonnes : C1, C2, C3) est présenté. Les protons situés sur la même ligne ont la même phase et les protons situés dans la même colonne auront la même fréquence. Au niveau du 1^{er} pixel (L1, C1), le codage du proton est ($G_\phi 1$; $G_\omega 1$).

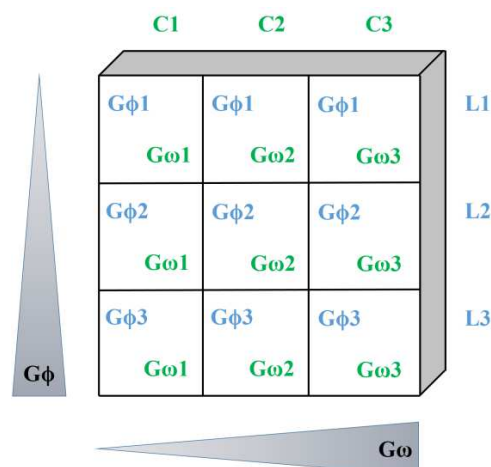


Figure 1.8 : Application des gradients de codages de phase G_ϕ et de fréquence G_ω

Chaque répétition de la séquence génère un signal en écho qui est digitalisé et stocké dans une matrice de données brutes appelée « espace k ». Les points dans l'espace k (k_x , k_y) sont organisés en lignes et en colonnes. Les données de l'espace k représentent les fréquences spatiales contenues dans une image de résonance magnétique et elles sont converties en une image en utilisant une double transformée de Fourier inverse ($2DFT^{-1}$) (**Fig. 1.9**).

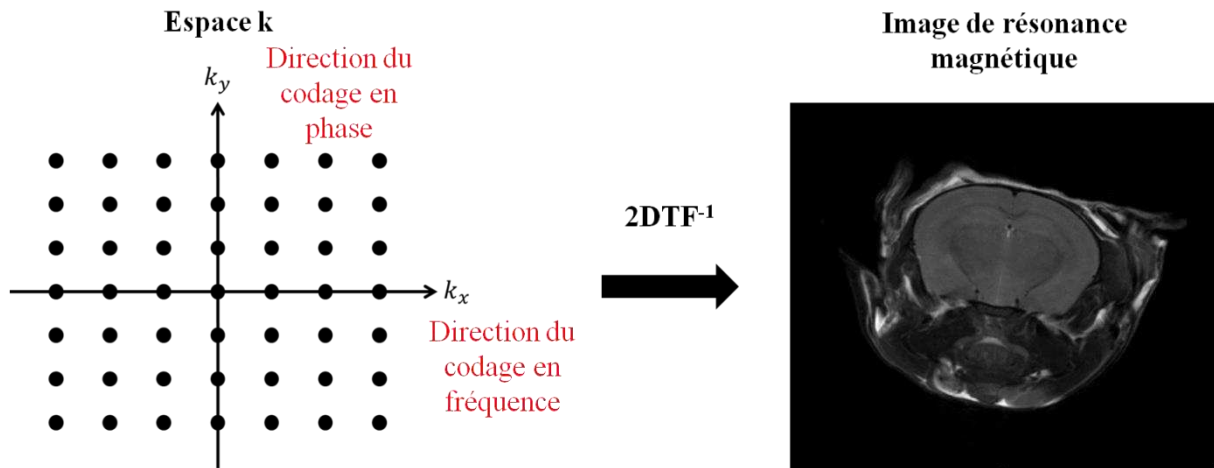


Figure 1.9 : Obtention de l'image à partir de l'espace k

1.2. Imagerie morphologique

Cette partie a pour but de décrire les séquences IRM et les paramètres utilisés dans l'optimisation des images lors des expériences précliniques de ces travaux de thèse.

1.2.1. Les séquences utilisés en IRM

Une séquence en IRM est composée : (i) d'impulsions RF permettant l'excitation des spins basée sur le phénomène RMN, (ii) de gradients du codage spatial de l'image et (iii) de temps appliqués lors de l'acquisition du signal des protons (ou écho) pour l'obtention d'un contraste donné (T1, T2, etc.). Une séquence en IRM est graphiquement représentée par un chronogramme, lequel décrit l'organisation temporelle des impulsions RF et des gradients ainsi que leurs polarités.

Deux paramètres de temps sont essentiels dans le paramétrage des séquences IRM : le temps d'écho (TE) et le temps de répétition (TR). Le TE est la durée qui sépare l'impulsion d'excitation RF et le recueil du signal des protons (ou écho). Le TR est l'intervalle de temps séparant les impulsions d'excitation de 90° de deux séquences consécutives.

Il existe deux grandes catégories de séquences : écho de spin (spin echo ; SE) et écho de gradient (gradient echo ; GE). Ces dernières se différencient principalement par l'angle de bascule de l'impulsion RF appliquée pour la résonance des spins (Kastler and Anstett 2011; Helm, Merbach, and Tóth 2013; Currie et al. 2013).

1.2.1.1. La séquence écho de spin

La séquence SE est composée d'une impulsion RF d'excitation de 90° à $t=0$ suivie par une impulsion RF de refocalisation de 180° à $t=TE/2$ (**Fig. 1.10**). L'impulsion de 90° va induire le basculement de $\vec{M}$ dans le plan transversal et l'aimantation transversale M_{xy} devient maximale. Cela conduit à un déphasage rapide des spins selon une courbe en $T2^*$ (relaxation $T2$ avec les inhomogénéités du champ magnétique $\vec{B}_0$). L'impulsion RF de 180° va refocaliser les spins et permettre de compenser les inhomogénéités du champ magnétique $\vec{B}_0$. A $t=TE$, les spins sont rephasés et le signal apparait sous la forme d'un signal en écho. Le TR est le temps nécessaire à la réapparition de l'aimantation longitudinale M_z .

Du fait que les deux impulsions RF doivent être sélectives sur la même coupe, les impulsions RF de 90° et 180° coïncident avec les gradients de sélection de coupe G_{ss} . Le gradient de fréquence (ou de lecture) G_ω sert pour le codage en fréquence des colonnes de la matrice (image), il se compose d'un lobe de déphasage et un lobe de rephasage de l'aimantation transverse des spins (induits par ce même gradient et par les inhomogénéités du champ $\vec{B}_0$). L'écho est enregistré simultanément au second lobe du gradient de fréquence G_ω à $t=TE$. Ce cycle est répété au bout du TR pour enregistrer le signal de chaque ligne de l'espace k grâce à l'incrémentation du gradient de l'encodage de phase G_ϕ . Afin d'obtenir un rapport signal sur bruit satisfaisant, le cycle de la séquence peut être répété pour chaque ligne.

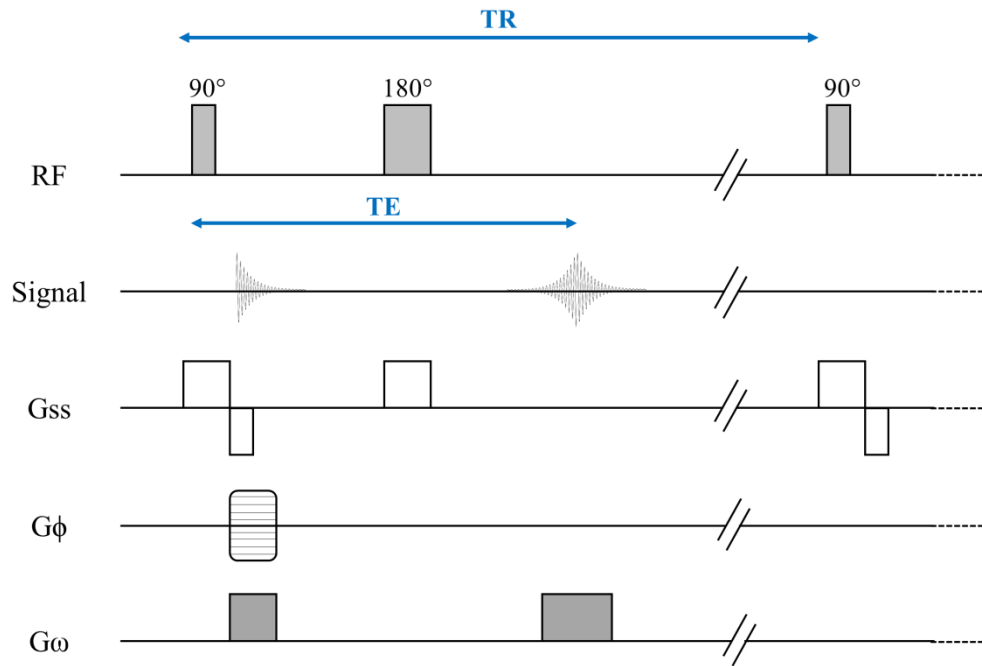


Figure 1.10 : Chronogramme de la séquence écho de spin (SE)
(adapté de Kastler and Anstett 2011)

La séquence SE a pour avantage d'être résistante aux artéfacts créés par les inhomogénéités du champ magnétique $\vec{B}_0$. Elle est également résistante aux variations de susceptibilité magnétique liées à l'hétérogénéité des tissus ou à la présence d'entités magnétiques. La séquence SE permet également de réduire des artéfacts de déplacements chimiques liés à la présence d'eau et des lipides dans le même voxel.

La séquence SE peut être utilisée sous la forme d'une séquence à un ou plusieurs échos. La séquence RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) est une séquence SE multi-échos où un train d'impulsions de 180° va permettre l'obtention de plusieurs échos successifs jusqu'à la disparition totale du signal en T2. Ces échos permettront l'obtention de plusieurs lignes de l'espace k pour un même TR. L'application d'une séquence SE multi-échos a pour objectif de réduire le temps d'acquisition.

Par exemple, lorsqu'un facteur RARE 4 est appliqué, il est obtenu 4 échos et donc 4 lignes de l'espace k sont complétées par TR. Le temps d'acquisition est divisé par 4 comparé à une séquence SE classique (**Fig. 1.11**). La séquence RARE a été utilisée dans la 3^{ème} partie Chap.7 (p.160) de cette thèse.

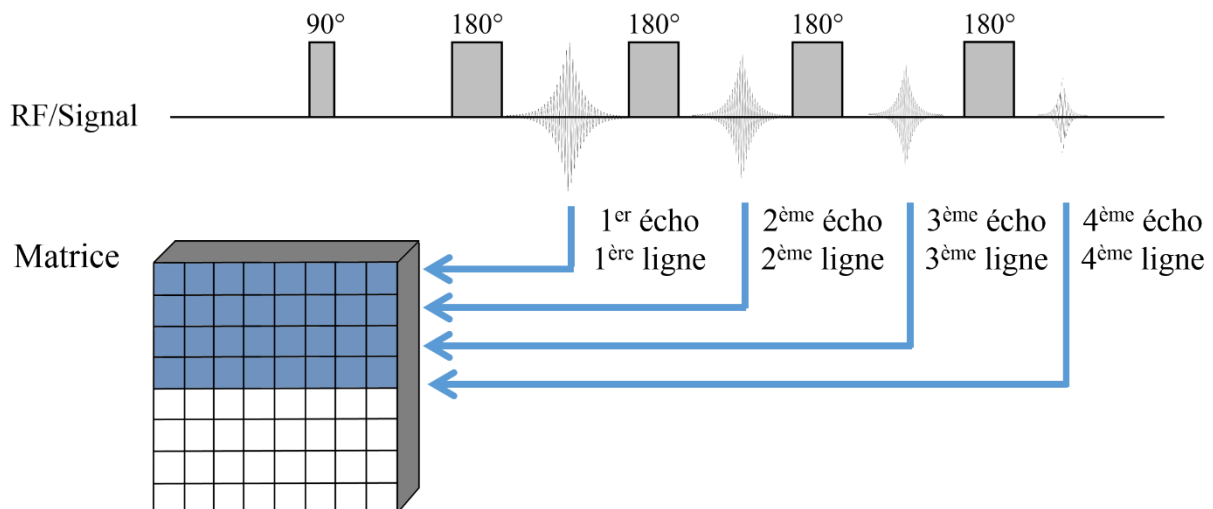


Figure 1.11 Séquence écho de spin multi-échos (RARE)
(adapté de Kastler and Anstett 2011)

1.2.1.2. La séquence écho de gradient

La séquence GE diffère de la séquence SE par l'angle de bascule de l'impulsion excitatrice RF qui est généralement inférieur à 90° et par l'absence d'une impulsion de refocalisation de 180° (**Fig. 1.12**). A la place, la séquence GE a un gradient de codage de fréquences bipolaire capable de refocaliser le signal et ainsi de générer un signal en écho capable de remplir l'espace k. L'angle de bascule de l'impulsion RF étant réduit, cela va permettre un retour à l'équilibre rapide de l'aimantation des spins. Ainsi, le TE et le TR seront considérablement réduits et par conséquent le temps d'acquisition sera plus court.

L'impulsion RF d'un angle Θ° ($<90^\circ$) doit coïncider avec le gradient de sélection de coupe bipolaire G_{ss} . Le gradient de codage de phase G_ϕ permet le codage des lignes de l'espace k. Le gradient de fréquence G_ω bipolaire comportant un lobe de déphasage et de rephasage va permettre le codage des colonnes de l'espace k. Le gradient G_ω va permettre l'obtention d'un écho de gradient qui permet la réapparition du signal (rephasage des déphasages induits par G_ω) à $t=TE$. Ce cycle est répété au bout du TR pour enregistrer le signal de chaque ligne de l'espace k et pour obtenir un rapport signal sur bruit satisfaisant.

La séquence GE est sensible aux effets de susceptibilité magnétique (e.g. interface air et tissus). Le lobe négatif du gradient G_ω refocalise seulement les spins qui ont été déphasés par l'action du gradient lui-même, contrairement à la séquence SE où les décalages de phase résultant des inhomogénéités du champ magnétique local sont minimisés via l'impulsion RF de 180°. De ce fait, la séquence GE est influencée par les effets dit T2* et ne présente pas une vraie relaxation T2.

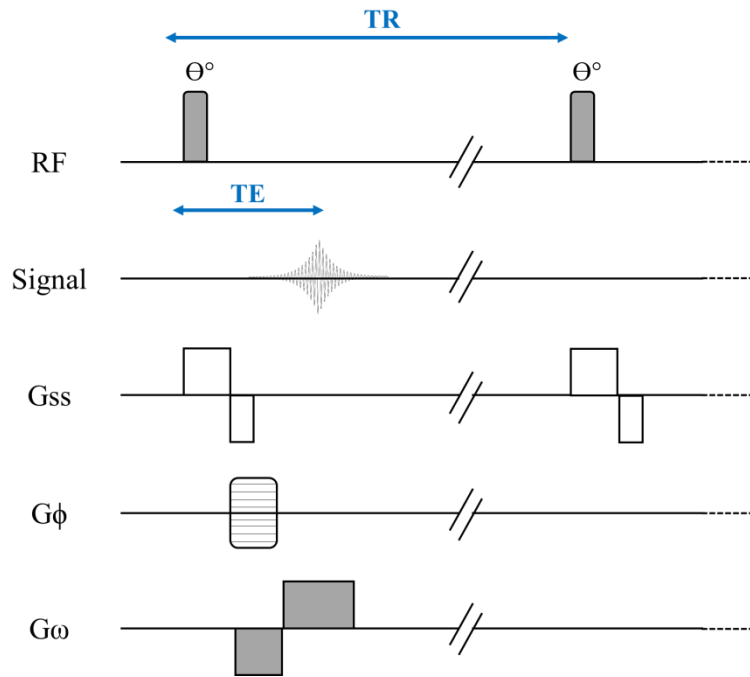


Figure 1.12 : Chronogramme de la séquence écho de gradient
(adapté de Kastler and Anstett 2011)

L'utilisation d'un écho de gradient avec un angle de basculement réduit permet de diminuer le TR bien en dessous du T1 sans perte notable du signal. Cet effet s'explique aisément par la théorie de l'angle optimum d'Ernst (Θ_{opt}) donné par l'équation 1.5.

$$\cos \theta_{opt} = \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right) \quad [1.5]$$

Cette théorie stipule qu'un angle de bascule optimal existe pour une combinaison de TR et T1, et donne ainsi un signal maximal. L'optimisation de l'angle de bascule de l'impulsion RF conduit à un état d'équilibre dans lequel une majorité de l'aimantation est présente le long de l'axe longitudinal car l'aimantation ne bascule pas complètement.

Comme le TR est réduit à une valeur inférieure au T2* dans la séquence GE, une composante transversale de l'aimantation persiste lors de l'impulsion RF suivante. Dans la séquence GE rapide appelé FLASH (Fast Low Angle Shot), l'aimantation transversale résiduelle va être détruite par un gradient déphaseur appelé « spoiled gradient ». Le spoiler va déphaser toute aimantation transversale persistante et il va être appliqué à la fin de cycle de chaque ligne après la lecture du signal.

Dans ces travaux de thèse, la séquence FLASH a été utilisée pour réaliser l'imagerie cérébrale chez le rat (Cf. 2^{ème} partie, Chap.4, p.78) et l'imagerie abdominale chez la souris (Cf. 3^{ème} partie, Chap.6, p.137).

1.2.2. Les pondérations : T1, T2 ou T2* et densité de proton

Les paramètres des séquences IRM (TE, TR et angle de l'impulsion) peuvent être optimisés afin d'obtenir des contrastes différents sur l'image. Cette optimisation des séquences permet d'obtenir une « pondération » de l'image. Il existe trois catégories de pondération : T1, T2 ou T2* et pondération de proton ρ (Kastler and Anstett 2011; Currie et al. 2013; Cleary and Guimaraes 2014).

(1) Pondération T1 : Elle est liée à l'aimantation longitudinale sur l'axe z à un TR donné. L'intensité du signal d'un tissu avec un T1 court sera plus importante que celle dans un tissu avec un T1 long.

(2) Pondération T2 et T2* : La pondération T2 est dépendante de l'aimantation transversale dans le plan xy à un TE donné. L'intensité d'un tissu avec un T2 long sera plus importante que celle d'un tissu avec T2 court. La pondération T2* tient compte de T2 et des inhomogénéités inhérentes au champ constant $\vec{B}_0$.

(3) Pondération de proton ρ : Si un tissu contient plus de protons que l'autre (densité protonique différente entre les tissus), cela entraînera des différences dans les vecteurs M_z à l'équilibre.

Dans les images pondérées en T1, le tissu adipeux apparaît en hypersignal (brillant) et les fluides (liquide céphalo-rachidien, sang, etc.) apparaissent en hyposignal (gris foncé, noir). A l'inverse dans les images T2, le tissu adipeux présente un signal intermédiaire et les fluides sont en hypersignal. Les images pondérées en T1 sont utilisées pour l'anatomie des tissus mous et du tissu adipeux. Cela permet par exemple de détecter les masses de graisse dans un tissu. Les images pondérées en T2 sont classiquement utilisées pour les fluides et les tissus anormaux (tumeur, œdème, inflammation, trauma). En pratique clinique, les deux pondérations apportent des informations complémentaires et elles sont donc importantes pour caractériser des anomalies physiopathologiques.

Afin d'obtenir les pondérations souhaitées, les paramètres (TE, TR et angle de bascule) devront être adaptés selon le type de séquence : écho de spin ou écho de gradient (**Tableaux 1.1 et 1.2**).

Tableau 1.1 : Optimisation des pondérations de la séquence écho de spin
(d'après Kastler and Anstett 2011)

Pondération	Optimisation des paramètres	Interprétation
T1	TR court (400-600 ms) TE court (15 ms)	Le TR court favorise la pondération T1 car l'aimantation longitudinale ne se rétablit pas complètement à son niveau initial à la fin de chaque cycle. Un tissu à T1 court donnera le signal le plus élevé. Le TE court défavorise la pondération en T2.
Densité de proton ρ	TR long (2000 ms) TE court (15 ms)	Un TR long associé avec un TE court permet de récupérer l'ensemble de l'aimantation longitudinale jusqu'à sa valeur initiale.
T2	TR long (2000 ms) TE long (120 ms)	Le TE long permet de favoriser la pondération en T2 afin d'observer la décroissance complète de l'aimantation transversale. Un tissu à T2 long donne le signal le plus élevé. Le TR long défavorise la pondération en T1.

Tableau 1.2 : Optimisation des pondérations de la séquence écho de gradient FLASH
(d'après Kastler and Anstett 2011)

Pondération	Optimisation des paramètres	Interprétation
T1	TR court (<50 ms) TE court (10-15 ms) Angle θ intermédiaire (45-90°)	Pour un angle entre 45-90°, les différences de relaxation des tissus en T1 sont observables.
Densité de proton ρ	TR long (200-400 ms) TE court (10-15 ms) Angle θ petit (5-20°)	Pour un petit angle θ , l'aimantation longitudinale reste proche de l'état d'équilibre $\vec{M}_0$, la récupération du signal est quasi complète et donc minimise la pondération T1. Le TE court réduit les effets T2*.
T2*	TR long (200-400 ms) TE long (30-60 ms) Angle θ petit (5-20°)	Un petit angle θ minimise la pondération T1. Le TE long maximise l'effet T2* mais avec une réduction rapide du rapport signal sur bruit et l'apparition d'artéfacts (de mouvement ou liés à l'inhomogénéité du champ magnétique).

1.2.3. Les informations quantitatives obtenues des images IRM

A partir des images IRM, une région d'intérêt (region of interest ; ROI) peut être dessinée afin d'obtenir des informations sur le signal d'un tissu donné. Dans le cadre de ces travaux de thèse, deux types d'informations ont été recueillies sur le signal : l'intensité moyenne du signal et les paramètres quantitatifs de la texture.

(1) L'intensité moyenne du signal : L'intensité de niveau de gris est mesurée à l'aide du logiciel Paravision 5.1 (Bruker, Ettlingen, Allemagne) au sein d'une ROI et cela permet d'obtenir des informations sur la relaxation des protons (T1, T2 ou ρ) dans le tissu (*Cf. 2^{ème} partie, Chap.4, p.78*).

(2) L'analyse de texture : C'est une méthode d'analyse plus fine que la mesure de l'intensité moyenne du signal car elle permet d'obtenir des informations sur l'organisation des niveaux de gris des pixels. L'analyse de texture est un ensemble de calculs matriciels qui permettent de quantifier l'intensité et l'agencement des pixels en fonction de leurs niveaux de gris. Ces méthodes se révèlent plus sensibles que l'œil humain car celui-ci ne peut pas distinguer deux textures identiques par leurs statistiques de second ordre (Martin and Pomerantz 1978).

Dans ces travaux de thèse (*Cf. 3^{ème} partie, Chap.6, p.137*), l'analyse de texture a été effectuée au niveau du foie à l'aide du logiciel Mazda 4.6 (Szczyński et al. 2009), lequel permet de calculer de très nombreux paramètres de texture.

Deux catégories de méthodes d'analyse de texture seront utilisées dans la thèse : (i) de premier ordre par la méthode de l'histogramme des intensités et (ii) de second ordre par la matrice de cooccurrence (Materka 2004). Ces différentes méthodes ont été largement discutées dans une précédente thèse (Herlidou 1999).

La méthode de l'histogramme du premier ordre est appliquée au sein de chaque pixel d'une ROI afin de déterminer la fréquence d'apparition de chaque niveau sur l'échelle des gris.

La méthode de matrice de cooccurrence (ou méthode de dépendance spatiale des niveaux de gris) permet de caractériser la fréquence d'apparition d'un motif formé de deux pixels séparés par une certaine distance d dans une direction particulière θ par rapport à l'horizontale. La taille de la matrice est $N_g \times N_g$ avec N_g correspond au maximum de niveaux de gris de l'image.

Dans l'exemple de la **figure 1.12**, l'image initiale possède 4 niveaux de gris et la matrice de cooccurrence sera de 16. Pour une texture grossière, les valeurs de la matrice sont concentrées sur la diagonale principale. Par contre, dans le cas d'une texture plus fine, les valeurs de la matrice sont dispersées.

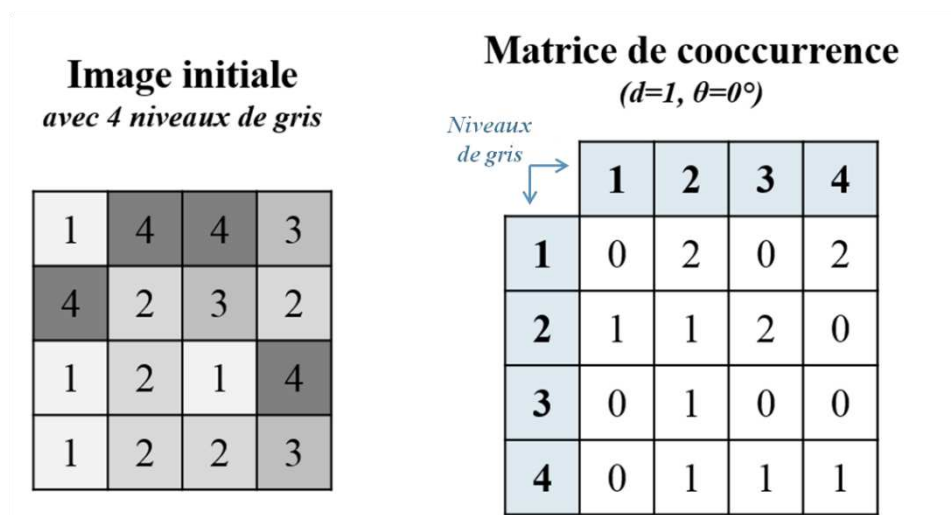


Figure 1.12 : Exemple de construction d'une matrice de cooccurrence
(d'après Herlidou 1999)

Une fois la matrice de cooccurrence réalisée, il est possible d'en extraire par un calcul matriciel les paramètres de texture. Ils sont résumés dans le **tableau 1.3** et les équations correspondantes sont en **Annexe 1** (p.218). Ces paramètres donnent une information sur la finesse, la directionnalité et la granularité de la texture.

Table 1.3 : Méthodes d'analyse de texture et les paramètres correspondants

Méthode d'analyse de texture	Paramètres de texture
Histogramme des niveaux de gris	Moyenne Variance Skewness Kurtosis Percentiles (1%, 10%, 50%, 90%, 99%)
Matrice de cooccurrence ($d = 1, \theta = 0^\circ$) <i>Avec d = distance entre les centres des pixels au sein du motif et θ = l'orientation de ce motif</i>	Energie Contraste Corrélation Variance Homogénéité Entropie

L'analyse de texture se divise en 4 étapes : (i) la sélection des ROI chez le sujet (ici, le foie de souris), (ii) analyse de texture des ROI par le logiciel Mazda, (iii) obtention des paramètres quantitatifs dont l'ensemble constitue le profil de texture.

Dans l'exemple de **figure 1.13**, les régions d'intérêts (ROI) sont sélectionnées au niveau du foie chez des souris contrôles et des souris traitées. Après l'obtention des profils de texture, une comparaison est réalisée par une analyse statistique multivariée. L'utilisation de statistique multivariée est indispensable compte tenu du nombre important de variables (les paramètres de texture) et d'observations (les foies de souris).

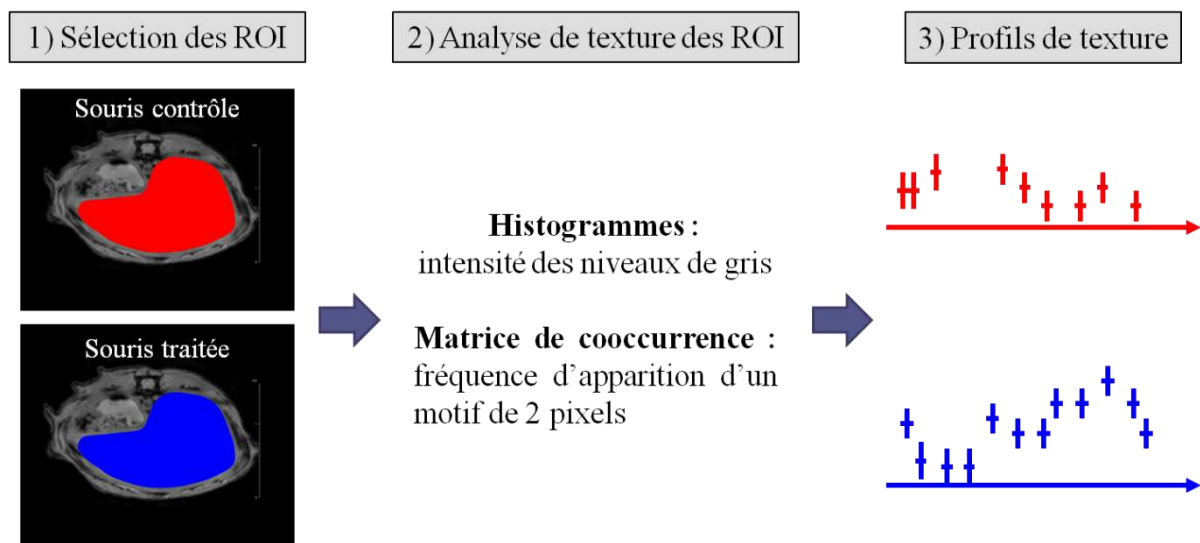


Figure 1.13 : Les étapes de l'analyse de texture
Les symboles † représentent les paramètres de texture.

1.3. Imagerie de diffusion

1.3.1. Imagerie pondérée en diffusion

L'imagerie pondérée en diffusion (Diffusion Weighed Imaging ; DWI) est une technique qui a pour but de mettre en évidence les mouvements microscopiques de l'eau dans les tissus en mesurant le mouvement brownien aléatoire des molécules d'eau. La mesure de ces mouvements permet de caractériser l'intégrité cellulaire et tissulaire dans divers processus physiologiques et pathologiques.

La diffusion est un phénomène de transport aléatoire qui décrit le transfert des molécules d'eau d'un emplacement à un autre. Dans un fluide homogène sans barrière physique, une molécule d'eau parcourt une distance r en un temps donné t (Alexander et al. 2007; Nicolay et al. 2001). Ces mouvements aléatoires de la molécule d'eau suivent une distribution gaussienne et ils peuvent être décrits dans un espace tridimensionnel par l'équation de diffusion d'Einstein-Smoluchowski (**Eq. 1.6**).

$$\sqrt{\langle r^2 \rangle} = \sqrt{6Dt} \quad [1.6]$$

Avec D , le coefficient de diffusion en mm^2/s ; $\langle r^2 \rangle$, la moyenne du déplacement au carré ; t , le temps de diffusion.

Le coefficient de diffusion varie en fonction de la viscosité et la température du fluide et il peut être défini par l'équation de Stokes-Einstein (**Eq. 1.7**).

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta\rho} \quad [1.7]$$

Avec k , constante de Boltzmann ; T , température absolue ; η , viscosité du milieu ; ρ , rayon atomique.

Le coefficient de diffusion de l'eau pure à 20°C est autour de $2.10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ et il est identique dans toutes les directions dans un milieu homogène (Alexander et al. 2007). Dans les tissus biologiques, la diffusion de l'eau est restreinte par les membranes cellulaires et les organites (structures sous-cellulaires). Cela conduit les molécules d'eau à prendre des voies plus complexes et induit ainsi une diminution de r .

De plus, la probabilité pour ces molécules de rencontrer un obstacle en fonction du temps est dépendante de la direction. En effet, si une courte durée est considérée, la diffusion des molécules d'eau est assimilée à une diffusion dans un milieu homogène. Si une durée plus longue est prise en compte, la probabilité de rencontrer un obstacle augmente significativement. En DWI, il est donc mesuré un coefficient de diffusion apparent (apparent coefficient diffusion ; ADC) et il est dépendant de l'intervalle de temps pendant lequel la diffusion est mesurée (Le Bihan 1995).

Dans un tissu où les mouvements des molécules d'eau sont faciles et donc l'agitation moléculaire est importante, la diffusion des molécules d'eau sera élevée. Ce type de diffusion est appelée **isotrope** et c'est le cas dans le liquide céphalo-rachidien. Au contraire, dans un tissu où l'agitation moléculaire est réduite par la présence de barrières moléculaires, la diffusion des molécules d'eau sera faible. C'est le cas d'une diffusion dite **anisotrope**, comme par exemple au sein de la substance blanche où les mouvements de l'eau vont être contraints par le milieu riche en fibres myélinisées et les molécules d'eau diffusent dans une direction privilégiée (**Fig. 1.13**).

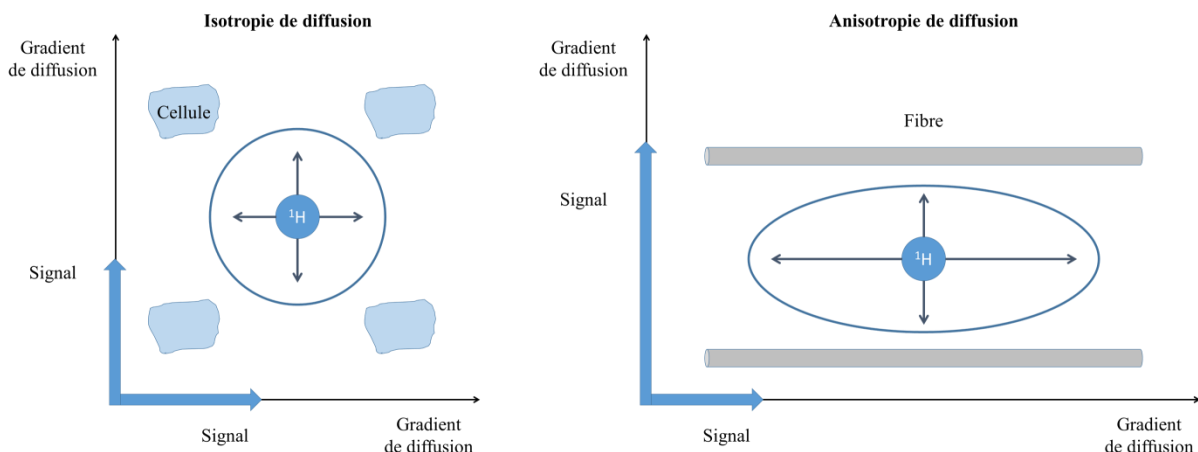


Figure 1.13 : Représentation schématique de l'isotropie et de l'anisotropie de diffusion
(adapté de Kastler and Anstett 2011)

En 1965, Stejskal and Tanner introduisent des gradients pulsés dans une séquence spin écho (Pulse Gradient Spin Echo : PGSE) permettant ainsi de sensibiliser le signal RMN à la diffusion (Stejskal and Tanner 1965). Cette séquence consiste au placement de deux gradients de diffusion autour de l'impulsion RF de refocalisation (180°). Le signal est pondéré par la diffusion des spins au temps TE. En effet, les mouvements des protons de l'eau vont entraîner des déphasages en présence de gradients de diffusion, ce qui va entraîner une diminution du signal. Ces déphasages sont d'autant plus importants que les mouvements des protons de l'eau sont rapides.

Actuellement, la séquence PSGE est utilisée avec un gradient de lecture EPI (echo-planar imaging ; EPI) (**Fig. 1.14**). L'EPI est une technique IRM rapide dans laquelle une oscillation rapide de gradients de très hautes amplitudes est utilisée pour générer de multiples échos de gradients pour chaque TR. Dans la technique EPI single-shot, toutes les étapes de l'encodage de phase (toutes les lignes de la matrice de l'image) sont acquises en un seul TR.

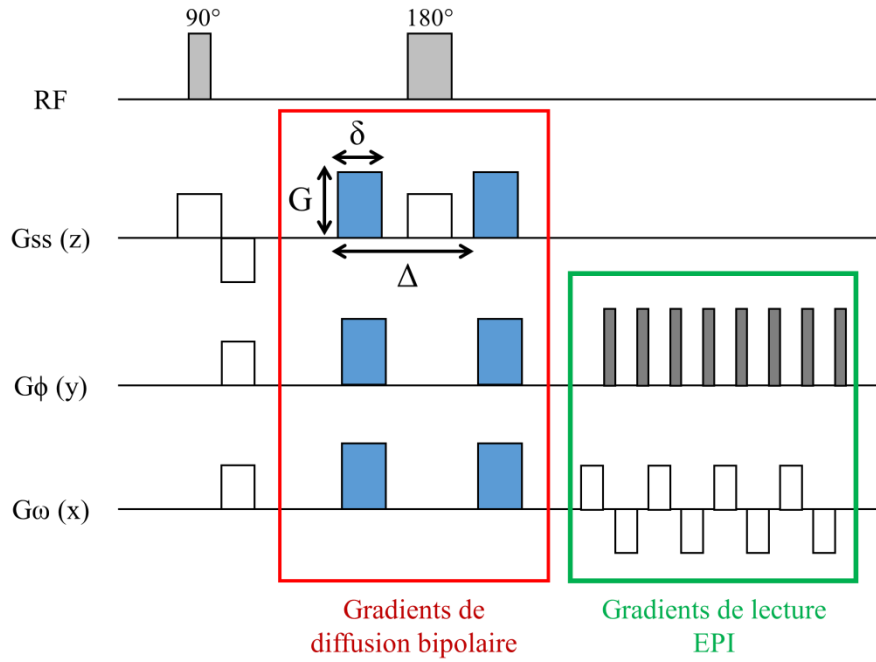


Figure 1.14 : Séquence écho de spin avec imagerie écho planaire (SE-EPI)
 (adapté de Kastler and Anstett 2011)

Une paire de gradients de diffusion est appliquée avec une intensité G pendant une durée δ et un délai Δ entre les deux gradients de diffusion. L'EPI va permettre de générer de multiples échos pour chaque TR.

La sensibilité de la séquence au phénomène de diffusion est dépendante de l'efficacité des gradients de diffusion et elle est caractérisée par un facteur b qui est défini par l'équation 1.8. La valeur de b peut être comprise entre 0 à 3000 s/mm² selon l'intensité et la durée du gradient, ou encore le délai entre l'application des deux gradients.

$$b = (\gamma G \delta)^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) \quad [1.8]$$

Avec b , intensité des gradients de diffusion ; γ , rapport gyromagnétique ; G , amplitude du gradient ; δ , durée d'application du gradient ; Δ , temps séparant l'application des deux gradients de diffusion.

La séquence de diffusion est appliquée successivement dans les trois axes (G_x ou G_y , G_z ou G_{ss}), ainsi 3 images pondérées en diffusion dans chaque axe sont générées pour une coupe. En pratique, une série de coupes pondérées en T2 est acquise avec $b=0$ puis avec un facteur b compris entre 500 et 3000 s/mm². L'intensité du signal par les gradients de diffusion est définie par l'équation 1.9.

$$S = S_0 e^{-bD} \quad [1.9]$$

Avec S , signal d'une acquisition avec $b>0$; S_0 , signal d'une acquisition avec $b=0$; b , l'intensité des gradients de diffusion ; D , coefficient de diffusion.

A partir des images de diffusion, l'ADC est calculé en mm²/s et il caractérise l'atténuation du signal liée au phénomène de diffusion des molécules d'eau dans les tissus dans une direction donnée (Eq. 1.10).

$$\text{Log} (S/S_0) = -b \cdot \text{ADC} \quad [1.10]$$

Afin de définir l'ADC moyen dans un espace tridimensionnel, il faut faire une moyenne des valeurs des ADC obtenues dans les trois directions de mesure (x, y, z) (Eq. 1.11).

$$\text{ADC}_{\text{moyen}} = \frac{\text{ADC}_x + \text{ADC}_y + \text{ADC}_z}{3} \quad [1.11]$$

Une cartographie ADC peut être générée par reconstruction en post-traitement, cela consiste à effectuer un moyennage de chaque pixel provenant des trois images de diffusion pour chacune des coupes. Sur une cartographie de l'ADC, les zones de diffusion réduite (protons immobiles) apparaissent en hyposignal alors que les zones contenant des molécules à diffusion élevée (protons mobiles) présentent un hypersignal.

1.3.2. Imagerie des tenseurs de diffusion

L'imagerie des tenseurs de diffusion (Diffusion Tensor Imaging ; DTI) est basée sur le principe de diffusion anisotrope précédemment décrit. De manière similaire à la DWI, la DTI apporte des informations sur la mobilité des molécules d'eau dans les tissus biologiques. La principale différence réside dans l'apport de données quantitatives sur la directionnalité des mouvements des molécules d'eau au sein du tissu.

La diffusion de l'eau peut être altérée par les changements dans la microstructure tissulaire. Par conséquent, l'imagerie des tenseurs de diffusion est un puissant outil pour caractériser les changements physiopathologiques au niveau microstructural.

Pour mettre en évidence ces mouvements en DTI, il faut faire appel à la notion mathématique du tenseur. Ce modèle est représenté par un ellipsoïde dans un espace tridimensionnel, chacun des axes principaux caractérise la diffusion dans ces trois directions principales (**Fig. 1.15**).

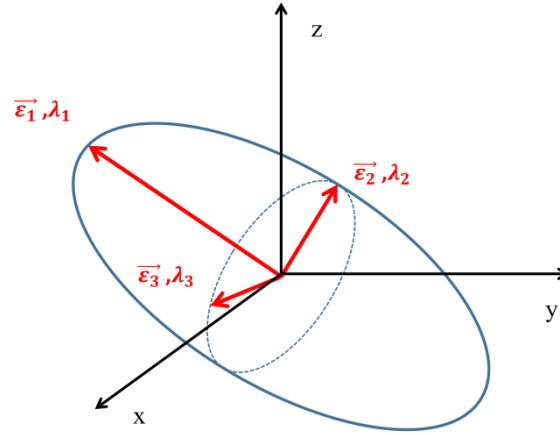


Figure 1.15 : Représentation schématique du tenseur par un ellipsoïde défini par ses vecteurs propres ($\vec{e}_1$; $\vec{e}_2$; $\vec{e}_3$) et ses valeurs propres (λ_1 ; λ_2 ; λ_3).
(adapté de Kastler and Anstett 2011)

Le tenseur de diffusion D est décrit par une matrice 3 x 3 dans l'espace de référence x, y, z avec 9 éléments non nuls (**Eq. 1.12**)

$$D = \begin{bmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{bmatrix} \quad [1.12]$$

Il faut diagonaliser cette matrice pour chaque voxel composant l'image finale. La matrice étant symétrique, il faut donc appliquer 6 gradients de diffusion dans 6 directions non colinéaires pour résoudre cette matrice. Cela permettra de caractériser l'ellipsoïde décrit par 3 vecteurs orthogonaux ($\vec{e}_1$; $\vec{e}_2$; $\vec{e}_3$) avec 3 valeurs propres correspondantes (λ_1 ; λ_2 ; λ_3). Ainsi, les vecteurs propres donnent les principales directions des molécules d'eau en fonction de l'anisotropie pour chaque voxel. Les valeurs propres du tenseur représentent l'amplitude de la diffusion en fonction de ses directions principales, et donc la forme de l'ellipsoïde.

A partir des images de DTI obtenues dans les 6 directions et une image sans pondération de diffusion, les deux mesures effectuées sont la diffusivité moyenne (mean diffusivity ; MD) et la fraction d'anisotropie (FA) du tenseur de diffusion lesquelles sont invariantes en fonction de la rotation de l'espace de diffusion.

La MD est la moyenne des valeurs propres exprimée en mm²/s (Eq. 1.14). Elle correspond à la vitesse des mouvements des molécules d'eau. Elle est équivalente à la mesure de l'ADC moyen le long des directions principales de diffusion (**Eq. 1.13**).

$$MD = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3} \quad [1.13]$$

La FA a été décrite initialement par Basser et Pierpaoli (1996). La FA quantifie le degré de directionnalité de la diffusion avec des valeurs comprises entre 0 (milieu isotrope) à 1 (milieu anisotrope) (**Eq. 1.14**).

$$FA = \sqrt{\frac{(\lambda_1 - MD)^2 + (\lambda_2 - MD)^2 + (\lambda_3 - MD)^2}{2(\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2)}} \quad [1.14]$$

L'amplitude des valeurs propres peut être affectée par des changements dans la microstructure tissulaire locale, des changements physiologiques (e.g. le vieillissement) ou des pathologies (e.g. épilepsies partielles) (Sullivan and Pfefferbaum 2006; Guye et al. 2008). Une cartographie de la FA peut être réalisée en fonction des principales directions : bleu pour la direction haut-bas, vert pour la direction antéro-postérieure et rouge pour la direction droite-gauche (**Fig. 1.16**).

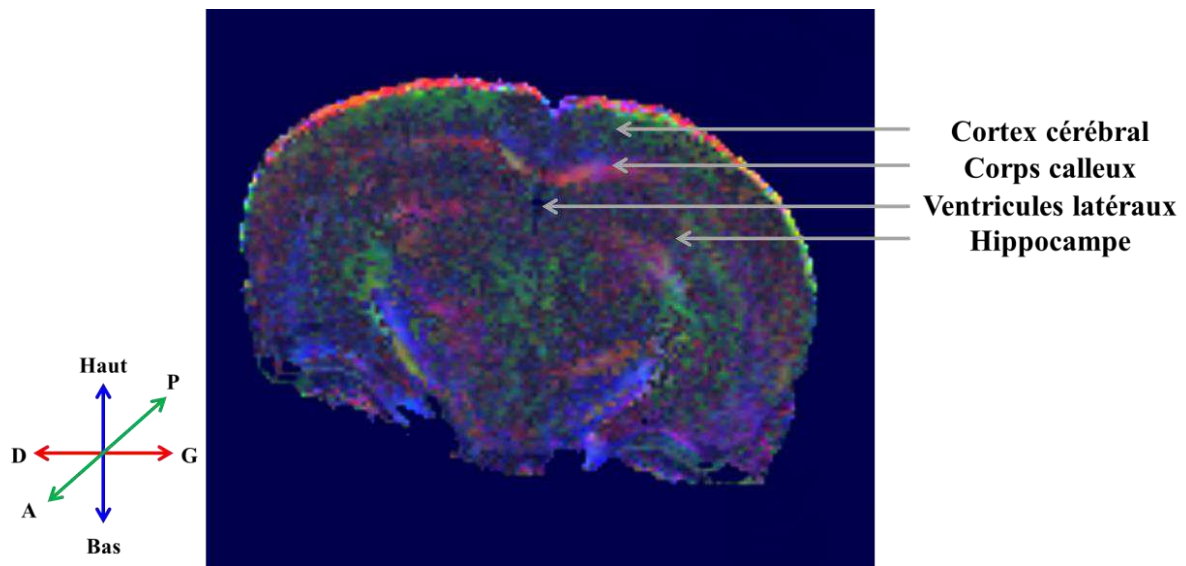


Figure 1.16 : Cartographie de la fraction d'anisotropie au niveau cérébral chez une souris.

Dans ces travaux de thèse, la séquence EPI-DTI a été utilisée pour mesurer la MD et la FA chez la souris (Cf. 3^{ème} partie, Chap.7, p.160).

Chapitre 2 : Principe de la SRM et quantification des métabolites

2.1. Spectroscopie par Résonance Magnétique du proton *in vivo*

2.1.1. Les principes de base de la ¹H SRM

La spectroscopie par résonance magnétique du proton (¹H SRM) est basée sur le phénomène de la relaxation des protons (Cf. 1.1.1, p.8). La SRM permet d'obtenir des informations sur les composés chimiques et leurs concentrations dans un tissu biologique. Pour rappel, le signal de relaxation obtenu en SRM est un signal de précession libre (FID) caractérisée par : une amplitude (A), une fréquence d'oscillations ($\Delta\omega$), une phase initiale (ϕ_0) et une fonction décrivant la décroissance du signal dépendante du temps de relaxation T2* (**Fig. 2.1**).

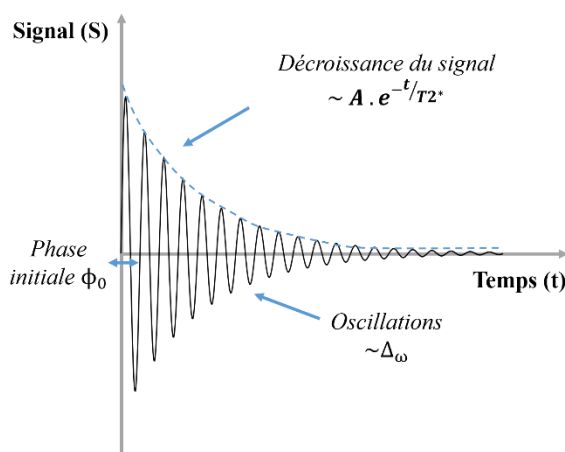


Figure 2.1 : Les paramètres du signal de précession libre (FID)
(adapté de Jiru 2008)

Après l'obtention du signal de relaxation FID sous la forme d'une sinusoïde amortie dans le domaine temporel, une transformée de Fourier est appliquée afin d'obtenir un spectre c'est-à-dire les signaux des protons dans le domaine fréquentiel. La relaxation sera différente pour chaque proton situé dans un environnement chimique différent, et permet donc d'acquérir un spectre dans lequel chaque raie de résonance va correspondre à l'emplacement déterminé d'un proton dans un groupement chimique.

En effet, le retour à l'équilibre se produit pour des fréquences légèrement différentes selon l'environnement chimique et électronique des protons. Ce phénomène est appelé le déplacement chimique. Les électrons qui se trouvent au voisinage du proton vont constituer un écran au champ magnétique imposé à ce proton. Ainsi, les protons sont soumis à une induction magnétique diminuée d'un facteur comportant la constante d'écran σ . Par exemple, un proton lié à un oxygène ne présente pas la même constante d'écran qu'un proton lié à un carbone.

Cet effet est décrit par l'équation de blindage (**Eq. 2.1**) et la fréquence de Larmor (Cf. Eq. 1.1, p.9) est modifiée en conséquence (**Eq. 2.2**) (de Graaf 2007).

$$B_{eff} = B_0 (1 - \sigma) \quad [2.1]$$

$$\nu = \left(\frac{\gamma}{2\pi} \right) B_0 (1 - \sigma) \quad [2.2]$$

Avec B_{eff} , le champ magnétique effectif ; B_0 , le champ magnétique constant ; σ , la constante d'écran.

Le déplacement chimique est directement lié à la constante d'écran et il est défini par l'équation 2.3 (de Graaf 2007).

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \quad [2.3]$$

Avec δ , le déplacement chimique en ppm ; ν , la fréquence du composé étudié ; ν_{ref} , le composé de référence. Classiquement en RMN, c'est le tétraméthysylane (TMS). En SRM in vivo, le N-acétyl aspartate (NAA) résonnant à 2.01 ppm sert de référence interne.

Au final, chaque proton de chaque molécule donne un signal différent et donc un pic de résonance différent sur le spectre. La grandeur en abscisse d'un spectre est le déplacement chimique en partie par million (ppm) et l'amplitude du signal des pics est en ordonnée. L'amplitude du signal est proportionnelle à la quantité du noyau contenu dans un groupement chimique donné de la molécule (**Fig. 2.2**).

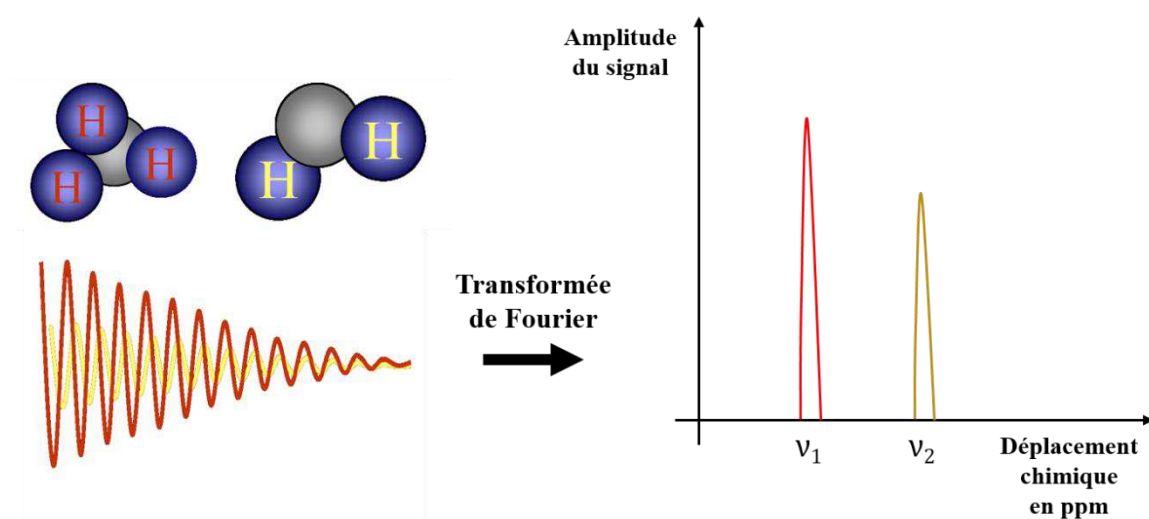


Figure 2.2 : Schéma de l'obtention du spectre ¹H après la transformée de Fourier du signal de précession libre (FID)

2.1.2. La ¹H SRM localisée monovoxel

La ¹H SRM localisée monovoxel est une technique non invasive permettant l'obtention d'informations biochimiques dans un volume d'intérêt au sein d'un tissu. La sélection spatiale du volume d'intérêt (voxel) et le recueillement du signal sont déterminés par l'intersection de trois plans orthogonaux. La sélection de ces plans est obtenue à l'aide de trois impulsions RF successives associées à un gradient de sélection dans chaque axe (x, y, z).

2.1.2.1. Les séquences en ¹H SRM localisée monovoxel

Les deux principales séquences utilisées en SRM sont la séquence STEAM (Stimulated Echo Acquisition Mode) et la séquence PRESS (Point Resolved Spectroscopy). La séquence STEAM est basée sur une succession de trois impulsions RF 90° afin d'obtenir un écho stimulé. La séquence PRESS quant à elle est basée sur des impulsions RF de 90°-180°-180° permettant l'enregistrement d'un signal en écho de spin. La séquence PRESS a été choisie dans le cadre de ces travaux de thèse car la séquence STEAM possède un ratio signal sur bruit plus faible et elle permet de récupérer seulement la moitié du signal comparé à un écho de spin (de Graaf 2007; Kastler and Anstett 2011).

La séquence PRESS se base sur le principe d'un écho de spin double avec une impulsion RF (90°) d'excitation suivie par deux impulsions RF de refocalisation (180°). Les trois impulsions RF de 90°-180°-180° sont associées à des gradients dans chaque axe (x, y, z) et permettent la sélection du voxel d'intérêt. Après la première impulsion de 180°, un 1^{er} écho est généré à TE1 correspondant à l'intersection de deux plans orthogonaux et dont le signal n'est pas enregistré. A la suite de la deuxième impulsion de refocalisation, un 2nd écho est créé à TE2 correspondant au signal du volume d'intérêt (**Fig. 2.3**).

La résolution spectrale c'est-à-dire la capacité à différencier les pics est dépendante de l'intensité du champ magnétique constant $\vec{B}_0$. En effet, le SNR augmente linéairement avec le champ $\vec{B}_0$. Néanmoins, il est important de souligner que l'augmentation du champ $\vec{B}_0$ va augmenter les effets de susceptibilité magnétique et influencer les temps de relaxation des métabolites. Le temps de relaxation longitudinal T1 s'allonge avec l'augmentation du champ $\vec{B}_0$ tandis que le temps de relaxation transversal T2 tend à diminuer.

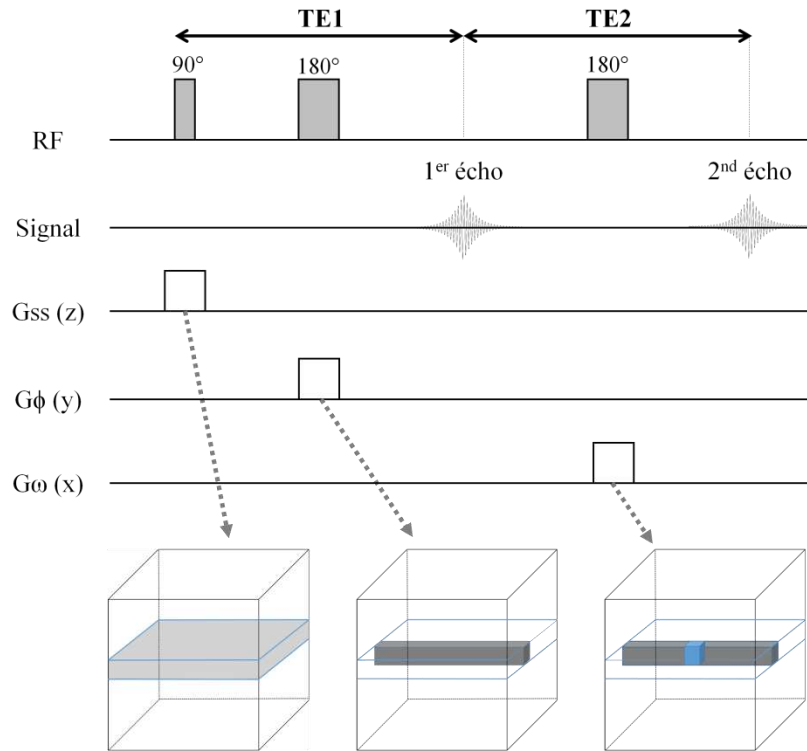


Figure 2.3 : Chronogramme de la séquence PRESS (Point Resolved Spectroscopy)
(adapté de Kastler and Anstett 2011)

2.1.2.2. L'homogénéisation du champ magnétique constant

Une étape essentielle dans les protocoles SRM est de corriger des inhomogénéités du champ magnétique constant $\vec{B}_0$ car elles interfèrent dans la qualité spectrale en altérant la largeur des pics et en accentuant leurs superpositions. Préalablement à la séquence PRESS, il est donc nécessaire de réaliser une homogénéisation expérimentale du champ magnétique (« B_0 shimming ») dans le voxel d'intérêt. Cela consiste à la création et à la superposition d'un champ magnétique secondaire afin de corriger le champ $\vec{B}_0$ effectif.

En pratique, ces corrections sont réalisées par la superposition de champs magnétiques linéaires créés par des bobines avec une variation spatiale définie par des fonctions mathématiques dites harmoniques sphériques de 2nd ordre (similaire aux gradients au codage spatiale de l'image) (Juchem and de Graaf 2017).

2.1.2.3. La suppression de l'eau

En comparaison avec la concentration des protons de l'eau, les composés chimiques au sein des organes sont de très faibles concentrations (de l'ordre de 10 mM). Un module de suppression du signal de l'eau est donc incorporé en amont dans la séquence PRESS. En effet, le signal de l'eau est de très grande amplitude et sa fréquence de résonance est proche de celles des composés d'intérêt. Par conséquent, lorsque le signal de l'eau n'est pas

correctement éliminé, cela conduit à une superposition aux pics d'intérêts et induit une distorsion de la ligne de base altérant la quantification spectrale.

Le motif de base utilisé pour saturer le signal de l'eau est appelé CHESS (Chemical Shift Selective). Il consiste en une impulsion RF sélective pour la fréquence de résonance de l'eau (4,7 ppm) qui bascule l'aimantation longitudinale des protons de l'eau dans le plan transversal, lequel est suivi d'un gradient déphasant l'aimantation transversale des molécules d'eau. Cette saturation du signal des protons de l'eau est effectuée sans altération du signal des protons des autres molécules. De plus, la saturation des protons de l'eau doit être réalisée dans un délai court avant la première impulsion RF de la séquence PRESS dans le but d'éviter le retour de l'aimantation longitudinale des protons de l'eau.

Dans le cadre de cette thèse, le module VAPOR (Variable Pulse power and Optimized Relaxation delays) a été utilisé afin d'obtenir une suppression de l'eau optimale. En effet, le module VAPOR contient sept à huit motifs CHESS dont les délais entre les impulsions RF sont optimisés de manière robuste afin que l'aimantation transverse induite par le signal des protons de l'eau soit quasi-nulle. Dans la **figure 2.4**, le diagramme du module VAPOR est présenté. Les délais de t_1 à t_7 entre les motifs CHESS sont respectivement optimisés aux valeurs suivantes : 150 ms, 80 ms, 160 ms, 80 ms, 100 ms, 30 ms et 26 ms. Pour une relaxation T_1 de l'eau fixée à 1,5 s, trois valeurs d'angle de bascules β (65° , 95° et 125°) ont été calculés et ils conduisent à éliminer l'aimantation longitudinale des protons de l'eau ($M_z(t) = 0$) à t_7 (Xin and Tkáč 2017).

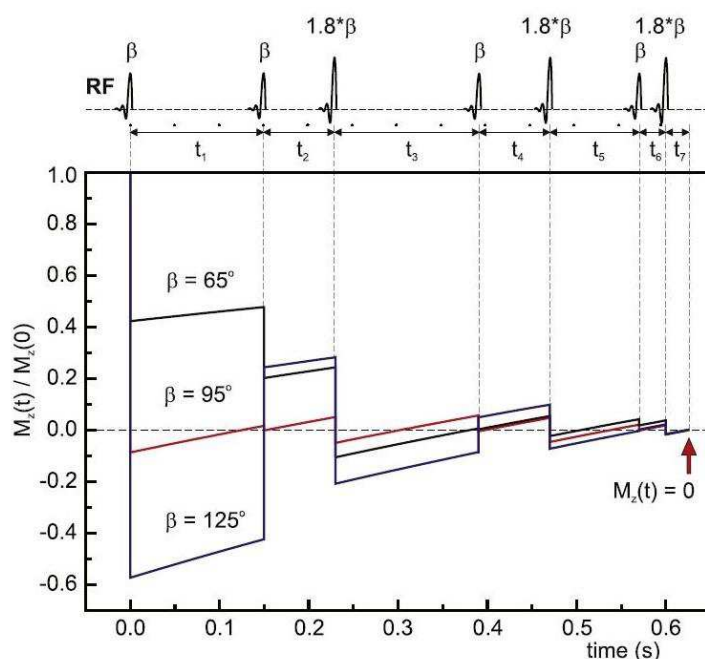


Figure 2.4 : Diagramme du module de suppression d'eau VAPOR
(issue de Xin and Tkáč 2017)

2.1.2.4. La suppression du signal en dehors du voxel d'intérêt

De plus, un module de localisation OVS (Outer Volume Selection) doit être appliqué pour obtenir le signal seulement à l'intérieur du voxel. Le module OVS sert à supprimer le signal en dehors du voxel sans perturber l'aimantation à l'intérieur du voxel. Pour cela, des impulsions de sélection de coupes sont utilisées pour exciter l'aimantation hors du voxel et laquelle est immédiatement déphasée par des gradients appelés « crushers ». Classiquement, les éléments OVS sont utilisés en amont de la séquence PRESS et ils sont intercalés avec le module VAPOR (Xin and Tkáč 2017).

2.1.3. Les métabolites présents dans le cerveau et le foie par ¹H SRM

Les composés chimiques détectés dans un organe sont appelés métabolites et reflètent le métabolisme de cet organe. Le métabolisme est défini comme l'ensemble des réactions chimiques nécessaires aux processus physiologiques au sein d'un organisme (e.g. neurotransmission, synthèse des lipides) (Berg 2015). De ce fait, le profil métabolique détecté par ¹H SRM est propre à chaque organe étudié et il pourra également varier en fonction de la structure au sein d'un même organe ou selon les conditions physiopathologiques.

Dans cette partie, il est présenté les métabolites et leurs déplacements chimiques classiquement obtenus au sein du cerveau et du foie. Ces données servent de connaissances préalables pour l'identification et la quantification des métabolites. Ces connaissances préalables sont obtenues en réalisant des spectres *in vitro* (métabolites seuls ou extraits tissulaires) par RMN à des champs magnétiques équivalents aux expériences SRM *in vivo* (de Graaf 2007).

2.1.3.1. Profil métabolique du cerveau

Le spectre ¹H obtenu chez une souris à 7T est représenté **figure 2.5**. Les déplacements chimiques des principaux métabolites détectés dans le cerveau sont répertoriés dans le **tableau 2.1**. Les métabolites peuvent être divisés en trois catégories : les neurotransmetteurs, les marqueurs de l'homéostasie cellulaire et les métabolites spécifiques à un compartiment.

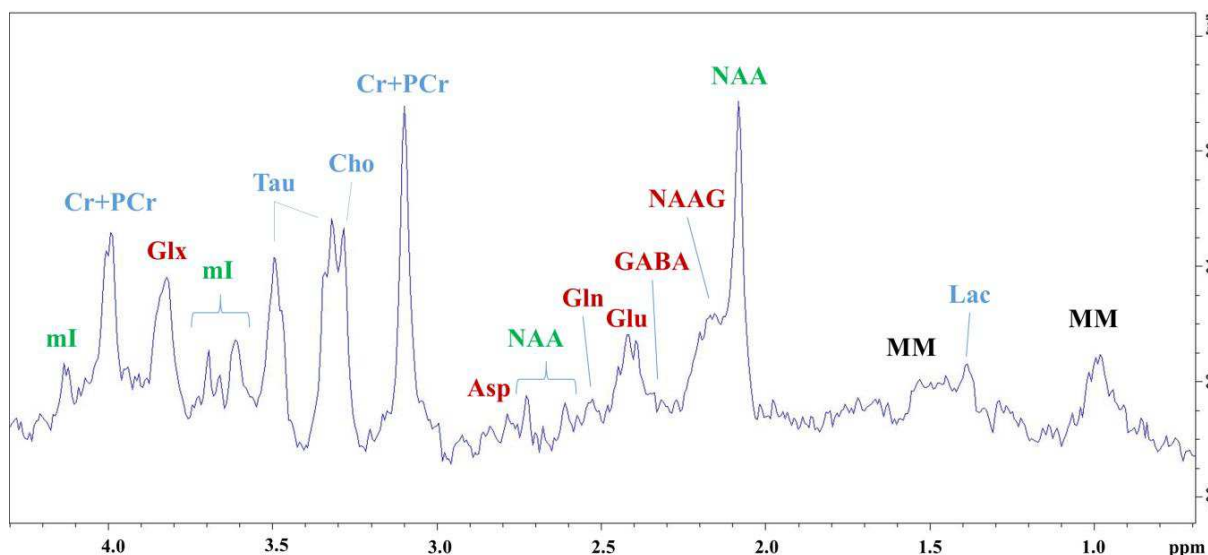


Figure 2.5 : Spectre ¹H SRM obtenu au niveau de l'hippocampe chez la souris à 7T

(1) **Les neurotransmetteurs** sont les molécules chimiques nécessaires à la transmission du message nerveux.

L'acide γ aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. Il est difficile de le détecter dans des conditions physiologiques en raison de sa faible concentration dans le cerveau (autour de 1 mM chez l'Homme et le rat) et de sa superposition avec d'autres pics (Pfeuffer et al. 1999; Tkáč et al. 2003; Govindaraju, Young, and Maudsley 2000).

Le glutamate (Glu) est le principal neurotransmetteur excitateur. Il sert de précurseur à la synthèse du GABA, du glutathion (tripeptide antioxydant) et de protéines. Le glutamate est présent dans le cerveau à une concentration de 6-12,5 mM chez l'Homme et le rat (Pouwels and Frahm 1998; Pfeuffer et al. 1999; Govindaraju, Young, and Maudsley 2000; Tkáč et al. 2003). Le glutamate est présent très largement dans les neurones glutamatergiques et de manière moindre dans les neurones GABAergiques et les astrocytes (de Graaf 2007).

La glutamine (Gln) est un acide aminé important dans le métabolisme intermédiaire du fait de son rôle dans le cycle glutamine-glutamate. La glutamine est synthétisée dans les astrocytes à partir du glutamate par l'enzyme glutamine synthétase et elle peut être dégradée en glutamate par la glutaminase dans les neurones. La glutamine est principalement localisée dans les astrocytes à une concentration de 2-4 mM chez l'Homme et le rat (Pfeuffer et al. 1999; Govindaraju, Young, and Maudsley 2000; Pouwels and Frahm 1998).

Le N-acétyl aspartyl glutamate (NAAG) est un dipeptide de l'aspartate N-substitué et du glutamate. Il semble impliqué dans la neurotransmission excitatrice et il sert de source de glutamate. La concentration de NAAG varie entre 0,6 et 3 mM chez l'Homme et le rat (Fuhrman et al. 1994; Pouwels and Frahm 1997).

L'aspartate (Asp) est un acide aminé non essentiel présent à une concentration de 1-2 mM au niveau cérébral chez l'Homme et le rat. Il a une fonction de neurotransmetteur excitateur (Pfeuffer et al. 1999; Govindaraju, Young, and Maudsley 2000).

(2) Les marqueurs de l'homéostasie cellulaire interviennent dans différents processus physiologiques.

Le lactate (Lac) est le produit final de la glycolyse anaérobie. Il est présent au niveau cérébral à très faible concentration (~0,5 mM) mais il tend à augmenter lors de l'hypoxie, l'accident vasculaire cérébral ischémique et les tumeurs. En ¹H SRM *in vivo*, le pic de lactate se superpose au signal des macromolécules (de Graaf 2007).

La créatine (Cr) et la phosphocréatine (PCr) sont présentes dans les cellules neuronales et gliales. Elles jouent un rôle clé dans le métabolisme énergétique en agissant comme tampon énergétique en maintenant les niveaux d'adénosine triphosphate (ATP). En effet, la créatine kinase catalyse la réaction de phosphocréatine en créatine, ce qui entraîne la production d'ATP. La concentration de créatine totale (Cr+PCr) est plus élevée dans la substance grise (~6,4-9,7 mM) que la substance blanche (5,2-5,7 mM) chez l'Homme (Pouwels and Frahm 1998; Saunders et al. 1999; de Graaf 2007). Une concentration similaire (8,3-9 mM) est mesurée dans le cerveau de rat (Pfeuffer et al. 1999; Tkáč et al. 2003).

La choline (Cho), la phosphocholine (PCho) et la glycérophosphocholine (GPC) sont souvent regroupées sous le terme de composés contenant de la choline (CCC). En effet, les déplacements chimiques de ces composés provenant du groupe méthyle de la choline sont extrêmement proches. La PCho et la GPC contribuent principalement au signal contrairement à la choline libre. Les CCC sont impliqués dans la voie de biosynthèse et de dégradation des phospholipides lesquels entrent dans la composition des membranes cellulaires. Les CCC sont par conséquent des biomarqueurs du renouvellement membranaire et ont une concentration de 1-2 mM chez l'Homme et le rat (Pouwels and Frahm 1998; Pfeuffer et al. 1999).

La taurine (Tau) est un acide aminé non essentiel qui semble posséder un rôle d'osmorégulateur et de modulateur de la neurotransmission. Il a une concentration moyenne de 1,5 mM chez l'Homme et 6-8 mM chez le rat et (Govindaraju, Young, and Maudsley 2000; Tkáč et al. 2003).

(3) Deux métabolites spécifiques à un compartiment cellulaire sont mesurés dans le cerveau.

Le N-acétyl aspartate (NAA) a été proposé comme un marqueur du dysfonctionnement neuronal. Sa fonction dans le système nerveux central n'est pas clairement établie, il semble impliqué dans des fonctions d'osmorégulation, de synthèse de la myéline et des acides gras. La concentration du NAA n'est pas homogène, elle est plus importante dans la substance blanche (8-11 mM) que dans la substance grise (6-9 mM) (Pouwels and Frahm 1997). Dans le cerveau de rat, une concentration moyenne de 7,6-10 mM a été mesurée (Tkáč et al. 2003).

Le myo-Inositol (mI) est une molécule cyclique avec six fonctions alcools. En ¹H SRM, le mI possède six déplacements chimiques détectés de manière très rapprochée et cela a pour conséquence une superposition très marquée. La fonction du mI n'est pas élucidée, il a néanmoins été proposé comme un marqueur des cellules gliales. Il est présent au niveau cérébral à une concentration de 4-8 mM chez l'Homme et le rat (Pouwels and Frahm 1998; Pfeuffer et al. 1999).

Il est à noter qu'une fraction significative des signaux détectés en ¹H SRM provient de macromolécules (e.g. les lipides) et ils sont sous-jacents aux signaux des métabolites. Un minimum de 10 signaux de macromolécules (MM) peut être dénombré : MM1 (0.93 ppm) ; MM2 (1.24 ppm) ; MM3 (1.43 ppm) ; MM4 (1.72 ppm) ; MM5 (2.05 ppm) ; MM6 (2.29 ppm) ; MM7 (3.00 ppm) ; MM8 (3.20 ppm) ; MM9 (3.8-4.0 ppm) ; MM10 (4.3 ppm).

Tableau 2.1 : Principaux métabolites détectés par ¹H SRM *in vivo* dans le cerveau
(d'après de Graaf 2007)

Catégorie	Métabolite	Groupe ment chimique	Déplacement chimique (ppm)
Neurotransmetteurs	Acide γ aminobutyrique (GABA)	² CH ₂	2.28
		³ CH ₂	1.89
		⁴ CH ₂	3.01
	Glutamate (Glu)	² CH	3.75
		³ CH ₂	2.04
		⁴ CH ₂	2.35
	Glutamine (Gln)	² CH	3.76
		³ CH ₂	2.12
		⁴ CH ₂	2.46
	N-acétyl aspartyl glutamate (NAAG)	² CH ₃ (acétyl)	2.04
		³ CH ₂ (glutamate)	2.05
	Aspartate (Asp)	² CH	3.89
		³ CH ₂	2.80
Homéostasie cellulaire	Lactate (Lac)	² CH	4.10
		³ CH ₃	1.31
	Créatine (Cr)	CH ₃	3.03
		CH ₂	3.91
	Phosphocréatine (PCr)	CH ₃	3.03
		² CH ₂	3.93
	Choline (Cho)	(CH ₃) ₃ (choline)	3.19
	Phosphocholine (PCho)	(CH ₃) ₃ (choline)	3.21
	Glycérophosphocholine (GPC)	(CH ₃) ₃ (choline)	3.21
	Taurine	¹ CH ₂	3.42
		² CH ₂	3.25
Métabolites spécifiques à un compartiment cellulaire	N-acétyl aspartate (NAA)	² CH ₃ (acétyl)	2.01
		² CH (aspartate)	2.67
		³ CH ₂ (aspartate)	2.49
	Myo-Inositol (mI)	¹ CH	3.52
		² CH	4.05
		³ CH	3.52
		⁴ CH	3.61
		⁵ CH	3.27
		⁶ CH	3.61

2.1.3.2. Profil métabolique du foie

Le spectre ¹H obtenu chez une souris à 7T est représenté **figure 2.6**. Les déplacements chimiques des principaux métabolites détectés dans le foie sont répertoriés dans le **tableau 2.2**. Les métabolites détectés peuvent être répertoriés en trois catégories : les lipides (L1 à L6), les composés contenant de la choline (CCC) et les glucides (Corbin et al. 2009; van Werven et al. 2012; Ramamonjisoa et al. 2013).

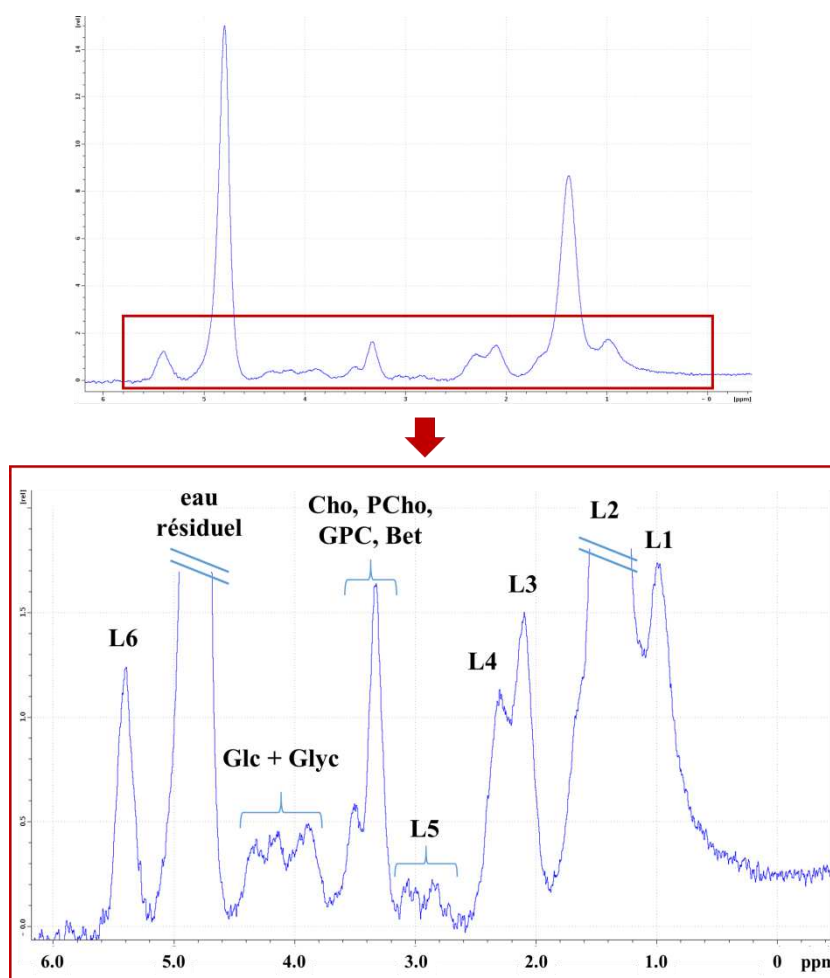


Figure 2.6 : Spectre ¹H SRM obtenu au niveau hépatique chez la souris à 7T

(1) **Les lipides** sont les principaux signaux présents dans le profil métabolique du foie. Les lipides hépatiques sont des acides carboxyliques aliphatiques possédant de longues chaînes carbonées qui peuvent contenir une ou plusieurs doubles liaisons indiquant le degré d'insaturation. A partir du profil métabolique hépatique, la composition en acides gras peut être déduite à l'aide de ratio (Cf. 2.3.1.2., p.47).

(2) La choline (Cho), la phosphocholine (PCho), la glycérophosphocholine (GPC) et la bétaine (Bet) sont les composées contenant de la choline (CCC) qui sont détectables en ¹H SRM. La principale contribution au signal provient de la bétaine.

(3) Le glucose (Glc) est un substrat essentiel dans l'organisme comme source d'énergie et précurseur de nombreux composés. Il existe sous la forme de deux anomères α et β dont chacun possède sept protons détectables en ¹H SRM. Le glycogène est un polymère de 12 à 13 résidus de glucose avec une liaison α -[1,4]. Le glycogène sert de réserve pour le métabolisme glucidique et il est particulièrement abondant dans le foie. Le glucose et le glycogène sont difficiles à distinguer en ¹H SRM, ils apparaissent sous la forme d'un massif à 3.8 – 4.4 ppm.

Tableau 2.2 : Principaux métabolites détectés par ¹H SRM *in vivo* dans le foie
(d'après Corbin et al. 2009; van Werven et al. 2012; Ramamonjisoa et al. 2013)

Catégorie	Métabolite	Groupe chimique	Déplacement chimique (ppm)
Lipides	Lipide méthyle (L1)	CH ₃ -(CH ₂) _n	0.90
	Lipide méthylène (L2)	CH ₃ -(CH ₂) _n	1.30
	Lipide allylique (L3)	CH ₂ CH=CHCH ₂ CH ₂	2.04
	Lipide α Méthylène au carbonyle (L4)	CH ₂ CH ₂ CO	2.25
	Lipide Diallylique (L5)	CH=CHCH ₂ CH=CH	2.76
	Lipide Méthine (L6)	CH=CH	5.32
Composés contenant de la choline (CCC)	Choline (Cho)	(CH ₃) ₃	3.19
	Phosphocholine (PCho)	(CH ₃) ₃ (choline)	3.21
	Glycérophosphocholine (GPC)	(CH ₃) ₃ (choline)	3.21
	Bétaine (Bet)	N-CH ₃	3.25
Glucides	Glucose α (Glc α)	¹ CH	5.22
		² CH	3.52
		³ CH	3.70
		⁴ CH	3.40
		⁵ CH	3.82
		⁶ CH	3.83
		^{6'} CH	3.75
	Glucose β (Glc β)	¹ CH	4.63
		² CH	3.23
		³ CH	3.47
		⁴ CH	3.39
		⁵ CH	3.45
		⁶ CH	3.88
		^{6'} CH	3.71

2.2. Les étapes de post-traitement avant la quantification

Les signaux des métabolites sont représentés sous forme de l'amplitude du signal dans le domaine temporel ou de l'aire sous le pic dans le domaine fréquentiel. Dans le domaine temporel, l'amplitude du signal FID est directement proportionnel au nombre de molécules présentes dans le voxel. Dans le domaine fréquentiel, suite à la transformée de Fourier, l'aire sous le pic est directement proportionnelle à la concentration du métabolite au sein du voxel. Selon le domaine considéré, différentes étapes de post-traitement sont effectuées sur le signal (spectre ou FID) en amont de la quantification.

2.2.1. Post-traitement dans le domaine fréquentiel

Dans les études SRM, les variations expérimentales peuvent conduire à des imperfections dans la collecte des données telles que : (i) des anomalies dans la réception du signal au début de la FID ou au centre exact de l'écho, (ii) des mouvements physiologiques, (iii) la présence du résidu du signal de l'eau ou une contamination des lipides extracrâniels modifiant la ligne de base (Mandal 2012). En amont de la quantification dans le domaine fréquentiel, des étapes de post-traitement du spectre sont nécessaires : l'apodisation, la correction de la phase et la correction de la ligne de base (de Graaf 2007; Jiru 2008).

(1) Apodisation : C'est une méthode d'amélioration de la sensibilité qui permet la réduction des signaux ondulatoires apparaissant dans le spectre lorsque le signal FID a été tronqué. Dans le cas d'un temps d'acquisition trop court, la fin du signal FID n'atteint pas zéro et cela conduit à une troncature de la FID à la réception du signal. L'apodisation va consister à supprimer les signaux ondulatoires du spectre en filtrant les discontinuités du signal FID. L'apodisation utilise des filtres de type exponentiel ou Hamming basés sur le principe que les premiers points de la FID sont égaux à 1 puis la FID décroît jusqu'à zéro. L'apodisation réduit les signaux ondulatoires dans le spectre au détriment d'un élargissement des pics et donc une perte de la résolution.

(2) Correction de la phase : Comme la valeur du facteur de phase n'est pas connue, la correction est réalisée de manière interactive en observant le spectre et en multipliant le spectre par un facteur de phase jusqu'à ce que le spectre ait une forme correcte. Le facteur de phase a deux composantes : (i) ordre de phase zéro (ou phase absolue) qui est indépendante de la fréquence et va permettre de corriger l'ensemble du spectre ; (ii) premier ordre de phase (ou phase linéaire) qui est dépendante linéairement de la fréquence et donc elle est différente pour chaque pic dans le spectre.

(3) Correction de la ligne de base : Dans les spectres SRM *in vivo*, la ligne de base des pics ne s'aligne pas parfaitement avec la ligne droite de l'intensité égale à zéro. Les bruits de fond induisent des distorsions dans le spectre et rendent difficile l'estimation de l'aire sous les pics. Les signaux dans le bruit de fond sont classiquement de larges signaux issus des macromolécules et des lipides avec des valeurs T2* courtes. De ce fait, les signaux de la ligne de base peuvent être identifiés comme des composés décroissants rapides dans les premières parties de la FID. De plus, une élimination inefficace de l'eau peut induire une déformation de la ligne de base des métabolites d'intérêts. La correction de la ligne de base consiste à indiquer les points correspondant à une intensité égale à zéro, lesquels serviront à la modélisation de la ligne de base par une spline cubique (courbe définie par fragments à l'aide de polynômes). La sélection des points de référence pour la ligne de base rend la méthode opérateur-dépendante.

2.2.2. Post-traitement dans le domaine temporel

Contrairement à la quantification dans le domaine fréquentiel, la quantification dans le domaine temporel est réalisée directement sur les données FID. Le signal FID correspond à un mélange de différents signaux de sinusoïdes amorties, lesquels sont uniques et caractérisés par un certain nombre de paramètres physiques : fréquence de résonance, facteur d'amortissement (« damping factor »), une phase et une amplitude individuelle à $t=0$.

De manière similaire à la quantification dans le domaine fréquentiel, des étapes de post-traitement avant la quantification dans le domaine temporel peuvent être effectuées telles que l'apodisation, la correction des courants de Foucault, le remplissage de zéros (« zero filling ») (Jiru 2008).

(1) Apodisation : C'est une méthode commune aux deux domaines.

(2) Correction des courants de Foucault (« eddy current ») : Cela sert à supprimer les signaux parasites induits par les variations rapides des gradients de champ magnétique. Cela consiste à l'acquisition d'un spectre sans suppression d'eau qui servira à mesurer la phase de la FID de l'eau en chaque point et de le soustraire à la FID avec des artefacts. L'acquisition de la FID de l'eau est réalisée dans les mêmes conditions que la FID à analyser (position et taille du voxel, les paramètres de la séquence). Il doit être noté que les scanners IRM modernes sont équipés d'un blindage de l'aimant et de gradients de préemphasis (gradients de pré-compensation) limitant grandement les courants de Foucault.

(3) **Remplissage de zéros (« zero filling »)** : Cela consiste à ajouter des points de valeurs nulles à la fin du signal FID. Comme le nombre de points est augmenté pour décrire le signal FID, cela va améliorer artificiellement la résolution et aider ainsi à la caractérisation de la forme du pic dans le spectre.

2.3. Les méthodes de quantification en SRM

Différentes stratégies existent pour effectuer la quantification : (i) relative par des ratios par rapport à une référence interne ; (ii) absolue en concentration molaire (mM) à l'aide d'une référence externe ou en unité arbitraire (U.A.) par des modèles d'ajustement (« fitting model »). Les différentes méthodes sont réalisées dans le domaine temporel ou le domaine fréquentiel (**tableau 2.3**).

Tableau 2.3 : Les différentes méthodes de quantification selon le domaine

	Quantification		Domaine	
	Relative	Absolue	Fréquentiel	Temporel
Ratios	X		X	
ERETIC		X	X	
LCModel		X	X	
jMRUI		X		X

2.3.1. La quantification relative par la méthode des ratios

Classiquement en RMN et plus particulièrement en métabolomique, la quantification absolue (en mM) des métabolites est réalisée dans le domaine fréquentiel. Une référence externe est utilisée à une concentration connue et dont la fréquence de résonance est éloignée de celles des métabolites d'intérêts (e.g. éthylène glycol pour le tissu cérébral et fumarate pour le tissu hépatique) (**Eq. 2.4**) (de Graaf 2007).

$$[M] = [R] \frac{S_M}{S_R} \times C_{MR} \quad [2.4]$$

Avec $[M]$, la concentration du métabolite ; $[R]$, la concentration du composé de référence ; S_M , l'amplitude du signal du métabolite d'intérêt ; S_R , l'amplitude du signal du composé de référence ; C_{MR} , un coefficient de correction entre le composé de référence et les métabolites (e.g. la susceptibilité magnétique et la position spatiale relative dans la bobine).

Dans le cas de la SRM *in vivo* en clinique ou en préclinique, une référence externe est difficile à mettre en place d'où le choix de l'utilisation d'une référence interne. Cette méthode consiste à quantifier les spectres dans le domaine fréquentiel en fixant un pic comme référence. L'utilisation d'une référence interne permet de s'affranchir du facteur de correction étant donné que le métabolite d'intérêt et le composé de référence sont obtenus dans les mêmes conditions.

Cette approche a pour contrainte de ne pas pouvoir identifier l'origine des variations conduisant à une ambiguïté dans les tendances des variations. Par exemple, si le ratio métabolite/référence augmente, cela peut être dû à une augmentation du métabolite ou à une diminution de la référence ou à une variation simultanée des concentrations des deux composés. Cette méthode nécessite que la référence interne ne varie pas dans les conditions expérimentales de l'étude. De plus, selon l'organe, la référence interne utilisée ne sera pas identique. Dans le cadre de ces travaux de thèse, l'utilisation des ratios au niveau cérébral et hépatique est présentée.

2.3.1.1. Ratios par la créatine, la choline ou le NAA dans le cerveau

Les métabolites utilisés comme référence interne pour la quantification relative sont la créatine, la choline ou le NAA. Pour s'affranchir de la limitation de la quantification relative et mettre en évidence précisément la tendance des variations observées, différents types de ratio sont utilisés tels que Cho/Cr, NAA/Cr et Cho/NAA. En clinique, ces ratios ont été utilisés comme biomarqueurs pour le diagnostic de troubles moteurs des enfants prématurés, les lésions non néoplasiques de la substance blanche, la classification des tumeurs primaires cérébrales et des gliomes (Kendall et al. 2014; Kaddah and Khalil 2016; Wang et al. 2016; Naser et al. 2016). Dans le cas des gliomes cérébraux, la créatine mesurée de l'hémisphère cérébral sain peut servir de référence interne (Yerli et al. 2007).

Néanmoins, la stabilité de la créatine comme référence interne a été remise en question car sa concentration n'est pas uniforme dans l'ensemble du cerveau. La concentration de créatine totale (Cr+PCr) est plus élevée dans la substance grise (6,4-9,7 mM) que la substance blanche (5,2-5,7 mM) (Pouwels and Frahm 1998). Dans une étude clinique chez des sujets sains, l'utilisation de la créatine dans les ratios montre une plus grande variabilité dans les résultats que la mesure individuelle des composés (Li, Wang, and Gonen 2003). De plus, la créatine augmente dans de nombreuses conditions physiopathologiques telles que : les gliomes de bas grade, les désordres psychiatriques (dépression, schizophrénie), un marqueur de la gliose dans

le syndrome d'immunodéficience acquise, dans les micro-dépôts de créatine dans la maladie d'Alzheimer (Allen 2012; Ratai et al. 2011; Huang et al. 2004; Bulik et al. 2013).

De la même manière, la concentration du NAA dans la substance grise (8-11 mM) est supérieure au sein de la substance blanche (6-9 mM) (Pouwels and Frahm 1997). Le NAA est altéré dans le cas de perte neuronale induite par des maladies neurodégénératives et les accidents vasculaires cérébraux ischémiques (Schuff et al. 2006; Rigotti, Inglese, and Gonen 2007; Munoz Maniega et al. 2008). La choline est aussi modifiée dans le cas de l'accident vasculaire cérébral ischémique ainsi que dans la prolifération tumorale (Munoz Maniega et al. 2008; Glunde, Bhujwalla, and Ronen 2011).

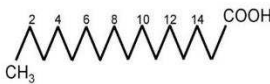
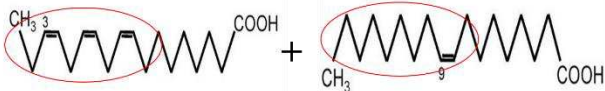
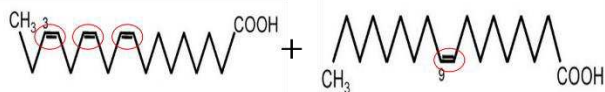
Il est également possible de réaliser une quantification en utilisant le pic de l'eau comme référence interne (Barker et al. 1993). Bien que cela prenne en compte les inhomogénéités du champ magnétique, la fiabilité est remise en question lorsque la concentration varie dans le cas de certaines situations physiopathologiques (e.g. œdème cérébral, sclérose en plaque) (Helms 2001; Laule et al. 2004)

2.3.1.2. Ratios des lipides dans le foie

La quantification relative par les ratios au niveau hépatique concerne essentiellement les acides gras (AG). Les ratios vont permettre une meilleure compréhension de la composition lipidique. Les ratios seront effectués afin de caractériser les différentes catégories des AG : saturés, monoinsaturés et polyinsaturés. Les AG saturés ne possèdent pas de double liaison dans leurs chaînes carbonées. Les acides gras insaturés présentent soit une double liaison (AG monoinsaturés), soit plusieurs doubles liaisons (AG polyinsaturés).

Dans la littérature, de nombreux ratios sont répertoriés pour évaluer la composition lipidique hépatique. Dans le cadre de la thèse de Coum (2015), une comparaison de ces ratios a été réalisée chez des souris obèses ob/ob et chez des patients présentant une stéatose hépatique (accumulation d'AG dans les hépatocytes). Les ratios de Corbin et al. (2009) apparaissent les plus robustes et ils sont présentés dans le **tableau 2.4**.

Tableau 2.4 : Ratios de la composition lipidique au niveau du foie
(d'après Corbin et al. 2009)

Index	Ratio	Définition
SC Saturated component of Fatty Acids	$\frac{3}{2} \times \frac{L2}{L1}$	Fraction des acides gras saturés 
TUFI Total Unsaturated Fatty Acids Index	$\frac{3}{4} \times \frac{L3}{L1}$	Index des acides gras insaturés 
TUBI Total Unsaturated Bond Index	$\frac{3}{2} \times \frac{L6}{L1}$	Index des liaisons des acides gras insaturés 
PUBI Polyunsaturated Bond Index	$\frac{3}{2} \times \frac{L5}{L1}$	Index des liaisons des acides gras polyinsaturés 

Les ratios utilisés par Corbin et al. (2009) permettent de mesurer : (i) la fraction saturée des AG (Saturated component of Fatty Acids ; SC), (ii) l'index des AG insaturés (Total Unsaturated FA index ; TUFI), (iii) l'index des liaisons des AG insaturés représentant la moyenne des doubles liaisons de l'ensemble des AG insaturés présents dans le voxel (Total Unsaturated bond index ; TUBI), (iv) l'index des liaisons des AG polyinsaturés correspondant à la moyenne des doubles liaisons des AG polyinsaturés présents dans le voxel (Polyunsaturated bond index ; PUBI).

2.3.2. La quantification absolue par la méthode ERETIC digital

La méthode ERETIC (Electronic Reference to access In vivo Concentration) a été introduite initialement par (Barantin, Le Pape, and Akoka 1997) pour réaliser une quantification absolue en SRM dans le domaine fréquentiel. C'est une approche innovante consistant à générer un signal électronique à l'aide d'un appareil électronique placé à l'extérieur du spectromètre et qui est connecté au second canal RF du spectromètre. Ce signal ERETIC de faible puissance est appliqué pendant l'acquisition et simule un pseudo signal FID, lequel est transmis à une antenne à large bande simultanément au signal de l'échantillon. Cela donne un pic additionnel de forme Lorentzienne dans le spectre final. Le signal ERETIC est préalablement calibré avec un fantôme (tube test) à une concentration connue et sert donc de référence pour la quantification absolue.

Cette technique offre de nombreux avantages tels que : (i) l'application à tous les types de noyaux, (ii) le spectre est acquis simultanément avec le signal de référence ERETIC, (iii) l'intensité du signal ERETIC n'est pas modifiée selon les conditions physiopathologiques, (iv) le remplissage de la bobine et le gain de réception ne nécessitent pas de correction. Néanmoins, le signal ERETIC n'est pas corrigé pour les inhomogénéités de $\overrightarrow{B_1}$ de la bobine RF et il nécessite l'utilisation d'une bobine volumique homogène (Heinzer-Schweizer et al. 2010).

Comme le signal ERETIC est transmis lors de la réception du signal RMN, le spectromètre nécessite d'avoir un second canal RF capable de transmettre lorsque le principal canal RF est en mode réception. L'implémentation de la méthode ERETIC aux spectromètres avec un seul canal RF n'est donc pas réalisable. Une méthode alternative est l'acquisition d'un signal ERETIC préalablement à la séquence PRESS. La séquence de spectroscopie ERETIC n'est pas spatialement localisée et elle consiste en l'ajout d'une impulsion lors de la réception du signal. Cette technique montre des résultats consistants avec ceux utilisant l'eau comme référence interne au niveau cérébral chez les volontaires sains (Desal, Pineda Alonso, and Akoka 2010).

Une approche alternative à l'absence du second canal RF est la méthode ERETIC digital consistant à générer un signal synthétique dans le domaine fréquentiel lors du post-traitement pour servir de référence. La méthode ERETIC digital a été développée pour l'analyse RMN par Bruker mais elle n'a pas encore été appliquée en SRM *in vivo*.

Le signal ERETIC digital est préalablement calibré à l'aide d'un tube test (ou fantôme) contenant un métabolite à une concentration connue représentatif de l'organe étudiée. La calibration est réalisée à l'aide d'un spectre de référence acquis dans les mêmes conditions expérimentales de l'étude incluant un remplissage équivalent de la bobine volumique et les paramètres de la séquence identiques (TE/TR et le nombre d'accumulations). Le spectre de référence obtenu doit être traité par les étapes précédemment décrites : apodisation, correction de la phase et de la ligne de base. Après calibration du signal ERETIC, il sera généré dans les spectres à analyser.

Dans l'exemple de la **figure 2.7**, le fantôme contient du NAA à 5 mM dont le déplacement chimique du pic principal est à 2,01 ppm. Le signal artificiel ERETIC est généré dans le spectre à 11 ppm. Les aires sous les pics de référence et du signal synthétique sont intégrées. L'aire sous le pic de référence est fixée à une valeur basée sur le nombre de protons et la

concentration (ici, 3 ¹H pour le NAA à 2,01 ppm avec une concentration de 5 mM). Ainsi, la valeur calibrée du pic ERETIC digital est de 13,006. Lors de la quantification du spectre d'intérêt, le pic synthétique est généré avec sa valeur de calibration préalablement mesurée afin de servir de référence pour les métabolites d'intérêts. Dans cet exemple d'un spectre obtenu au niveau cérébral, l'aire sous le pic de NAA à 2,01 ppm est de 17,763 puis elle est divisée par le nombre de proton résonant à ce déplacement chimique. La concentration de NAA obtenue est 5,921 mM.

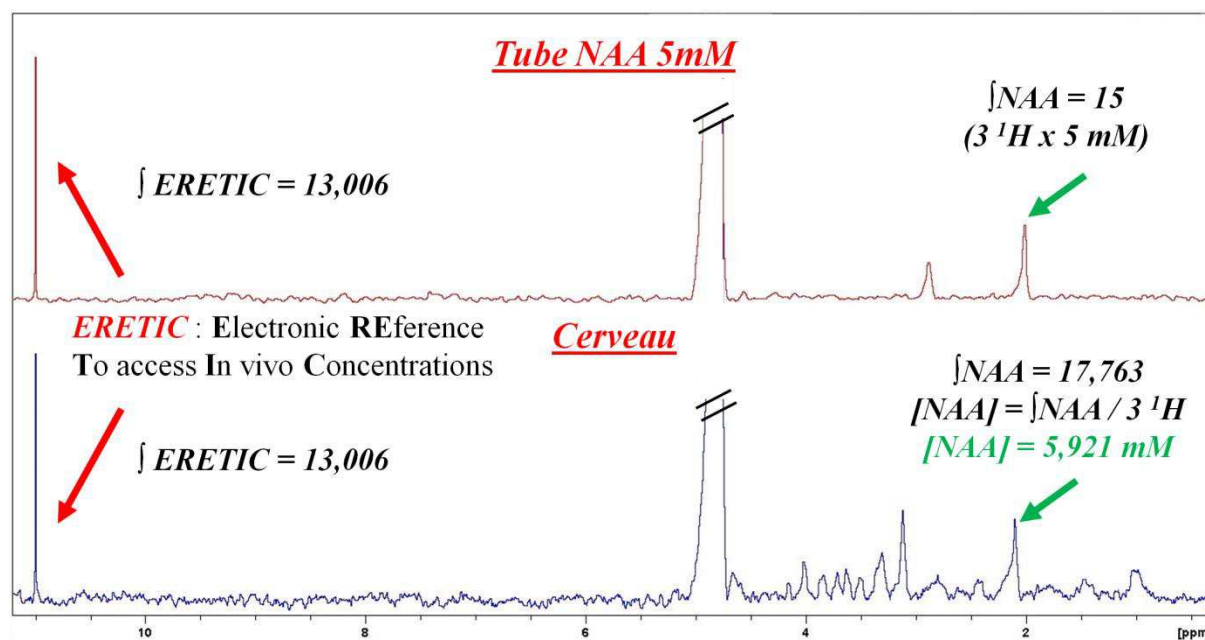


Figure 2.7 : La quantification au niveau cérébral chez le rat par la méthode ERETIC digital

Dans la deuxième partie de cette thèse (Cf. Chap.4, p.78), la validité de la méthode ERETIC digital a été discutée en comparaison avec les méthodes de quantification conventionnelles sur des données *in vivo* obtenues au niveau cérébral chez le rat.

2.3.3. Les modèles d'ajustement

Les modèles d'ajustement sont des modèles mathématiques qui servent à décomposer le signal (FID ou spectre), c'est-à-dire les pics des métabolites et l'aspect de la ligne de base. Ces modèles d'ajustement sont dits itératifs car ils utilisent des connaissances préalables sur les métabolites afin de réduire la complexité du signal à analyser. En effet, sans information a priori sur les fréquences de résonance des métabolites, la quantification peut être difficile du fait du nombre possibles d'ajustements corrects.

Deux principaux logiciels sont utilisés en SRM : LCModel dans le domaine fréquentiel et jMRUI dans le domaine temporel. Les algorithmes de ces logiciels utilisent des fonctions des moindres carrés non linéaires et ont pour but de minimiser les différences entre les données et le modèle de fonction.

Il existe plusieurs algorithmes et ils sont catégorisés selon les informations préalables à fournir pour la quantification telles que : (i) la création d'une base de données des métabolites à partir de données expérimentales ou simulées (logiciel LCModel), (ii) la simulation d'une base de données à partir des paramètres des métabolites de la séquence utilisée (QUEST du logiciel jMRUI), (iii) la superposition de pics de différentes largeurs par des fonctions dites « phénoménologiques » afin de modéliser les signaux des métabolites et la ligne de base (AMARES du logiciel jMRUI) (Helms 2008).

2.3.3.1. LCModel

Le logiciel LCModel (« Linar Combination Model ») est un logiciel qui a pour but de décomposer un spectre *in vivo* en une combinaison linéaire de spectres modèles issus d'une base de données *in vitro* ou simulée (Provencher 1993). La base de données peut être générée à partir de spectres individuels des métabolites en solution (pH=7,2 et T°=37°C) dans les mêmes conditions expérimentales (fréquence de Larmor et paramètres de la séquence). Une approche alternative est de simuler la base de données en utilisant les déplacements chimiques et les constantes de couplage J (interaction entre plusieurs protons à travers les liaisons chimiques). En plus des données sur les métabolites, les paramètres expérimentaux (TE, bande spectrale et champ magnétique) sont pris en compte (Helms 2008; Mandal 2012; Xin and Tkáč 2017).

LCModel assure une quantification des pics superposés en incorporant le spectre expérimental de chaque métabolite (e.g. glutamate et glutamine). Simultanément aux calculs des concentrations des métabolites, LCModel comprend des étapes de pré-processing automatisées (la forme des pics, la correction de la phase et la correction de la ligne de base) afin de minimiser les erreurs opérateurs dépendants. La ligne de base est corrigée même lors de la présence de déformations induites par les mouvements physiologiques et aux courants de Foucault résiduels.

Les signaux des macromolécules et des lipides peuvent être inclus dans la correction de la ligne de base soit par acquisition d'un spectre de macromolécules (séquence inversion-récupération), soit par la simulation d'un spectre de macromolécules par des fonctions

mathématiques spline. L'incorporation d'un spectre de macromolécules dans la base de données peut être importante dans la quantification des métabolites de faibles concentrations (aspartate, GABA).

Comme illustré dans la **figure 2.8**, l'analyse LCModel fournit le spectre original et il apparaît en rouge le spectre simulé. Une liste de concentrations des métabolites est obtenue avec une estimation des erreurs d'ajustements appelés « Cramér-Rao lower bounds » (CRLB) qui indique l'incertitude statistique de l'estimation de la concentration.

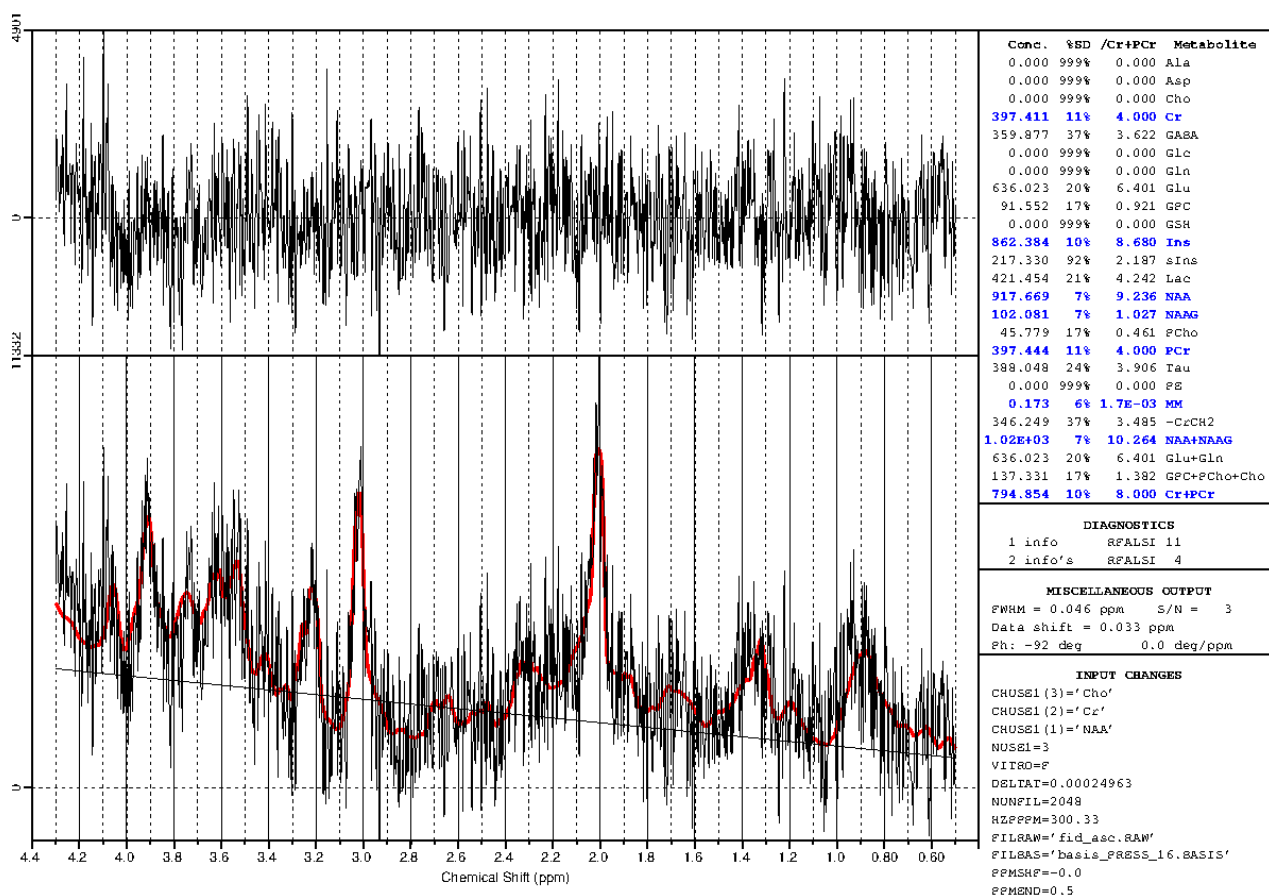


Figure 2.8 : Exemple de résultats obtenus dans le cerveau chez le rat avec le logiciel LCModel. Quantification réalisée par Julien Valette (CEA, Saclay, France).

2.3.3.2. jMRUI

Le logiciel jMRUI (« java-based MR user interface ») permet de réaliser la quantification des données SRM dans le domaine temporel et il nécessite davantage d'interactions de l'opérateur que le logiciel LCModel. Deux principaux algorithmes de jMRUI sont fréquemment utilisés : QUEST (« Quantitation based on Quantum Estimation ») (Ratney et al. 2005) et AMARES (« Advanced Method for Accurate, Robust and Efficient Spectral ») (Vanhamme, van den Boogaart A, and Van Huffel S 1997).

(1) L'algorithme QUEST est un modèle de combinaison linéaire qui va permettre de décomposer le signal FID. L'algorithme QUEST utilise une base de données de métabolites précédemment générés par simulation via le module NMRScopeB (NMR Spectra Calculation using OPERators-Brno) (Starčuk et al. 2009) ou par GAVA (GAMMA Visual Analysis) (Soher et al. 2007). La base de données simulée prend en compte les caractéristiques des métabolites (déplacements chimiques, amplitude et phase) et les paramètres expérimentaux utilisés *in vivo* (champ magnétique, TE).

QUEST peut calculer les signaux des macromolécules en réalisant des calculs itératifs sur une partie des points de la FID et en l'ajustant à une base de données spécifique aux macromolécules. Cette base de données inclut les déplacements chimiques des macromolécules, leurs largeurs à mi-hauteur et les amplitudes entre les macromolécules fixées. Dans l'exemple illustré dans la **figure 2.9**, il est obtenu le spectre original (avec une apodisation de 3 Hz), le spectre estimé, le spectre des macromolécules et le résidu du spectre après estimation.

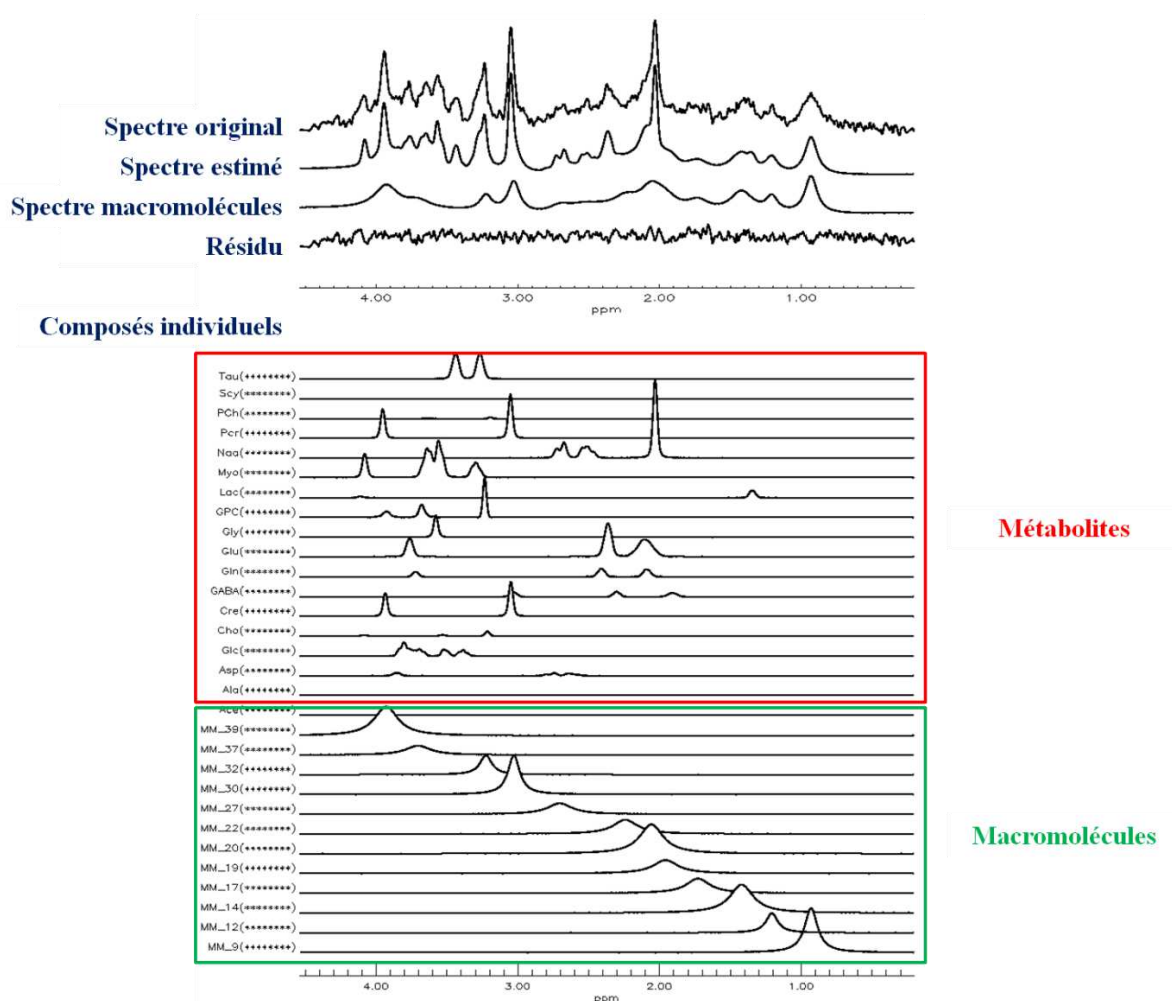


Figure 2.9 : Exemple de résultats obtenus chez le rat avec l'Algorithme QUEST réalisé avec le logiciel CSIApo développé par Yann LeFur (CRMBM, Marseille, France)

(2) L'algorithme AMARES ne nécessite pas de base de données simulée pour effectuer la quantification. AMARES utilise des connaissances préalables comprenant la liste des pics et leur largeur à mi-hauteur afin d'augmenter l'efficacité de la quantification. AMARES est préprogrammé pour modéliser différentes formes de pics de métabolites détectés en SRM *in vivo*. AMARES est privilégié dans le cas d'un faible ratio signal/bruit, une superposition importante des pics ou la présence importante de macromolécules.

Dans la **figure 2.10**, un exemple de quantification par l'algorithme AMARES est présenté dans un spectre acquis au niveau du cervelet chez le rat. Les résultats fournis par AMARES correspondent à une fenêtre avec le spectre original, le spectre estimé, les métabolites analysés individuellement et le résidu du spectre après estimation. Les informations quantitatives sont résumées dans un tableau contenant : les noms des pics, la fréquence de résonance (Hz ou ppm selon le choix de la sélection), la largeur du pic (damping factor en Hz), l'amplitude du signal, l'écart-type de l'amplitude (déviation standard) et l'ordre de la phase (0 ou 1).

Résidu

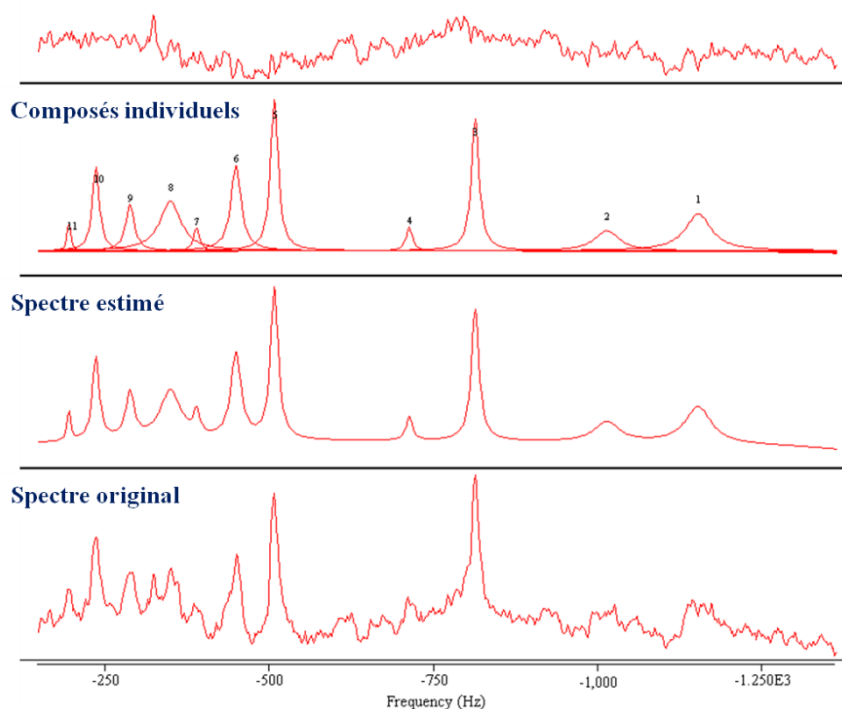


Figure 2.10 : Exemple de résultats obtenus chez le rat avec l'algorithme AMARES
réalisée avec le logiciel jMRUI

Dans la troisième partie (Cf. Chap.7, p.160) de ces travaux de thèse, les données SRM ont été analysées en utilisant l'algorithme AMARES.

2.4. La spectroscopie pondérée en diffusion

2.4.1. Principe de la spectroscopie pondérée en diffusion

La spectroscopie pondérée en diffusion (Diffusion Weighed Spectroscopy ; DWS) mesure la diffusion des métabolites alors que la DWI étudie la diffusion des molécules d'eau. Ainsi, la DWS va permettre de mettre en évidence les mouvements microscopiques des molécules dans les tissus.

Les métabolites détectés en SRM sont de poids moléculaires plus importants que les molécules d'eau. Les métabolites ont donc une probabilité plus élevée d'être restreints par les barrières cellulaires et sous-cellulaires (cytosquelette, organites). Les métabolites sont présents dans les espaces intra et extracellulaire, lesquels sont séparés par des membranes sélectivement perméables et imposant des barrières à la diffusion moléculaire. Ainsi, la diffusion des métabolites est non-brownienne et elle est plus lente que celles des molécules d'eau. Du fait de ces nombreuses barrières et de la concentration des métabolites plus faible que celle de l'eau, la diffusion des métabolites mesurée en DWS sera seulement apparente (ADC ; Apparent Diffusion Coefficient) (Nicolay et al. 2001; Cao and Wu 2016).

Les molécules d'eau sont ubiquitaires et elles sont présentes dans les compartiments intra et extracellulaire. De plus, les membranes cellulaires sont relativement perméables aux molécules d'eau, la mesure de la diffusion de l'eau est donc non spécifique à un compartiment. Par contraste, certains métabolites au niveau cérébral sont considérés comme des biomarqueurs spécifiques d'un compartiment cellulaire (*Cf.2.1.3.1., p.36*). La DWS a donc le potentiel d'apporter des informations biologiques pertinentes sur les compartiments cellulaires. Le NAA total (tNAA=NAA+NAAG) et le glutamate sont présents essentiellement dans le milieu intracellulaire des neurones alors que le myo-Inositol se retrouve majoritairement dans les cellules gliales. Les composés contenant de la choline (CCC=GPC+PCho+Cho) sont deux à trois fois plus concentrés dans les astrocytes. La créatine totale (tCr=Cr+PCr) est retrouvée dans les compartiments neuronal et astrocytaire (Ronen and Valette 2015).

Les applications de la DWS au niveau cérébral et dans les autres tissus (tissu adipeux, moelle épinière, muscle squelettique) ont été récemment recensées (Ronen and Valette 2015; Cao and Wu 2016). La DWS a été utilisée en clinique pour étudier la diffusion des métabolites dans les cerveaux de patients sains et il a été observé des valeurs des ADC du tNAA, tCr et CCC plus élevées dans la substance blanche que dans la substance grise (Najac et al. 2016). La

DWS a également été utilisée en clinique et/ou préclinique dans la caractérisation de pathologies telles que : (i) l'accident vasculaire cérébral ischémique chez le rat (une diminution des ADC de l'ensemble des métabolites) (Wick et al. 1995), (ii) le glioblastome chez la souris (une élévation des ADC de la choline) (Valette et al. 2012), (iii) les patients schizophrènes (augmentation de l'ADC du tNAA dans la substance blanche au niveau frontal) (Du et al. 2013).

La spectroscopie pondérée en diffusion offre une opportunité intéressante de détecter les anomalies de l'intégrité intracellulaire dans divers processus physiopathologiques de manière non invasive. Néanmoins, les méthodes actuelles fournissent une information limitée car elles ne permettent pas de quantifier les paramètres impliqués dans l'altération cellulaire (viscosité du cytosol, taille des organites).

2.4.2. Les séquences DWS et le post-traitement des données

La séquence de DWS consiste à incorporer des gradients de diffusion dans la séquence de spectroscopie afin de sensibiliser le signal RMN à la diffusion. La diffusion des métabolites cause un déphasage macroscopique des spins en présence des gradients de diffusion. Cela permet ainsi l'obtention de la valeur de coefficient de diffusion moyen des métabolites dans le voxel.

2.4.2.1. Les séquences DWS utilisées dans la littérature

Les séquences DWS utilisent classiquement des séquences de spectroscopie localisée monovoxel (PRESS ou STEAM).

La séquence DWS-PRESS peut comporter une ou deux paires de gradients de diffusion, lesquelles peuvent être unipolaires ou bipolaires. Comme illustré dans la **figure 2.11A**, la séquence DWS-PRESS peut incorporer une paire de gradients de diffusion unipolaire (B-B' ou A-A'), deux paires de gradients de diffusion unipolaire (B-B'-A-A' ou C-C'-A-A'), une paire de gradients de diffusion bipolaire (C'-B ; C''-A ; C'''-A'' ; C'-A') ou une double paire de gradients de diffusion bipolaire (B-C''-A-C'''). Le temps d'écho (TE) est égal à la somme de TE1 et TE2.

La séquence STEAM peut incorporer une paire de gradients de diffusion autour des deux impulsions de 90° avant l'écho (**Fig 2.11B**). Comparé à la DWS-PRESS, la séquence DWS-STEAM offre la flexibilité d'augmenter le temps de diffusion sans faire varier le TE. Cependant, seulement la moitié du signal est récupérée résultant à un faible ratio signal sur

bruit. En effet, la moitié de l'aimantation transverse est conservée dans la direction longitudinale (axe x) et l'autre moitié est perdue pendant le temps mixte (TM)

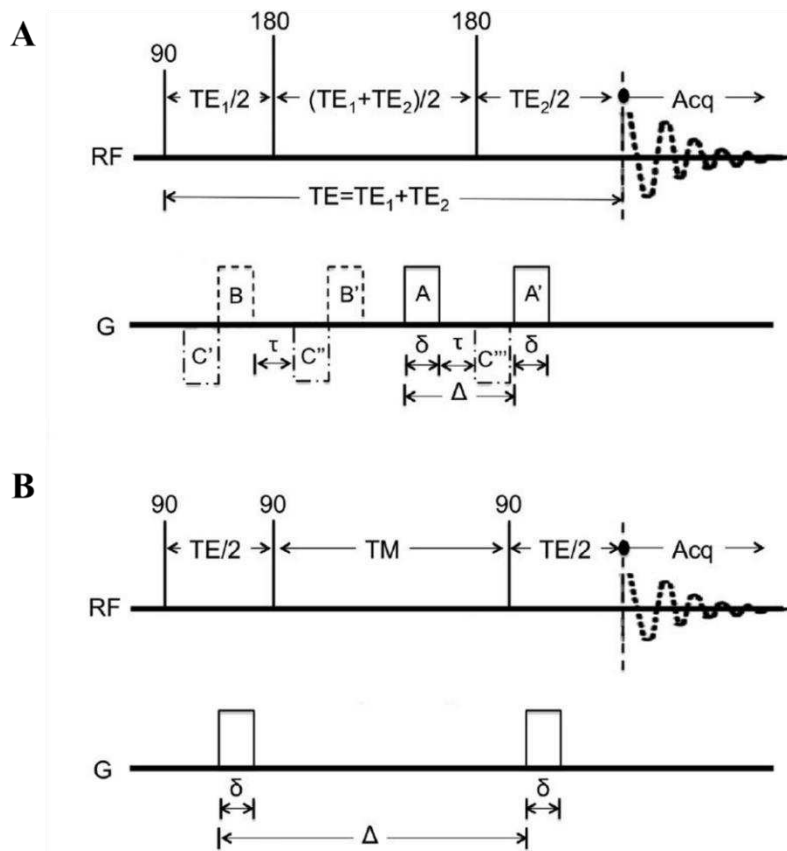


Figure 2.11 : Séquences de spectroscopie pondérées en diffusion en (A) la séquence DWS-PRESS et en (B) la séquence DWS-STEAM (Issue de Cao and Wu 2016)

Les gradients de diffusion sont caractérisés par leur durée (δ), le délai entre deux gradients de diffusion (Δ) et le délai au sein d'une même paire de gradients bipolaires (τ).

Il a été aussi développé une séquence LASER (Localization by Adiabatic Selective Refocusing) utilisée dans les expériences comportant des inhomogénéités $\vec{B}_1$ importantes (e.g. utilisation d'une bobine de surface pour la réception du signal). Cette séquence comprend plusieurs gradients de diffusion oscillants permettant d'atteindre des durées de gradients de diffusion très courtes (Marchadour et al. 2012)

Du fait de la faible concentration des métabolites et de leurs diffusions restreintes, les séquences DWS utilisent des intensités de gradients de diffusion élevées pour sensibiliser les signaux des métabolites. L'efficacité des gradients de diffusion est définie par le paramètre b (Eq. 1.8) dont la valeur peut varier en fonction du délai entre les gradients, de la durée ou de l'amplitude des gradients. Classiquement, le délai ou la durée ne sont pas modifiés car ils

augmentent le TE et donc modifient l'amplitude du signal (relaxation T2). Par conséquent, les valeurs de b sont modulées en faisant varier l'amplitude du gradient.

Comme les gradients de diffusions incorporés dans la DWS sont d'intensités importantes, les données de DWS ont un faible ratio signal sur bruit et ils sont sensibles aux courants de Foucault ainsi qu'aux artéfacts de mouvement. Lors de l'optimisation de cette méthode, il est nécessaire de conserver un TE suffisamment court afin d'obtenir des spectres avec un minimum de bruit pour une quantification correcte.

Néanmoins, un TE très court peut être en faveur d'un signal des macromolécules élevé induisant un biais dans la quantification. De plus, la valeur du TE est directement dépendante de la durée des gradients de diffusion. Concernant les courants de Foucault, une durée de gradient de diffusion courte est préférable afin de les diminuer. Les conséquences d'importants courants de Foucault sont des pics asymétriques, un élargissement des pics avec l'augmentation des valeurs de b et une éventuelle surestimation de l'ADC (Cao and Wu 2016).

Dans le cadre de ces travaux de thèse, une séquence DWS-PRESS a été développée par Didier Wecker (Bruker, Ettlingen, Allemagne). La paire de gradients de diffusion unipolaires a été incorporée autour de la seconde impulsion RF 180° de la séquence PRESS (**Fig. 2.12**). Les gradients de diffusion sont successivement appliqués dans chaque direction (x, y et z). Les tests *in vitro* de l'optimisation de cette séquence ainsi que de la validation chez la souris sont présentés dans le chapitre 7 de la troisième partie (p.160) de cette thèse.

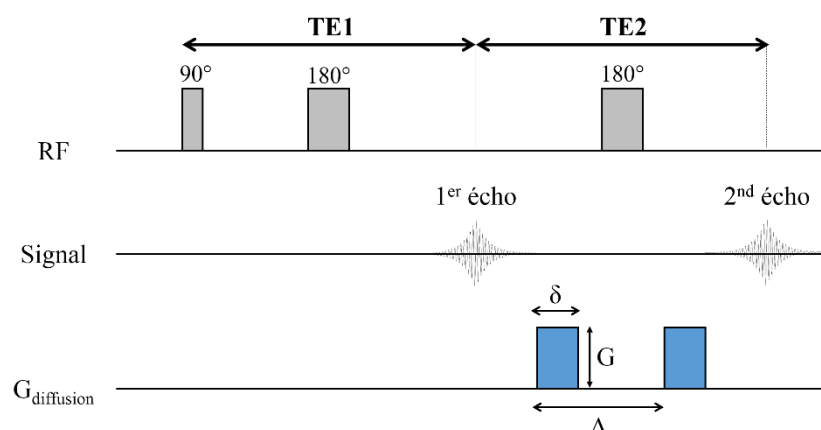


Figure 2.12 : Séquence de diffusion spectroscopique

Les gradients de diffusion sont caractérisés par leur amplitude (G), leur durée (δ) et le délai entre des gradients de diffusion (Δ), cela permet ainsi d'ajuster l'intensité de la valeur de diffusion b.

2.4.2.2. Post-traitement des données

Les données obtenues en DWS sont des signaux FID pour chaque valeur de b et dans chaque direction (x , y , z). L'aire sous le pic (dans le domaine fréquentiel) ou l'amplitude du signal (dans le domaine temporel) seront mesurées par les moyens de quantification précédemment présentés (Cf. 2.3., p.45).

L'ADC est considéré équivalent au coefficient de diffusion effectif dans la direction d'application des gradients de diffusion, ainsi l'atténuation du signal peut être considérée comme mono-exponentielle (Pfeuffer, Tkáč, and Gruetter 2000; Najac 2014). La valeur de l'ADC est déterminée par régression linéaire en traçant le logarithme de l'atténuation du signal S/S_0 en fonction des valeurs de b (Eq. 2.6). Le calcul de l'ADC est une approximation de la diffusion gaussienne et il est valable seulement pour des valeurs de b faibles (< 6000 s/mm²).

$$\text{Log}(S/S_0) = -b \cdot \text{ADC} \leftrightarrow S/S_0 = e^{-b \cdot \text{ADC}} \quad [2.5]$$

Avec S_0 , signal d'une acquisition avec $b=0$; S , signal d'une acquisition avec $b>0$; b , l'intensité des gradients de diffusion ; ADC, coefficient de diffusion apparent.

Pour des valeurs de b plus élevées (> 10000 s/mm²), la diffusion est non gaussienne dans le milieu biologique. Dans ce cas, le calcul de l'ADC dévie du modèle mono-exponentiel et d'autres modélisations de l'atténuation sont utilisées (Yablonskiy and Sukstanskii 2010).

Dans le cas de ces travaux de thèse, la valeur de l'ADC est mesurée à partir de valeur de b comprise entre 0 et 6000 s/mm² dans chaque direction (x , y et z) et permettra d'obtenir la valeur de l'ADC moyen (Cf. Eq. 1.11., p.27) pour chaque métabolite quantifiable.

Bibliographie 1^{ère} partie

- Alexander A. L., Lee J. E., Lazar M., Field A. S. (2007) Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **4**, 316–329.
- Allen P. J. (2012) Creatine metabolism and psychiatric disorders: Does creatine supplementation have therapeutic value? *Neurosci. Biobehav. Rev.* **36**, 1442–1462.
- Barantin L., Pape A. Le, Akoka S. (1997) A new method for absolute quantitation of MRS metabolites. *Magn. Reson. Med.* **38**, 179–182.
- Basser P. J., Pierpaoli C. (1996) Microstructural and physiological features of tissues elucidated by quantitative-diffusion-tensor MRI. *J. Magn. Reson. B* **111**, 209–219.
- Berg J. M. (2015) *Biochemistry*. W.H. Freeman & Company, a Macmillan Education Imprint, New York.
- Bihan D. Le (1995) Molecular diffusion, tissue microdynamics and microstructure. *Nmr Biomed.* **8**, 375–386.
- Bulik M., Jancalek R., Vanicek J., Skoch A., Mechl M. (2013) Potential of MR spectroscopy for assessment of glioma grading. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **115**, 146–153.
- Cao P., Wu E. X. (2016) In vivo diffusion MRS investigation of non-water molecules in biological tissues : Diffusion Spectroscopy in Biological Tissues. *Nmr Biomed.*, n/a–n/a.
- Cleary J. O. S. H., Guimaraes A. R. (2014) Magnetic Resonance Imaging, in *Pathobiol. Hum. Dis.*, pp. 3987–4004. Elsevier.
- Corbin I. R., Furth E. E., Pickup S., Siegelman E. S., Delikatny E. J. (2009) In vivo assessment of hepatic triglycerides in murine non-alcoholic fatty liver disease using magnetic resonance spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta Bba - Mol. Cell Biol. Lipids* **1791**, 757–763.
- Coum A. (2015) *Développement de méthodes de SRM à 4,7 T pour l'étude in vivo du métabolisme lipidique chez la souris*. Rennes 1, Rennes.
- Currie S., Hoggard N., Craven I. J., Hadjivassiliou M., Wilkinson I. D. (2013) Understanding MRI: basic MR physics for physicians. *Postgrad. Med. J.* **89**, 209–223.
- Desal H., Pineda Alonso N., Akoka S. (2010) Electronic reference for absolute quantification of brain metabolites by 1H-MRS on clinical whole-body imaging. *J. Neuroradiol.* **37**, 292–297.
- Du F., Cooper A. J., Thida T., Shinn A. K., Cohen B. M., Öngür D. (2013) Myelin and Axon Abnormalities in Schizophrenia Measured with Magnetic Resonance Imaging Techniques. *Biol. Psychiatry* **74**, 451–457.
- Fuhrman S., Palkovits M., Cassidy M., Neale J. H. (1994) The regional distribution of N-acetylaspartylglutamate (NAAG) and peptidase activity against NAAG in the rat nervous system. *J. Neurochem.* **62**, 275–281.
- Glunde K., Bhujwalla Z. M., Ronen S. M. (2011) Choline metabolism in malignant transformation. *Nat. Rev. Cancer.*
- Govindaraju V., Young K., Maudsley A. A. (2000) Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *Nmr Biomed.* **13**, 129–153.
- Graaf R. A. de de (2007) *In vivo NMR spectroscopy: principles and techniques*. Wiley, Chichester.
- Guye M., Ranjeva J., Bartolomei F., Confort-Gouny S., Cozzone P., Chauvel P. (2008) L'IRM de diffusion dans les épilepsies partielles. *Epilepsies*, 81–91.
- Heinzer-Schweizer S., Zanche N. De, Pavan M., Mens G., Sturzenegger U., Henning A., Boesiger P. (2010) In-vivo assessment of tissue metabolite levels using 1H MRS and the Electric REference To access In vivo Concentrations (ERETIC) method. *Nmr Biomed.*, n/a–n/a.

- Helm L., Merbach A. E., Tóth É., eds (2013) *The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging*. John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ.
- Helms G. (2001) Volume correction for edema in single-volume proton MR spectroscopy of contrast-enhancing multiple sclerosis lesions. *Magn. Reson. Med.* **46**, 256–263.
- Helms G. (2008) The principles of quantification applied to in vivo proton MR spectroscopy. *Eur. J. Radiol.* **67**, 218–229.
- Herlidou S. (1999) *Caractérisation tissulaire en irm par l'analyse de texture : étude du tissu musculaire et de tumeurs intracrâniennes*. Rennes 1, Rennes.
- Huang B.-W., Chiang M.-T., Yao H.-T., Chiang W. (2004) The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. *Diabetes Obes. Metab.* **6**, 120–126.
- Jiru F. (2008) Introduction to post-processing techniques. *Eur. J. Radiol.* **67**, 202–217.
- Juchem C., Graaf R. A. de (2017) B 0 magnetic field homogeneity and shimming for in vivo magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Biochem.* **529**, 17–29.
- Kaddah R. O., Khalil M. E. (2016) MR Spectroscopy evaluation of white matter signal abnormalities of different non-neoplastic brain lesions. *Egypt. J. Radiol. Nucl. Med.* **47**, 233–242.
- Kastler B., Anstett P. (2011) *Comprendre l'IRM manuel d'auto-apprentissage*. Elsevier Masson, Issy-les-Moulineaux [France].
- Kendall G. S., Melbourne A., Johnson S., Price D., Bainbridge A., Gunny R., Huertas-Ceballos A., et al. (2014) White Matter NAA/Cho and Cho/Cr Ratios at MR Spectroscopy Are Predictive of Motor Outcome in Preterm Infants. *Radiology* **271**, 230–238.
- Laule C., Vavasour I. M., Moore G. R. W., Oger J., Li D. K. B., Paty D. W., MacKay A. L. (2004) Water content and myelin water fraction in multiple sclerosis. *J. Neurol.* **251**, 284–293.
- Li B. S. Y., Wang H., Gonen O. (2003) Metabolite ratios to assumed stable creatine level may confound the quantification of proton brain MR spectroscopy. *Magn. Reson. Imaging* **21**, 923–928.
- Mandal P. K. (2012) In vivo proton magnetic resonance spectroscopic signal processing for the absolute quantitation of brain metabolites. *Eur. J. Radiol.* **81**, e653–e664.
- Marchadour C., Brouillet E., Hantraye P., Lebon V., Valette J. (2012) Anomalous diffusion of brain metabolites evidenced by diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32**, 2153–2160.
- Martin R. C., Pomerantz J. R. (1978) Visual discrimination of texture. *Percept. Psychophys.* **24**, 420–428.
- Materka A. (2004) Texture analysis methodologies for magnetic resonance imaging. *Dialogues Clin. Neurosci.* **6**, 243–250.
- Munoz Maniega S., Cvorovic V., Armitage P. A., Marshall I., Bastin M. E., Wardlaw J. M. (2008) Choline and Creatine Are Not Reliable Denominators for Calculating Metabolite Ratios in Acute Ischemic Stroke. *Stroke* **39**, 2467–2469.
- Najac C. (2014) *Spectroscopie RMN du 1H pondérée en diffusion, du 13C et du 17O : développements méthodologiques pour l'étude de la structure et de la fonction cellulaire in vivo*. Paris 11.
- Najac C., Branzoli F., Ronen I., Valette J. (2016) Brain intracellular metabolites are freely diffusing along cell fibers in grey and white matter, as measured by diffusion-weighted MR spectroscopy in the human brain at 7 T. *Brain Struct. Funct.* **221**, 1245–1254.
- Naser R. K. A., Hassan A. A. K., Shabana A. M., Omar N. N. (2016) Role of magnetic resonance spectroscopy in grading of primary brain tumors. *Egypt. J. Radiol. Nucl. Med.* **47**, 577–584.

- Nicolay K., Braun K. P. J., Graaf R. A. de, Dijkhuizen R. M., Kruiskamp M. J. (2001) Diffusion NMR spectroscopy. *Nmr Biomed.* **14**, 94–111.
- Pfeuffer J., Tkáč I., Gruetter R. (2000) Extracellular–Intracellular Distribution of Glucose and Lactate in the Rat Brain Assessed Noninvasively by Diffusion-Weighted ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy *In Vivo*. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **20**, 736–746.
- Pfeuffer J., Tkáč I., Provencher S. W., Gruetter R. (1999) Toward an in Vivo Neurochemical Profile: Quantification of 18 Metabolites in Short-Echo-Time 1H NMR Spectra of the Rat Brain. *J. Magn. Reson.* **141**, 104–120.
- Pouwels P. J., Frahm J. (1997) Differential distribution of NAA and NAAG in human brain as determined by quantitative localized proton MRS. *Nmr Biomed.* **10**, 73–78.
- Pouwels P. J., Frahm J. (1998) Regional metabolite concentrations in human brain as determined by quantitative localized proton MRS. *Magn. Reson. Med.* **39**, 53–60.
- Provencher S. W. (1993) Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn. Reson. Med.* **30**, 672–679.
- Ramamonjisoa N., Ratiney H., Mutel E., Guillou H., Mithieux G., Pilleul F., Rajas F., Beuf O., Cavassila S. (2013) In vivo hepatic lipid quantification using MRS at 7 Tesla in a mouse model of glycogen storage disease type 1a. *J. Lipid Res.* **54**, 2010–2022.
- Ratai E.-M., Annamalai L., Burdo T., Joo C.-G., Bombardier J. P., Fell R., Hakimelahi R., *et al.* (2011) Brain creatine elevation and N-acetylaspartate reduction indicates neuronal dysfunction in the setting of enhanced glial energy metabolism in a macaque model of NeuroAIDS. *Magn. Reson. Med.* **66**, 625–634.
- Ratiney H., Sdika M., Coenradie Y., Cavassila S., Ormond D. van, Graveron-Demilly D. (2005) Time-domain semi-parametric estimation based on a metabolite basis set. *Nmr Biomed.* **18**, 1–13.
- Rigotti D. J., Inglese M., Gonen O. (2007) Whole-Brain N-Acetylaspartate as a Surrogate Marker of Neuronal Damage in Diffuse Neurologic Disorders. *Am. J. Neuroradiol.* **28**, 1843–1849.
- Ronen I., Valette J. (2015) Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Spectroscopy, in *eMagRes*, (Harris R. K., Wasylishen R. L., eds), pp. 733–750. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Saunders D. E., Howe F. A., Boogaart A. van den, Griffiths J. R., Brown M. M. (1999) Aging of the adult human brain: in vivo quantitation of metabolite content with proton magnetic resonance spectroscopy. *J. Magn. Reson. Imaging Jmri* **9**, 711–716.
- Schuff N., Meyerhoff D. J., Mueller S., Chao L., Sacrey D. T., Laxer K., Weiner M. W. (2006) N-Acetylaspartate as a Marker of Neuronal Injury in Neurodegenerative Disease, in *N-Acetylaspartate*, (Moffett J. R., Tieman S. B., Weinberger D. R., Coyle J. T., Namboodiri A. M. A., eds), Vol. 576, pp. 241–262. Springer US.
- Soher B. J., Young K., Bernstein A., Aygula Z., Maudsley A. A. (2007) GAVA: Spectral simulation for in vivo MRS applications. *J. Magn. Reson.* **185**, 291–299.
- Starčuk Z., Starčuková J., Štrbák O., Graveron-Demilly D. (2009) Simulation of coupled-spin systems in the steady-state free-precession acquisition mode for fast magnetic resonance (MR) spectroscopic imaging. *Meas. Sci. Technol.* **20**, 104033.
- Stejskal E. O., Tanner J. E. (1965) Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *J. Chem. Phys.* **42**, 288–292.
- Sullivan E. V., Pfefferbaum A. (2006) Diffusion tensor imaging and aging. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **30**, 749–761.
- Szczypiński P. M., Strzelecki M., Materka A., Klepaczko A. (2009) MaZda—A software package for image texture analysis. *Comput. Methods Programs Biomed.* **94**, 66–76.
- Tkáč I., Rao R., Georgieff M. K., Gruetter R. (2003) Developmental and regional changes in the neurochemical profile of the rat brain determined by in vivo ¹H NMR

- spectroscopy: Developmental Changes in Neurochemical Profile. *Magn. Reson. Med.* **50**, 24–32.
- Valette J., Giraudeau C., Marchadour C., Djemai B., Geffroy F., Ghaly M. A., Bihan D. Le, Hantraye P., Lebon V., Lethimonnier F. (2012) A new sequence for single-shot diffusion-weighted NMR spectroscopy by the trace of the diffusion tensor. *Magn. Reson. Med.* **68**, 1705–1712.
- Vanhamme null, Boogaart A null van den, Huffel S null Van (1997) Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *J. Magn. Reson. San Diego Calif 1997* **129**, 35–43.
- Wang Q., Zhang H., Zhang J., Wu C., Zhu W., Li F., Chen X., Xu B. (2016) The diagnostic performance of magnetic resonance spectroscopy in differentiating high-from low-grade gliomas: A systematic review and meta-analysis. *Eur. Radiol.* **26**, 2670–2684.
- Werven J. R. van, Marsman H. A., Nederveen A. J., Kate F. J. ten, Gulik T. M. van, Stoker J. (2012) Hepatic lipid composition analysis using 3.0-T MR spectroscopy in a steatotic rat model. *Magn. Reson. Imaging* **30**, 112–121.
- Wick M., Nagatomo Y., Prielmeier F., Frahm J. (1995) Alteration of Intracellular Metabolite Diffusion in Rat Brain In Vivo During Ischemia and Reperfusion. *Stroke* **26**, 1930–1934.
- Xin L., Tkáč I. (2017) A practical guide to in vivo proton magnetic resonance spectroscopy at high magnetic fields. *Anal. Biochem.* **529**, 30–39.
- Yablonskiy D. A., Sukstanskii A. L. (2010) Theoretical models of the diffusion weighted MR signal. *Nmr Biomed.* **23**, 661–681.
- Yerli H., Ağildere A. M., Ozen O., Geyik E., Atalay B., Elhan A. H. (2007) Evaluation of cerebral glioma grade by using normal side creatine as an internal reference in multi-voxel 1H-MR spectroscopy. *Diagn. Interv. Radiol. Ank. Turk.* **13**, 3–9.

**2^{ème} Partie : Evaluation des
injections répétées d'un agent de
contraste à base de gadolinium au
niveau cérébral**

Chapitre 3 : Les agents de contraste à base de gadolinium en IRM et leur accumulation dans le cerveau

3.1. Les agents de contraste en IRM

3.1.1. Principe de base des agents de contraste

L'IRM a pour avantage de posséder une excellente résolution spatiale et de distinguer les tissus mous. Cependant, l'utilisation des agents de contraste apparaît nécessaire lorsque le contraste observé est insuffisant pour réaliser un diagnostic médical précis. Le but des agents de contraste est d'accélérer la relaxation des protons de l'eau dans le tissu environnant et cela se traduit par une diminution des temps de relaxation T1 et T2 (Helm, Merbach, and Tóth 2013).

Les agents de contraste sont caractérisés par : (i) leurs propriétés intrinsèques telles que leurs propriétés magnétiques (paramagnétiques, superparamagnétiques et diamagnétiques) et leurs structures chimiques ; (ii) leur biodistribution et leurs applications ; (iii) les effets sur l'image (T1, T2) (Geraldès and Laurent 2009).

Dans le cadre de ces travaux de thèse, il a été porté un intérêt particulier pour les agents paramagnétiques à base de gadolinium qui sont les plus fréquemment utilisés en routine clinique. En effet, ils ont été injectés par voie intraveineuse chez plus de 100 millions de patients lors des 29 dernières années et ils sont prescrits à hauteur de 30-45% des examens IRM cliniques (Hao et al. 2012; Kanal 2016).

Les agents de contraste paramagnétiques sont principalement des agents de contraste positifs (ou agent T1). Ce sont des métaux lourds appartenant aux lanthanides tels que le gadolinium (Gd^{3+}) et le manganèse (Mn^{2+}). Ils possèdent des électrons non appariés (7 e^- pour le Gd^{3+} et 5 e^- pour le Mn^{2+}) qui leur confèrent un moment magnétique élevé.

Cela résulte en une augmentation de la vitesse de relaxation longitudinale R1 ($1/T1$) et transversale R2 ($1/T2$) dans le milieu environnant. Cela peut être décrit par l'équation 3.1, la vitesse de relaxation du milieu observé est la somme du terme diamagnétique ($T_{i,d}$) qui correspond à la vitesse de relaxation de l'eau en absence d'agent de contraste paramagnétique et du terme paramagnétique ($T_{i,p}$) décrivant l'augmentation de la vitesse de relaxation induit par l'agent de contraste.

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,d}} + \frac{1}{T_{i,p}} \quad [3.1]$$

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

L'efficacité des agents de contraste paramagnétiques est défini par leur relaxivité, c'est-à-dire le changement dans leur vitesse de relaxation proportionnellement à la concentration de l'agent de contraste (**Eq. 3.2**) (Shokrollahi 2013; Helm, Merbach, and Tóth 2013).

$$\frac{1}{T_{i,p}} = r_i [Gd] \quad [3.2]$$

Avec r_i , la relaxivité en $mM^{-1}.s^{-1}$; $[Gd]$, la concentration de gadolinium en $mmol.kg^{-1}$.

L'augmentation de la vitesse de relaxation induit par les agents de contraste paramagnétiques dans le milieu environnant conduit à une réduction des temps de relaxation longitudinal (T1) et transversal (T2). Par conséquent, cela se traduit par un rehaussement du signal sur les images pondérées en T1.

3.1.2. Les agents de contraste à base de gadolinium

Le gadolinium sous sa forme libre est toxique dans les systèmes biologiques. Compte tenu que les ions Gd^{3+} ont la même taille que les ions calcium Ca^{2+} , ils peuvent entrer en compétition et inhiber les canaux calciques (Sherry, Caravan, and Lenkinski 2009). De plus, le gadolinium libre peut causer une dégénération splénique, une nécrose des lobules hépatiques centraux, une diminution des plaquettes et une augmentation du temps de coagulation (Idée et al. 2009). Les ions Gd^{3+} peuvent également s'accumuler dans les os, le foie et la rate (Wedeking, Kumar, and Tweedle 1993).

Pour éviter cette toxicité en routine clinique et dans les expériences précliniques, le gadolinium doit être chélaté. La chélation est réalisée à l'aide de ligands linéaires ou macrocycliques de polyaminocarboxylate (**Fig. 3.1**). Cela va augmenter la stabilité des ions Gd^{3+} en termes de cinétique et de thermodynamique. Cette famille de molécules est appelée les agents de contraste à base de gadolinium (gadolinium based contrast agent ; GBCA).

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

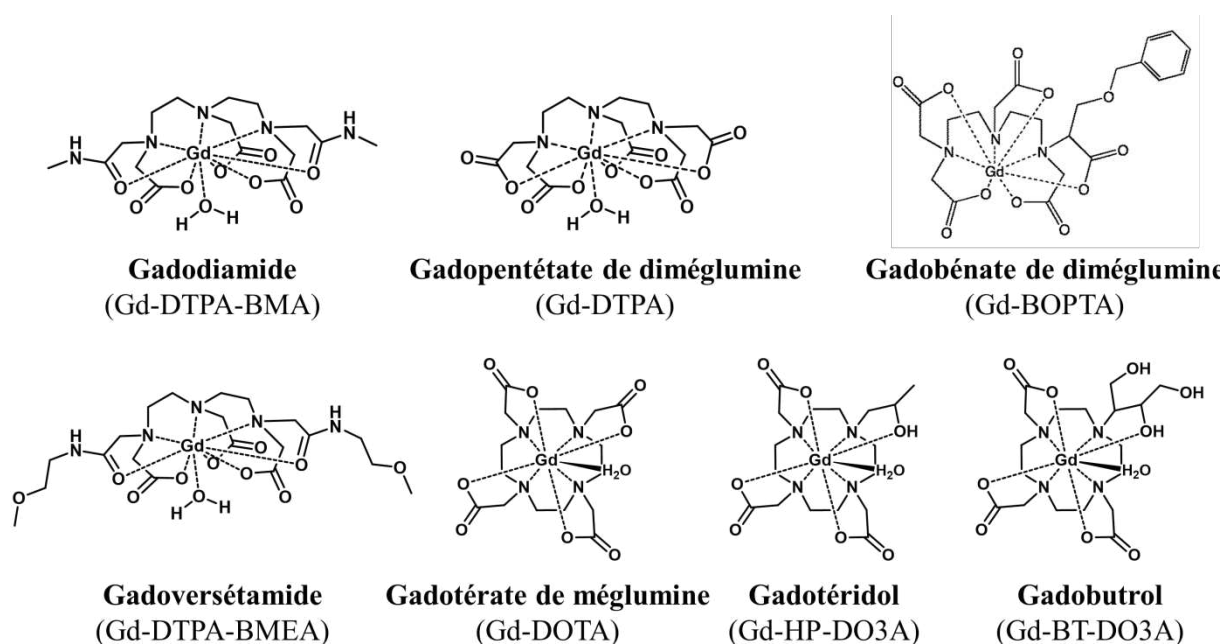


Figure 3.1 : Les agents de contraste à base de gadolinium

(d'après Geraldès and Laurent 2009)

Les GBCA sont des composés macrocycliques ou linéaires, ioniques ou neutres (**Tableau 3.1**). Les agents ioniques sont des sels de méglumine chargés négativement, ce qui leur confère une légère hyperosmolarité par rapport au sang. Par comparaison, les agents neutres ne sont pas chargés et perturbent peu l'osmolarité du sang. Du fait de leurs faibles potentiels de déchélation, les composés macrocycliques ont montré une meilleure stabilité que les composés linéaires (Tedeschi et al. 2017).

Les GBCA sont des agents de contraste non-spécifiques c'est-à-dire qu'ils n'interagissent pas avec un type cellulaire particulier. Lors de leurs injections, ce sont des agents de faible poids moléculaire (<1000 Da) qui vont être présents dans les fluides extracellulaires, ainsi ils s'équilibrent rapidement entre les espaces intravasculaires et interstitiels (Mitsumori et al. 2014; Geraldès and Laurent 2009). Les GBCA sont rapidement éliminés de l'espace intravasculaire par excrétion rénale (90% éliminé dans les 12 heures) (Aime and Caravan 2009). Il est à noter que la demi-vie d'excrétion des GBCA chez le rat sain (20 min) est notablement plus courte que chez l'Homme (1,5 heure), ceci est lié à la filtration glomérulaire plus élevée chez les rats (Oksendal and Hals 1993).

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

Tableau 3.1 : Caractéristiques des agents de contraste à base de gadolinium commercialisés (d'après Tedeschi et al. 2017)

Nom générique	Gadodiamide (Gd-DTPA-BMA)	Gadopentétate de diméglumine (Gd-DTPA)	Gadobénate de diméglumine (Gd-BOPTA)	Gadoversétamide (Gd-DTPA-BMEA)	Gadotérate de méglumine (Gd-DOTA)	Gadotéridol (Gd-HP-DO3A)	Gadobutrol (Gd-BT-DO3A)
Nom commercial	Omniscan [®]	Magnevist [®]	MultiHance [®]	OptiMARK [®]	Dotarem [®]	Prohance [®]	Gadovist [®]
Entreprise	GE Healthcare	Bayer Schering Pharma AG	Bracco SpA	Mallinckrodt	Guerbet	Bracco SpA	Bayer Schering Pharma AG
Structure	linéaire	linéaire	linéaire	linéaire	macrocyclique	macrocyclique	macrocyclique
Ionicité	neutre	ionique	ionique	neutre	ionique	neutre	neutre
Stabilité	faible	intermédiaire	intermédiaire	faible	élevée	élevée	élevée (cinétique) et faible (thermodynamique)
Clairance	rénale	rénale	96% rénale 4% hépatique	rénale	rénale	rénale	rénale
Relaxivité R1 à 1,5T	4,3	3,9-4,1	6,3-7,9	4,7	3,6	4,1	4,7-5,2
Relaxivité R1 à 3T	4,0	3,7-3,9	5,5-5,9	4,5	3,5	3,7	4,5-5,0

Les GBCA ont un large champ d'applications pour la surveillance des traitements et le diagnostic de nombreuses maladies incluant les pathologies neurologiques, cardiaques, hépatiques et cancéreuses chez les adultes et chez les enfants.

Par exemple, le tissu tumoral présente une vascularisation plus importante en comparaison du tissu sain conduisant à une prise des agents de contraste plus élevée et résultant à une intensité du signal plus élevée sur les images IRM. Sur une image pondérée en T1, un hypersignal est lié à la réduction de l'effet T1 (voir revue : Mitsumori et al. 2014).

3.2. L'accumulation des agents de contraste à base de gadolinium dans l'organisme

3.2.1. Les effets indésirables connus

Les agents de contraste à base de gadolinium sont considérés comme une classe de produits pharmaceutiques très sûre avec une incidence des effets indésirables de l'ordre de 1-2%. Après injection de GBCA, il a été rapporté de rares symptômes tels que des nausées, des vomissements, des sensations de chaleur et de douleur au site d'injection, des maux de tête, des paresthésies, des vertiges et des urticaires (Balzer 2006).

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

Depuis 2006, la fibrose néphrogénique systémique (Nephrogenic systemic fibrosis ; NSF) a émergé comme un problème de santé publique chez les patients présentant une déficience rénale sévère. La NSF a été mise en lien avec des injections de GBCA linéaires (gadodiamide et gadopentétate de diméglumine) (Weinreb and Kuo 2009). La transmétallation (échange de deux ligands entre deux centres métalliques) avec le zinc ou le cuivre semble conduire au dépôt de sels de gadolinium dans le liquide interstitiel à l'origine de la fibrose systémique (High et al. 2007). La mise en place d'un bilan du débit de filtration glomérulaire a été imposée comme prérequis aux examens IRM, ce qui a fait considérablement diminuer l'incidence de la NSF (Weller, Barber, and Olsen 2014).

Néanmoins, les études cliniques chez des patients avec des fonctions rénales normales (débit de filtration glomérulaire >60 ml/min/1,73 m²) ont mis en évidence une accumulation 2,5 fois plus élevée dans les os suite à des injections de gadodiamide par rapport au GBCA macrocyclique gadotéridol (Gibby 2004). Le gadolinium a également été détecté dans la peau de patients ne présentant pas de NSF (Christensen et al. 2011; Murata et al. 2016).

3.2.2. Accumulation du gadolinium au niveau cérébral

Les GBCA ne sont pas supposés entrer dans le cerveau excepté lorsque la barrière hémato-encéphalique est altérée. C'est notamment le cas chez les patients présentant des tumeurs intracrâniennes, une sclérose en plaque, une inflammation ou lors de la radiothérapie (Kasahara et al. 2011; Errante et al. 2014; Quattrocchi et al. 2015).

3.2.2.1. Mesure de l'hypersignal en IRM

Le suivi longitudinal des pathologies et des traitements nécessitent des injections à chaque examen. En 2014, il a été montré pour la première fois la présence d'un hypersignal sur des images pondérées en T1 dans des structures de la matière grise (les noyaux dentelés cérébelleux et le globus pallidus) suite aux injections répétées de GBCA linéaires (gadopentétate de diméglumine et/ou gadodiamide) chez des patients avec une fonction rénale normale (Kanda et al. 2014). Sur la **figure 3.2**, il peut être observé les images pondérées en T1 avec les régions d'intérêt utilisées pour mesurer l'hyperintensité : ratio de l'intensité du signal du globus pallidus sur celui du thalamus et ratio de l'intensité du signal des noyaux dentelés cérébelleux sur celui du pont du tronc cérébral.

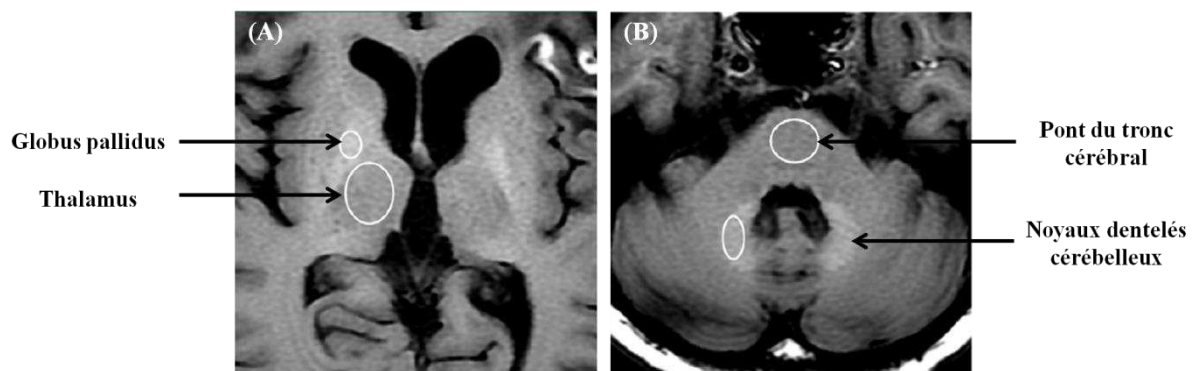


Figure 3.2 : Rehaussement du signal dans le globus pallidus et les noyaux dentelés cérébelleux sur une image pondérée en T1 sans agent de contraste.

(issue de Kanda et al. 2014)

Ce résultat a été confirmé par d'autres études montrant une augmentation du signal dans le globus pallidus et les noyaux dentelés cérébelleux sur des images pondérées en T1 acquises sans agent de contraste. Cette hausse du signal a été corrélée à un minimum de 6 injections intraveineuses de GBCA linéaires (0,1 mmol/kg de gadopentétate de diméglumine et/ou gadodiamide) reçues par les patients. Tous les patients examinés n'avaient pas de déficiences hépatique et rénale mais présentaient des métastases cérébrales, des méningiomes, des scléroses en plaques ou ils avaient reçu un traitement par radiothérapie (Errante et al. 2014; Quattrocchi et al. 2015; Ramalho et al. 2015; Schlemm et al. 2017).

Parmi les GBCA linéaires, des disparités ont été rapportées dans les résultats de la littérature pour le gadobénate de diméglumine. En effet, il a été montré que les injections répétées de gadobénate de diméglumine induisent soit une augmentation du signal dans les noyaux dentelés cérébelleux (Weberling et al. 2015) ou aucune variation (Ramalho et al. 2015).

En comparaison avec les GBCA linéaires, aucune hausse du signal n'a été rapportée chez les patients lors d'administrations répétées de GBCA macrocycliques tels que le gadobutrol, gadotéridol, gadotérate de méglumine (Kanda, Osawa, et al. 2015; Cao et al. 2016; Yoo et al. 2017; Bae et al. 2017; Radbruch et al. 2015). Le gadotéridol semble néanmoins induire une élévation du signal dans les noyaux dentelés cérébelleux lors d'administrations rapprochées chez les patients atteints de scléroses en plaques cycliques (Stojanov et al. 2016).

Ces observations cliniques ont pu être confirmées dans un modèle de rongeurs d'injections répétées de GBCA linéaires avec 20 injections de 0,6 mmol/kg réparties sur une période de 5 semaines. Il a été mis en évidence que ces injections répétées des agents de contraste linéaires (gadodiamide, gadopentétate de diméglumine et gadobénate de diméglumine) induisent un

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

hypersignal dans les noyaux cérébelleux profonds (NCP) chez les rats sains alors que ce n'est pas le cas pour le GBCA macrocyclique (gadotérate de méglumine) (Robert et al. 2015, 2016). Cette hausse induite par le GBCA linéaire (gadodiamide) est accentuée chez les rats présentant une légère déficience rénale (Rasschaert et al. 2017).

3.2.2.2. Variation de la vitesse de relaxation R1

Les injections répétées de GBCA linéaires (gadopentétate de diméglumine) chez l'Homme ont été corrélées à une diminution des valeurs de T1 dans les structures de la matière grise (noyaux dentelés cérébelleux, globus pallidus et thalamus) en comparaison à celles de la substance blanche (Kuno et al. 2017).

La vitesse de relaxation R1 ($1/T1$) a été corrélée avec le nombre d'injections de gadopentétate de diméglumine dans les noyaux dentelés cérébelleux chez l'Homme et cela sans variation de R2* ($1/T2^*$) (Tedeschi et al. 2016). Aucune variation de T1 n'est observable chez les patients ayant reçu des injections répétées de GBCA macrocycliques (gadobutrol) (Müller et al. 2017).

Chez les rongeurs, une augmentation de R1 a été mesurée pour les GBCA linéaires (gadodiamide, gadobénate de diméglumine, gadopentétate de diméglumine) dans les noyaux cérébelleux profonds (Robert et al. 2016).

Ces données de mesure du T1 sont cohérentes avec l'augmentation de l'intensité du signal sur les images pondérées en T1, il apparaît que la présence des GBCA linéaires dans ces structures cérébrales conduit à l'augmentation de la relaxivité des protons de l'eau.

3.2.2.3. Mesure du dépôt de gadolinium dans le cervelet par ICP-MS

Plusieurs études ont montré un lien direct entre l'hypersignal dans le tissu cérébral et le dépôt de gadolinium à l'aide de la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (inductively coupled plasma mass spectrometry ; ICP-MS) sur des tissus cérébraux prélevés post-mortem ou par résection.

Il a été détecté des quantités non-négligeables de gadolinium dans le noyau dentelé cérébelleux (0,067 à 2,1 $\mu\text{g/g}$) et le globus pallidus (0,027 à 0,78 $\mu\text{g/g}$) associées à l'administration répétée de GBCA linéaires (entre 1 à 4 injections de gadodiamide et/ou gadopentétate de diméglumine) chez des patients sans insuffisance rénale (Kanda, Fukusato, et al. 2015). Le dépôt de gadolinium au sein des noyaux dentelés cérébelleux et le globus pallidus (0,1 à 58,8 $\mu\text{g/g}$) a été corrélé avec l'hypersignal des images pondérées en T1 chez

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

des patients avec des fonctions rénales normales après des injections de GBCA linéaires (entre 4 et 29 doses de gadodiamide soit entre 52 et 420 mL) (McDonald et al. 2015). De manière moindre que les GBCA linéaires, des dépôts des GBCA macrocycliques ont été retrouvés dans les noyaux dentelés cérébelleux et le globus pallidus (gadobutrol : 0,111 à 1,070 µg/g ; gadotéridol : 0,004 à 0,078 µg/g) chez des patients avec des fonctions rénales normales après 1 à 11 injections (soit 5 à 126 mL) (Murata et al. 2016).

Le dépôt de gadolinium a également été détecté au niveau cérébral chez des rats exposés à une dose cumulée de 12 mmol/kg de GBCA linéaires (gadodiamide : 2,49 ng/g ; gadopentétate de diméglumine : 1,40 ng/g). Le dépôt de gadolinium au niveau cérébral induit par les administrations répétées de gadodiamide diminue de 50% au bout de 20 semaines post-injections (A. P. L. Smith et al. 2017). Une concentration de gadolinium 4 à 14 fois plus élevée a été mesurée pour les GBCA linéaires (gadodiamide : 3,75 nmol/g, gadopentétate de diméglumine : 1,67 nmol/g, gadobénate de diméglumine : 1,21 nmol/g) en comparaison à un GBCA macrocyclique (gadotérate de méglumine : 0,27 nmol/g) dans le cervelet de rats ayant reçu une dose cumulée de 12 mmol/kg (Robert et al. 2016).

De manière similaire, une concentration 15 fois plus élevée pour les GBCA linéaires (gadodiamide : 11,1 nmol/g ; gadopentétate de diméglumine : 13,1 nmol/g) que les GBCA macrocycliques (gadobutrol : 0,7 nmol/g; gadotéridol : 0,5 nmol/g) a été mesurée sur l'ensemble du cerveau chez les rats ayant reçu une dose totale de 50 mmol/kg sur 4 semaines. A l'aide de la caractérisation spatiale par la méthode ICP-MS couplée à l'ablation laser (LA-ICP-MS), de fortes concentrations de gadolinium ont été détectées dans les noyaux cérébelleux profonds ainsi que dans la couche granulaire du cortex cérébelleux (Lohrke et al. 2017).

Au regard de la littérature chez l'Homme et chez les rongeurs, le dépôt de GBCA linéaires détecté au niveau cérébelleux par ICP-MS semble augmenter avec la dose administrée. Il apparaît que l'absence de l'hypersignal ou de la réduction du T1 ne constituent pas une preuve à part entière que l'accumulation de gadolinium au niveau cérébral n'ait pas lieu. De plus, le gadolinium pourrait être présent dans une forme magnétiquement inerte (e.g. insoluble) ou à de très faibles concentrations (Tedeschi et al. 2017).

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

3.2.2.4. Histologie

L'accumulation de gadolinium lors des injections répétées de GBCA linéaires au niveau cérébral a été examinée par histologie. La microscopie électronique à transmission a mis en évidence un dépôt de gadolinium dans l'endothélium des capillaires sanguins chez les patients ayant reçu des injections répétées de gadodiamide. Il a été mesuré que 18-42% du gadolinium injecté a traversé la barrière hémato-encéphalique non lésée pour s'accumuler dans le tissu neuronal interstitiel (McDonald et al. 2015). Malgré le dépôt de gadolinium observable par McDonald et al. (2015), aucune modification structurale n'a été observée sur les coupes de cerveau colorées à l'hématoxyline éosine.

Comme chez l'Homme, un dépôt de gadodiamide a été observé au niveau de micro-vaisseaux cérébraux chez les rats par microscopie électronique à transmission (Lohrke et al. 2017). Chez les rats, aucune modification histologique du cervelet n'a été observée par coloration à l'hématoxyline éosine ou par les marqueurs des neurones (coloration de Nissl), des astrocytes (GFAP) et de la microglie (Iba1) lors d'injections répétées de GBCA linéaires et macrocycliques (A. P. L. Smith et al. 2017; Lohrke et al. 2017).

3.2.2.5. Hypothèses de mécanismes de l'accumulation du gadolinium

Les GBCA ne sont pas supposés passer la barrière hémato-encéphalique. Trois grandes hypothèses de mécanismes liés à l'accumulation des GBCA ont été rapportées dans la littérature : (i) déchélation et transmétallation des GBCA ; (ii) transports à travers la barrière hémato-encéphalique ou (iii) le passage par le système glymphatique.

(1) Déchélation et transmétallation des GBCA : Le dépôt de gadolinium au niveau cérébral pourrait être lié à la dissociation du GBCA accumulé. Frenzel et al. (2008) ont montré la libération de gadolinium après 15 jours dans le sérum humain à un pH de 7,4 et 37°C pour les GBCA linéaires (gadodiamide : 20% ; gadoversétamide : 21%) et de manière moindre pour les GBCA macrocycliques (<0,1% pour gadobutrol, gadotéridol et gadotérate de méglumine). La probabilité pour que les GBCA se dissocient est liée à leur inertie cinétique et leur stabilité thermodynamique, ce qui pourrait expliquer les différences d'accumulation au niveau cérébral entre les GBCA macrocycliques et linéaires (Idée et al. 2009).

Il est à noter que le gadolinium doit être sous une forme soluble pour réduire le T1. Après déchélation, le gadolinium soluble pourrait donc se lier à des macromolécules (e.g. protéines ou peptides) par transmétallation avec les métaux cérébraux (Errante et al. 2014). Il a été

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

démontré que des réactions peuvent avoir lieu avec les métaux avec une forte affinité pour les ligands de chélation du gadolinium (zinc, cuivre ou fer). Les GBCA peuvent être décomplexés par le phosphate et le carbonate (composés avec une affinité élevée pour le gadolinium) (Puttagunta, Gibby, and Smith 1996; Idée et al. 2009; Greenberg 2010).

La quantification par ICP-MS ne permet pas d'identifier sous quelle forme le dépôt cérébral de gadolinium a lieu (gadolinium libre ou chélaté) (Kanda, Fukusato, et al. 2015). A partir des extraits de cerveaux de rats ayant reçu des injections répétées de GBCA linéaires, Frenzel et al. (2017) ont montré que les GBCA linéaires étaient présents sous forme insoluble ou liés à des macromolécules solubles.

(2) Transports à travers la barrière hémato-encéphalique : Des dépôts de gadolinium ont été détectés au niveau de l'endothélium des capillaires sanguins et le tissu neuronal alors qu'aucune altération de la barrière hémato-encéphalique n'est visible en histologie (McDonald et al. 2015). Il a été supposé que les GBCA déchélatés seraient capables de passer la barrière hémato-encéphalique par l'interface capillaire des noyaux dentelés cérébelleux et cela serait accentué par les expositions répétées (Quattrocchi et al. 2015). Il semble néanmoins peu probable que le gadolinium traverse passivement la barrière hémato-encéphalique. Les mécanismes de transport des métaux (e.g. fer, zinc) pourraient être une piste pour le passage des GBCA à travers la barrière hémato-encéphalique (voir revue : Prybylski et al. 2016).

(3) Passage par le système glymphatique : Il a été également formulé l'hypothèse que les GBCA pourrait passer via le système glymphatique qui correspond à l'échange entre le liquide céphalo-rachidien et le liquide interstitiel. Ce système facilite la clairance de solutés et de déchets issus du cerveau (Aspelund et al. 2015). Iliff et al. (2013) ont mis en évidence que les GBCA se distribuent le long du système glymphatique (de l'artère basale à l'artère olfactive) suite à une injection intracrânienne. De plus, Jost et al. (2017) ont mis en évidence que les GBCA pouvaient s'infiltrer dans le liquide céphalo-rachidien après une injection aigüe (dose : 1,8 mmol/kg de GBCA linéaires et macrocycliques) et ils ont mesuré des concentrations de 18,8 à 27,4 nmol/mL à 4,5 heures post-injection.

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

3.2.3. Conclusion

Les injections répétées d'agents de contraste à base de gadolinium induisent une augmentation de l'intensité du signal sur les images pondérées en T1 et en particulier dans les noyaux dentelés cérébelleux et le globus pallidus. Il a été détecté des dépôts de gadolinium qui semblent être à l'origine de cet hypersignal. Ces observations ont été principalement rapportées pour la catégorie des agents de contraste linéaires (**Tableau 3.2**). De plus, aucun effet au niveau histologique n'a été détecté chez l'Homme ou les rongeurs.

L'agence américaine de sécurité alimentaire et médicamenteuse (Food Drug Administration ; FDA) a tenu un audit public le 8 septembre 2017 statuant sur l'étiquetage obligatoire des GBCA pour signaler le risque d'accumulation au niveau cérébral. Bien que la FDA n'ait pas formulé de restriction concernant l'utilisation des GBCA, elle conseille une utilisation avisée selon les circonstances cliniques compte tenu que les effets toxiques d'une telle accumulation n'ont pas été encore établis chez l'Homme.

Tableau 3.2 : Agents de contraste et dépôt de gadolinium au niveau cérébral
(adapté de Gulani et al. 2017)

Nom générique	Gadodiamide (Gd-DTPA-BMA)	Gadopentétate de diméglumine (Gd-DTPA)	Gadobénate de diméglumine (Gd-BOPTA)	Gadoversétamide (Gd-DTPA-BMEA)	Gadotérate de méglumine (Gd-DOTA)	Gadotéridol (Gd-HP-DO3A)	Gadobutrol (Gd-BT-DO3A)
Nom commercial <i>Entreprise</i>	Omniscan ® <i>GE Healthcare</i>	Magnevist ® <i>Bayer Schering Pharma AG</i>	MultiHance ® <i>Bracco SpA</i>	OptiMARK ® <i>Mallinckrodt</i>	Dotarem ® <i>Guerbet</i>	Prohance ® <i>Bracco SpA</i>	Gadovist ® <i>Bayer Schering Pharma AG</i>
Structure	linéaire	linéaire	linéaire	linéaire	macrocyclique	macrocyclique	macrocyclique
Ionicité	neutre	ionique	ionique	neutre	ionique	neutre	neutre
Stabilité	faible	intermédiaire	intermédiaire	faible	élevée	élevée	élevée (cinétique) et faible (thermodynamique)
Augmentation intensité du signal	Kanda et al. 2014; Errante et al. 2014; McDonald et al. 2015; Ramalho et al. 2015; *Robert et al. 2015; *Robert et al. 2016; Quattrocchi et al. 2015	Kanda et al. 2014; Kanda et al. 2015; Radbruch et al. 2015; *Robert et al. 2015; *Robert et al. 2016; Cao et al. 2016; Schlemm et al. 2017	Ramalho et al. 2016; Weberling et al. 2015; *Robert et al. 2016	-	-	-	Stojanov et al. 2016
Variation T1	*Robert et al. 2016	*Robert et al. 2016; Tedeschi et al. 2016; Kuno et al. 2017	*Robert et al. 2016	-	-	-	-
Déposition gadolinium	McDonald et al. 2015; Kanda et al. 2015; *Smith et al. 2017; *Robert et al. 2016; *Robert et al. 2015; *Robert et al. 2016	Kanda et al. 2015; *Smith et al. 2017; *Robert et al. 2016; *Lohrke et al. 2017	*Robert et al. 2016; Murata et al. 2016	-	*Robert et al. 2016	Kanda et al. 2015; Murata et al. 2016; *Lohrke et al. 2017	Murata et al. 2016; *Lohrke et al. 2017

***Les études ont été réalisées chez les rongeurs.**

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

De nombreuses interrogations sur l'accumulation des GBCA restent en suspens et notamment sur la persistance ou l'atténuation de l'accumulation au niveau cérébral du gadolinium sur le long terme. Chez les rongeurs, il a été précédemment rapporté un hypersignal à 5 semaines post-injections de GBCA linéaires (Robert et al. 2015, 2016) et la présence de gadodiamide à 20 semaines par ICP-MS (A. P. L. Smith et al. 2017).

Afin d'évaluer la persistance de l'hypersignal à très long terme, nous avons réalisé un suivi longitudinal du signal en IRM 1 an après la fin des injections cumulatives de gadodiamide chez le rat. De plus, les implications biologiques de l'accumulation de gadolinium restent inconnues. Dans le cadre de ces travaux de thèse, il a été proposé d'évaluer si cette accumulation de gadodiamide dans les noyaux cérébelleux profonds pouvait induire des modifications cellulaires (NCP) détectables par ^1H SRM.

Chapitre 4 : Evaluation des injections répétées de gadodiamide dans les noyaux cérébelleux profonds chez le rat

4.1. Matériels et méthodes

4.1.1. Evaluation *in vitro* de l'effet du gadodiamide sur les spectres ¹H

Les effets des agents de contraste à base de gadolinium (GBCA) sur les pics en ¹H SRM étant peu connus, une évaluation *in vitro* a précédé l'étude *in vivo*. En effet, le gadodiamide accumulé dans le cervelet pourrait influencer le signal des métabolites et induire une erreur dans la quantification des spectres ¹H *in vivo*. Il a été vérifié *in vitro* que les pics n'étaient pas altérés qualitativement (largeur des pics) et quantitativement (aire sous les pics) en présence de gadodiamide.

4.1.1.1. Préparation des fantômes

Des tubes fantômes contenant NAA, créatine et choline à une concentration de 10 mM représentatives du cerveau ont été préparés avec ou sans gadodiamide (Omniscan®, GE Healthcare). Le choix des concentrations de gadodiamide testées s'est appuyé sur les concentrations mesurées par ICP-MS au niveau des noyaux cérébelleux profonds chez le rat (Robert et al. 2016).

Trois lots de tubes ont été préparés selon les conditions suivantes (n=3/groupe) : (i) Contrôle (mélange des métabolites dans NaCl 0,9% et dans un gel d'agarose 1%, sans gadodiamide) ; (ii) Gadodiamide 12,5 µM (mélange des métabolites avec 12,5 µM de gadodiamide dans un gel d'agarose 1%) et (iii) Gadodiamide 50 µM (mélange des métabolites avec 50 µM de gadodiamide dans un gel d'agarose 1%).

4.1.1.2. Acquisition ¹H SRM et analyse des spectres

Les acquisitions de résonance magnétique ont été réalisées avec un aimant supraconducteur 7 Tesla Pharmascan 70/16 (Bruker, Wissembourg, France) avec des gradients blindés présentant une amplitude de gradient maximum de 230 mT.m⁻¹ et un diamètre intérieur de 90 mm. Une bobine de transmission et réception de type quadrature avec un diamètre interne de 38 mm a été utilisée.

La séquence Ig-FLASH (Intra-gate Fast Low Angle Shot) a été utilisée pour le placement du voxel en ¹H SRM. La séquence Ig-FLASH pondérée en T1 a été paramétrée avec : TE/TR, 2,3 ms/129 ms ; angle de bascule, 60° ; 2 accumulations ; résolution dans le plan, 59x59 µm²/pixel ; épaisseur de la coupe, 570 µm ; 5 coupes ; temps d'acquisition, 2 min 15 secondes.

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

Les paramètres de la séquence PRESS sont identiques aux expériences *in vivo* : taille voxel, 3 x 2 x 1,5 mm³ ; TE/TR, 16 ms/2775 ms ; 970 accumulations ; bande spectrale, 4006,41 Hz (13,34 ppm) ; 2048 points ; temps d'acquisition, 44 min 52 secondes. Le module de suppression d'eau VAPOR a été utilisé afin de pouvoir observer les métabolites. Le module OVS est activé pour supprimer le signal en dehors du voxel. Une homogénéisation du champ magnétique B₀ de premier et second ordre a été effectuée au sein du voxel.

Les spectres ont été analysés sur TopSpin 3.2 (Bruker, Ettlingen, Germany). Après une transformée de Fourier, une apodisation de 3 Hz a été appliquée. Le résidu de l'eau à 0 ppm a été calibré à $\delta=4.8$ ppm. Une correction manuelle de la phase de zéro et de premier ordre ainsi qu'une correction de la ligne de base de type spline cubique ont été effectuées. Les aires sous les pics (Cr, NAA, Cho) ont été mesurées en utilisant le pic ERETIC digital (Electronic Reference To access In vivo Concentrations ; TopSpin 3.2, Bruker) calibré à 1. Les aires sous les pics sont exprimées en unité arbitraire (U.A.).

4.1.2. Modèle animal des injections répétées

Les traitements ont été réalisés par Véronique Vives et Philippe Robert du département Recherche et Innovation de Guerbet (Aulnay-sous-Bois, France).

Les procédures d'expérimentation animale ont été réalisées en accord avec les recommandations de l'Union Européenne (2010/63/EU) pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire et conformément aux règles d'éthique du ministère français de l'agriculture et de la forêt (service de santé animale et service de protection vétérinaire).

Le modèle des injections cumulatives d'agent de contraste à base de gadolinium a été précédemment décrit (Robert et al. 2015, 2016). Vingt rates Sprague-Dawley (Charles River, L'Arbresle, France) ont été divisées en deux groupes expérimentaux. Les rates du groupe gadodiamide (Omniscan®, GE Healthcare) (n=10) ont reçu 4 injections/semaine de gadodiamide à 0,6 mmol Gd/kg par voie intraveineuse pendant 5 semaines. La dose cumulée pour les 20 injections est de 1,2 mL/kg de gadodiamide. Les rates du groupe contrôle (n=10) ont reçu 20 injections intraveineuses de solution saline (300 mOsm/kg H₂O Gd/kg) avec le même protocole d'injection.

Toutes les injections ont été effectuées sous anesthésie générale (3-3,5% isoflurane). La dose journalière de 0,6 mmol Gd/kg est équivalente à la dose classiquement utilisée chez l'Homme

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

(0,1 mmol Gd/kg) après ajustement au poids corporel comme il a été recommandé par l'agence américaine FDA.

Un suivi longitudinal des rates a été réalisé en IRM et ¹H SRM au mois 0 (M0 ; une semaine après la dernière injection), à M1 (6 semaines post-injections) et M13 (54-55 semaines post-injections). Aux semaines 61-62 post-injections, les animaux ont été sacrifiés et les cerveaux ont été prélevés pour réaliser une analyse histologique (**Fig. 4.1**).

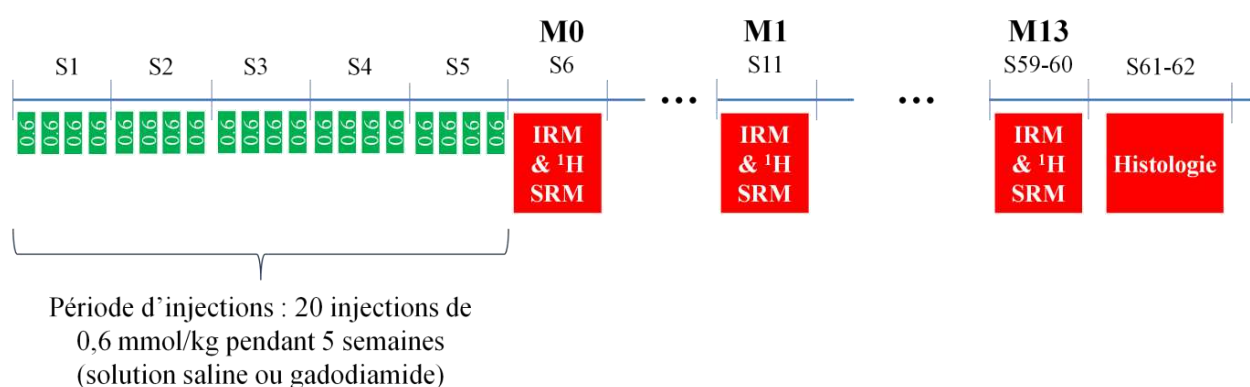


Figure 4.1 : Protocole expérimental des injections répétées de gadodiamide et suivi longitudinal en IRM et ¹H SRM

En parallèle, le suivi des poids des rates a été effectué 4 fois pendant les 5 semaines d'injections puis à M0 (1 semaine post-injections), M1 (6 semaines post-injections), S22 (17 semaines post-injections), S30 (25 semaines post-injections), S38 (33 semaines post-injections) et M13 (54-55 semaines post-injections).

4.1.3. Les expériences IRM et ¹H SRM *in vivo*

Les expériences IRM et ¹H SRM ont été effectuées à M0 (une semaine post-injections), à M1 (6 semaines post-injections) et M13 (54-55 semaines post-injections) avec un aimant supraconducteur 7 Tesla Pharmascan 70/16 (Bruker, Wissembourg, France). Une bobine de transmission et réception de type quadrature avec un diamètre interne de 38 mm a été utilisée.

L'anesthésie des animaux a été induite par inhalation de 2% isoflurane mélangée dans l'air et l'oxygène (ratio 1 :1) et un débit de 0,5 L.min⁻¹. L'anesthésie est stabilisée à 1,5% durant les acquisitions. La température corporelle physiologique des animaux est maintenue à l'intérieur de l'aimant par un système de circulation d'eau chaude. Un capteur de pression est placé au niveau de l'abdomen des animaux afin de surveiller la fréquence respiratoire et de s'assurer de l'efficacité de l'anesthésie.

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

• *IRM*

La séquence Ig-FLASH (Intra-gate Fast Low Angle Shot) pondérée en T1 a été utilisée pour les mesures d'intensité du signal dans les noyaux cérébelleux profonds (NCP), le cortex cérébelleux et le tronc cérébral. A l'aide de ces mesures d'intensité, des ratios (Cf. 4.1.4.1.) ont été calculés pour quantifier l'hypersignal induit par les injections répétées de gadodiamide dans les NCP. La séquence Ig-FLASH a également été utilisée pour le placement du voxel au sein des NCP en ¹H SRM. La séquence Ig-FLASH a été paramétrée avec : TE/TR, 2,3 ms/129 ms ; angle de bascule, 60°; 6 accumulations ; résolution dans le plan, 78x78 $\mu\text{m}^2/\text{pixel}$; épaisseur de la coupe, 570 μm ; 15 coupes ; fréquence respiratoire pour la reconstruction, ~40 cycles/min ; temps d'acquisition, 6 min 38 s.

• ¹H SRM

Le profil métabolique des NCP a été quantifié par ¹H SRM à l'aide d'une séquence PRESS (Point Resolved Spectroscopy) afin de déterminer l'influence des injections cumulatives de gadodiamide. Les paramètres de la séquence PRESS ont été les suivants : taille voxel, 3 x 2 x 1,5 mm³ ; TE/TR, 16 ms/2775 ms ; 970 accumulations ; bande spectrale, 4006,41 Hz (13,34 ppm) ; 2048 points ; temps d'acquisition, 44 min 52 secondes. Le module de suppression d'eau VAPOR a été utilisé afin de pouvoir observer les métabolites cérébraux. Le module de localisation OVS est activé pour supprimer le signal en dehors du voxel. Une homogénéisation du champ magnétique B₀ de premier et second ordre a été effectuée au sein du voxel. Le voxel a été placé de manière systématique dans les NCP de la partie gauche du cervelet en prenant soin d'éviter le tronc cérébral et les lipides sous-cutanés (**Fig. 4.2**).

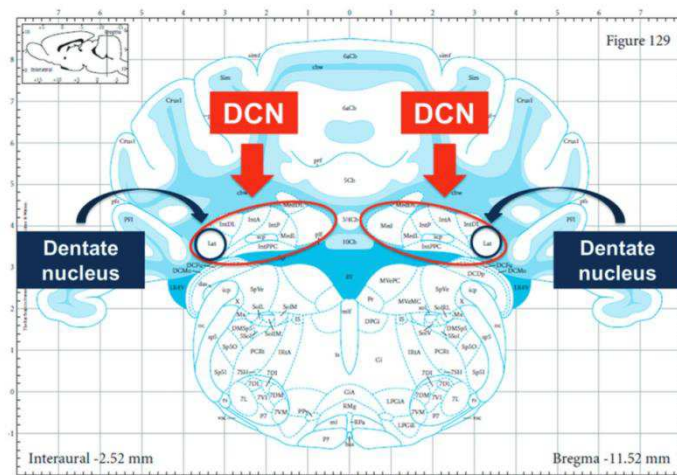


Figure 4.2 : Schéma anatomique du cervelet de rat avec la localisation des noyaux cérébelleux profonds (deep cerebellar nuclei ; DCN) comprenant les noyaux dentelés cérébelleux (dentate nuclei) (issue de Robert et al. 2015).

4.1.4. Analyse des données IRM et ¹H SRM *in vivo*

4.1.4.1. Ratio IRM

Les mesures de l'intensité du signal ont été réalisées dans trois régions d'intérêts (ROI) : les NCP (0,03 cm²), le cortex cérébelleux (0,06 cm²) et le tronc cérébral (0,06 cm²) (**Fig. 4.3**).

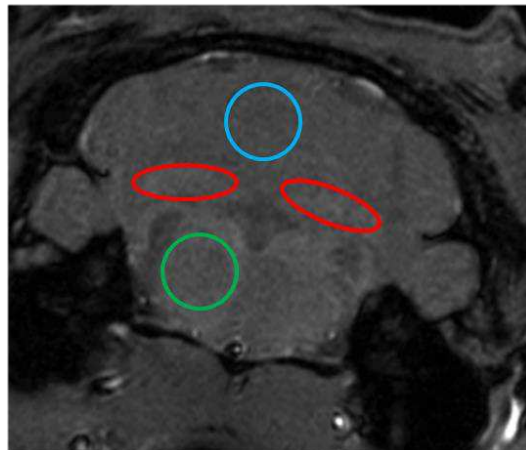


Figure 4.3 : Régions d'intérêts sélectionnées sur les images pondérées en T1 au sein des noyaux cérébelleux profonds (rouge), cortex cérébelleux (bleu) et tronc cérébral (vert).

Le ratio de signal entre NCP et le cortex cérébelleux adjacent a été mesuré pour chaque groupe sur la base de précédentes publications (Robert et al. 2015, 2016). La valeur maximale entre les NCP droit ou gauche a été utilisée pour le calcul des ratios. Selon le positionnement des coupes lors de l'acquisition des images, l'hyperintensité varie entre les NCP droit ou gauche et il est plus ou moins facile à observer.

Le signal des NCP a été également normalisé par le signal du tronc cérébral pour réaliser une quantification similaire aux études cliniques, lesquelles normalisent le signal des NCP par le signal du pont du tronc cérébral (Kanda et al. 2014; Quattrocchi et al. 2015). Une comparaison entre les ratios NCP/cortex cérébelleux et NCP/tronc cérébral a été effectuée.

4.1.4.2. Analyse des données ¹H SRM obtenues dans les NCP par plusieurs méthodes de quantification

Pour rappel, les données ¹H SRM peuvent être analysées soit dans le domaine fréquentiel ou dans le domaine temporel (*Cf. 1^{ère} partie, Chap.2, p.30*). Différents métabolites cérébraux ont été quantifiés dans les NCP : créatine et phosphocréatine (Cr+PCr) ; N-Acetyl Aspartate (NAA) ; choline, phosphocholine et glycérophosphocholine (tCho) ; glutamate (Glu), glutamate+glutamine (Glx), Taurine (Tau) et myo-Inositol (mI).

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

Nous avons proposé d'utiliser la méthode ERETIC digital pour obtenir les concentrations en mM des métabolites. Une comparaison a été réalisée avec les méthodes existantes (LCModel, QUAEST et AMARES) afin de vérifier la robustesse de cette méthode.

(1) ERETIC (Electronic Reference To access In vivo Concentrations):

Les spectres ont été analysés sur TopSpin 3.2 (Bruker, Ettlingen, Germany). Après une transformée de Fourier, une apodisation de 3 Hz a été appliquée. Le résidu de l'eau à 0 ppm a été calibré à $\delta=4.8$ ppm. Une correction manuelle de la phase (zéro et de premier ordre) et une correction de la ligne de base de type spline cubique ont été effectuées. La quantification des pics a été réalisée en mM. La méthode ERETIC consiste en l'ajout d'un pic synthétique préalablement calibré puis ajouté dans le spectre en post-traitement. La calibration est effectuée avec un spectre d'un fantôme avec une concentration connue (1% agarose, 5 mM NAA dans une solution saline isotonique) et avec les mêmes conditions expérimentales que les spectres réalisés *in vivo* au niveau des noyaux cérébelleux profonds. La valeur de référence est obtenue suite à la calibration puis validée *in vitro* avec un fantôme contenant du NAA et de la créatine (1% agarose, 5 mM dans une solution saline isotonique).

(2) LCModel (Linear Combination Model) :

L'analyse par LCModel a été réalisée par Julien Valette (CEA Saclay, France).

LCModel (Provencher 1993) comprend des étapes de post-traitement automatisé (la forme des pics, la correction de la phase et la correction de la ligne de base) afin de minimiser les erreurs opérateurs dépendantes. Les signaux des macromolécules et des lipides ont été inclus dans la correction de la ligne de base par acquisition de spectres de macromolécules (séquence inversion-récupération) obtenues *in vivo* chez trois rates contrôles dans un voxel placé dans les noyaux cérébelleux profonds.

(3) QUEST (Quantitation based on Quantum Estimation) :

Le logiciel CSIapo a été développé par Yann Le Fur (CRMBM, Marseille, France) et Hélène Ratiney (CREATIS – INSA, Lyon, France).

Le logiciel CSIapo sert d'interface pour l'analyse par l'algorithme QUEST (Ratiney et al. 2005). Une base de données des métabolites d'intérêts est générée par simulation *via* GAVA (Gamma Visual Analysis) (Soher et al. 2007) et elle sert pour la modélisation des signaux des métabolites. De plus, les macromolécules peuvent être estimées en réalisant des calculs

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

itératifs sur une partie des points de la FID et à l'ajustant à une base de donnée GAVA spécifique aux macromolécules. Une apodisation de 3 Hz a été appliquée.

(4) AMARES (Advanced Method for Accurate, Robust and Efficient Spectral) :

L'algorithme AMARES (Vanhamme, van den Boogaart A, and Van Huffel S 1997) est utilisé à partir des connaissances préalables sur les métabolites comprenant la liste des pics et leurs largeurs (« damping factor »). AMARES est préprogrammé pour modéliser différentes formes de pics détectés en SRM *in vivo*. Une apodisation de 3 Hz a été appliquée.

4.1.5. Analyse histologique des noyaux cérébelleux profonds à M13

Les sacrifices ont été effectués par Véronique Vives et Philippe Robert du département Recherche et Innovation de Guerbet (Aulnay-sous-Bois, France). L'analyse histologique a été sous-traitée par la société Atlantic Bone Screen (Nantes, France)

Aux semaines 61-62 post-injections, les animaux ont été sacrifiés et les cerveaux ont été prélevés pour réaliser une analyse immunohistochimique. Les échantillons sont ensuite placés dans un milieu OCT (« optimal cutting temperature ») puis plongés dans l'isopentane (-60°C) jusqu'à leur refroidissement complet. Ils sont ensuite stockés à -80°C.

Des coupes de 7 µm d'épaisseur ont été réalisées pour chaque cervelet (n=6/groupe) au niveau des noyaux cérébelleux profonds. Le positionnement de la coupe a été validé sur des coupes colorées au crésyl violet (coloration de Nissl) qui permet de colorer les noyaux et les ribosomes présents dans les corps cellulaires.

Une analyse semi-quantitative par immunofluorescence a été réalisée dans les noyaux cérébelleux profonds à l'aide de trois marqueurs de populations cellulaires présents au niveau du cerveau : synaptophysine (neurones), GFAP (astrocytes) et CD68 (microglie). Une analyse quantitative a été ensuite effectuée pour la mesure de la créatine kinase B (CK-BB) qui est une isoforme spécifique au cytosol des cellules cérébrales pour la régulation des niveaux de l'ATP. Le fluorochrome choisie est Alexa 488.

Les étapes du protocole d'immunohistochimie par marquage indirect sont résumées dans le **tableau 4.1** pour chacun de ces marqueurs. Le marquage indirect consiste à l'ajout d'un anticorps primaire pour détecter la cible puis d'un anticorps secondaire couplé au fluorochrome pour détecter le signal.

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

Tableau 4.1 : Etapes du protocole d'immunohistochimie par marquage indirect
(protocole fourni par Atlantic Bone Screen, Nantes, France)

Etapes	Réactif	Condition
Fixation des coupes	Formaline 4%	10 min à température ambiante
Rinçage	PBS 1x	3 x 5 min
Sérum bloquant	BSA 3% / Sérum de chèvre 10% / PBS 1x	1h à température ambiante
Incubation de l'anticorps primaire	Anti-synaptophysine 1/600 ^{ème} Anti-GFAP 1/1000 ^{ème} Anti-CD68 1/200 ^{ème} Anti-CKBB 1/100 ^{ème}	1h à température ambiante
Rinçage	PBS 1x	3 x 5 min
Anticorps secondaire	Anti-IgG Alexa488 1/500 ^{ème}	1h à température ambiante
Rinçage	PBS 1x	3 x 5 min

A la fin du protocole d'immunohistochimie, les coupes ont été recouvertes avec du DAPI pour un marquage des noyaux des cellules. Les coupes ont été analysées par microscopie à épifluorescence avec les paramètres suivants : filtre FITC (pic d'excitation 495 nm et pic d'émission 521 nm) ; temps d'exposition de 300 ms ; agrandissement x40 ; 1280 x 1024 pixels.

Les marqueurs synaptophysine, GFAP et CD68 ont été évalués sur une échelle de 0 (aucun signal) à 3 (haute densité du signal). Le nombre de particules de CK-BB supérieures à 60 μm^2 et leurs aires ont été calculés.

4.1.6. Analyse statistique

L'analyse de variance (ANOVA ; test non-paramétrique) est effectuée sur les données *in vitro* en ¹H SRM entre les groupes contrôle, gadodiamide 12,5 μM et 50 μM (Kruskall-Wallis with post-hoc Dunn) (GraphPad Prism 5.1). Le test non paramétrique Mann-Whitney est effectué entre les rates des groupes solution saline et gadodiamide pour les données de poids à chaque temps, les mesures d'intensité par IRM, les données ¹H SRM et les mesures de la créatine kinase B (GraphPad Prism 5.1).

4.2. Résultats & conclusions

4.2.1. Etude de l'influence du gadodiamide sur les spectres ¹H

Les effets des agents de contraste à base de gadolinium sur les pics en ¹H SRM étant peu connus, nous avons souhaité vérifier l'effet de l'agent de contraste linéaire neutre gadodiamide sur le signal des métabolites au préalable de l'étude ¹H SRM *in vivo*. La présence de gadodiamide dans le tube pourrait conduire à une réduction des temps de relaxation longitudinal (T1) et transversal (T2). Compte tenu que la largeur à mi-hauteur des pics est égale à 1/T2, cela pourrait conduire à un élargissement des pics et donc à une altération de la qualité spectrale.

Pour cela, des fantômes de gel d'agarose 1% contenant des métabolites présents au niveau cérébral (choline, créatine et NAA) ont été préparés en absence ou en présence de gadodiamide (12,5 µM et 50 µM) (n=3/condition). Le choix des concentrations de gadodiamide a été basé sur les quantités de gadolinium détectées par ICP-MS au niveau cérébelleux lors des injections répétées des agents de contrastes linéaires chez le rat (Robert et al. 2016). Les spectres ont été obtenus dans les mêmes conditions expérimentales que les acquisitions *in vivo* (Fig. 4.4).

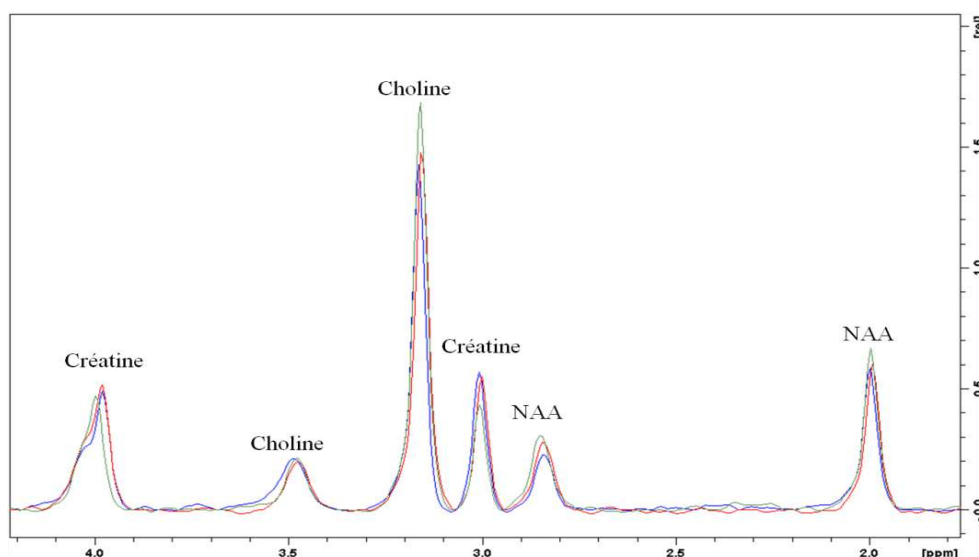


Figure 4.4 : Spectres obtenus par ¹H SRM de fantômes (1% gel d'agarose) contenant 10 mM de choline, NAA et créatine en présence de solution saline (contrôle ; bleu) ou en présence de gadodiamide à 12,5 µM (vert) et 50 µM (rouge).

L'analyse qualitative par superposition des spectres ne met pas en évidence d'élargissement des pics en présence de gadodiamide (12,5 µM ou 50 µM) en comparaison avec le spectre contrôle.

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

Des mesures des aires sous chaque pic ont été effectuées pour quantifier une possible modification induite par le gadodiamide. Les moyennes des aires sous chaque pic sont résumées dans la **figure 4.5**.

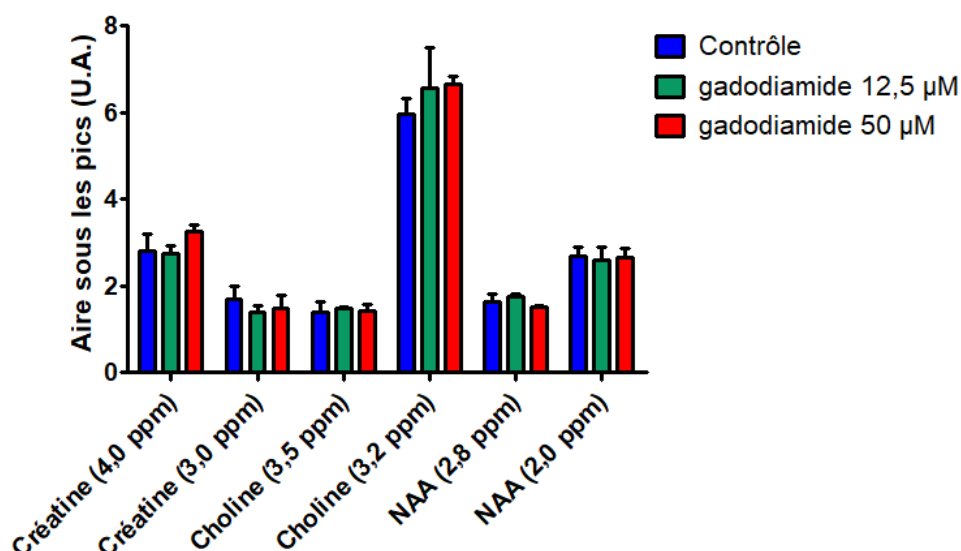


Figure 4.5 : Aire sous les pics (en unité arbitraire) en absence (contrôle) ou en présence de gadodiamide (12,5 µM ou 50 µM). Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM et n=3/groupe.

Par comparaison aux tubes sans gadodiamide, aucune variation des aires sous les pics de NAA, choline et créatine n'a été mesurée en présence de gadodiamide à 12,5 µM ou 50 µM. Pour conclure, le gadodiamide n'altère pas qualitativement ou quantitativement le signal des pics aux concentrations testées.

4.2.2. Suivi sanitaire et des poids des animaux

4.2.2.1. Suivi sanitaire

Toutes les rates ont eu le protocole de 20 injections intraveineuses de 0,6 mmol Gd/kg de gadodiamide ou de solution saline (300 mOsm/kg H₂O Gd/kg) (4 injections/semaine sur une période de 5 semaines) (**Tableau 4.2**). La dose cumulée injectée aux rates est de 1,2 mL/kg de gadodiamide.

Tableau 4.2 : Nombre d'animaux par groupe au cours du temps

n/groupe	M0	M1	M13
Solution saline	10	9	9
Gadodiamide	10	8	6

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

A la fin des acquisitions IRM et ^1H SRM à M0, une seule rate du groupe contrôle est décédée à la suite d'une longue durée d'anesthésie car elle a été utilisée pour la mise au point du protocole.

Après le point M0 en IRM et ^1H SRM, un décès de cause inconnue et un sacrifice pour des raisons éthiques ont eu lieu. Après le point M1 en IRM et ^1H SRM, deux sacrifices éthiques ont été réalisés. La décision des sacrifices a été basée sur la présence de lésions cutanées visibles (**Fig. 4.6**) induisant des douleurs chez les animaux (alopécie, difficulté de déplacement et vocalisation lors de la préhension).



Figure 4.6 : Lésions cutanées visibles chez les rates gadodiamide sacrifiées à M1

4.2.2.2. Suivi des poids

Le suivi des poids des rates a été effectué 4 fois pendant les 5 semaines d'injections puis à M0 (1 semaine post-injections), M1 (6 semaines post-injections), S22 (17 semaines post-injections), S30 (25 semaines post-injections), S38 (33 semaines post-injections) et M13 (54-55 semaines post-injections).

Dans la **figure 4.7**, les courbes des poids des rates du groupe solution saline et gadodiamide sont présentés et les graphes de dispersion à S38 et M13. Les graphes de dispersion représentent les poids de chaque rate au sein du groupe accompagné de la moyenne et de l'écart standard à la moyenne (ESM). Il peut être noté qu'une rate au sein de chaque groupe (gadodiamide et solution saline) présente une valeur de poids différente à S38 et M13.

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

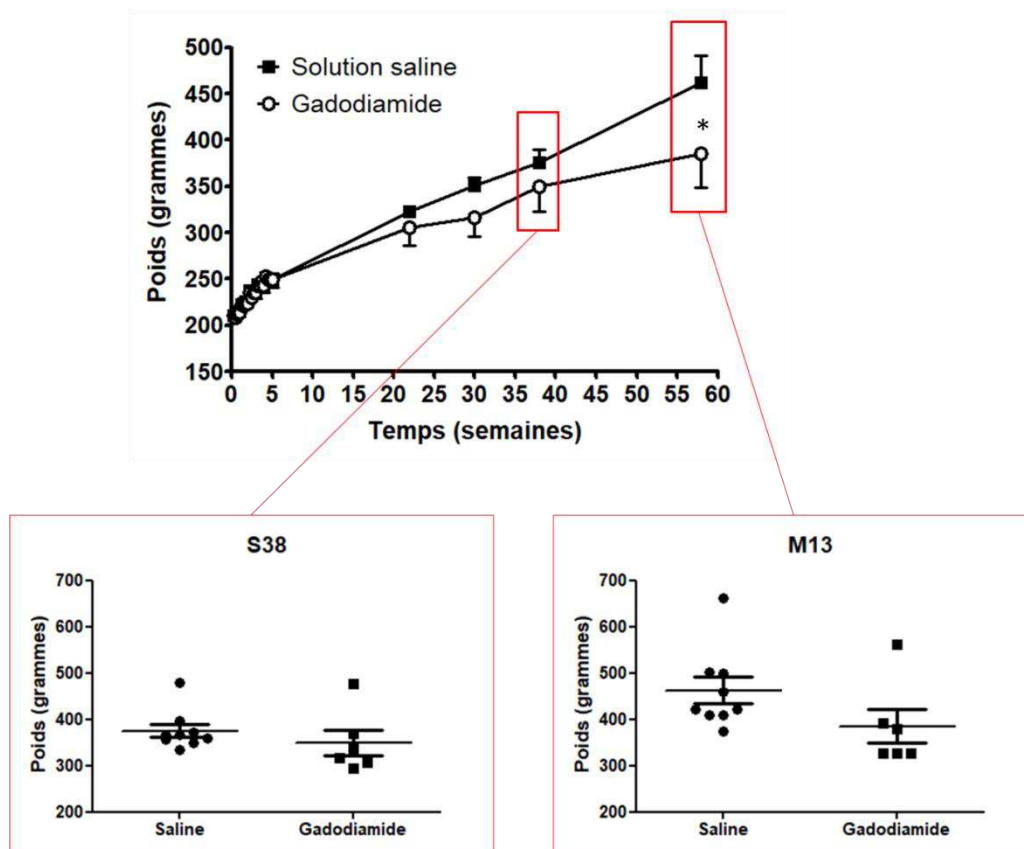


Figure 4.7 : Suivi des poids des rates des groupes contrôle et gadodiamide au cours du protocole. Diagrammes de dispersion à S38 (33 semaines post-injections) et au M13 (1 an post-injections). Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM et * $p=0,05$.

Au préalable du protocole d'injection, le poids des rates du groupe contrôle ($210,4 \pm 5,2$ g) et du groupe gadodiamide ($210,2 \pm 3,3$ g) sont similaires. Le poids des rates contrôles augmentent au cours du temps conformément à la courbe de poids de la souche Sprague-Dawley. A la semaine 38, le poids des rates du groupe gadodiamide est plus faible que celui du groupe contrôle ($-6,8\%$ et $p=0,18$; $350,0 \pm 27,4$ g vs $375,4 \pm 14,1$). Au bout de 1 an post-injections (M13), le poids des rates du groupe gadodiamide ($385,4 \pm 37,2$ g) est significativement plus faible ($-16,6\%$; $p=0,05$) en comparaison au poids du groupe contrôle ($462,1 \pm 28,8$ g).

4.2.2.3. Conclusion

En conclusion, des lésions cutanées apparaissent sur 3 des 10 rates injectées au gadodiamide à court terme (entre 2 et 8 semaines post-injections). De plus, les injections répétées de gadodiamide chez le rat induisent une diminution significative de la prise de poids à long terme (1 an post-injections) alors que cette baisse n'est pas observable à court terme (6 semaines post-injections) et à moyen terme (entre 17 et 33 semaines post-injections).

4.2.3. Suivi longitudinal de l'hypersignal suite aux injections répétées de gadodiamide par IRM

Un suivi longitudinal de l'intensité du signal des noyaux cérébelleux profonds (NCP) a été réalisé sur des images pondérées en T1 chez des rates ayant reçu des injections répétées de gadodiamide ou de solution saline. Sur les images de la **figure 4.8**, l'hypersignal (indiqué par les flèches blanches) est visible qualitativement à M0, M1 et M13 chez les rates du groupe gadodiamide.

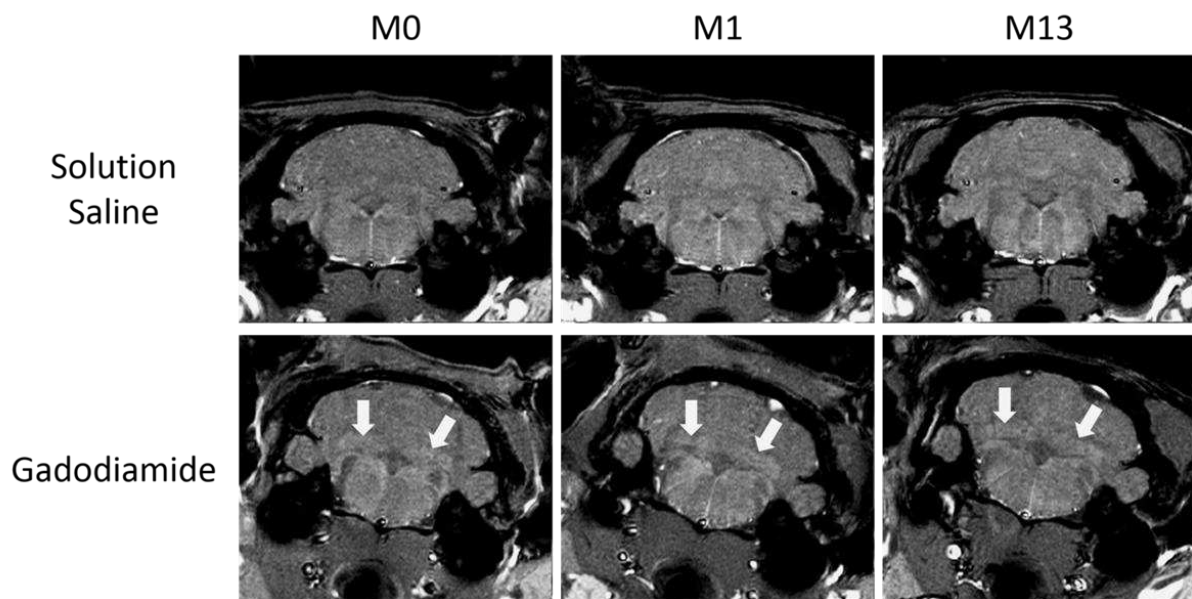


Figure 4.8 : Images pondérées en T1 du cervelet chez les rates ayant reçu des injections répétées de gadodiamide ou de solution saline à M0 (1 semaine post-injections), M1 (6 semaines post-injections) et M13 (1 an post-injections). Les flèches indiquent le rehaussement du signal au niveau des noyaux cérébelleux profonds.

A partir des mesures d'intensité dans les régions d'intérêts, une comparaison a été effectuée entre les ratios NCP/cortex cérébelleux utilisé dans les études chez les rats et NCP/tronc cérébral équivalent aux mesures en clinique.

4.2.3.1. Ratio NCP/ Cortex cérébelleux

Dans la **figure 4.9**, les graphes de dispersion (moyenne $\pm$ ESM) du ratio NCP/Cortex cérébelleux sont présentés pour les groupes gadodiamide et solution saline à M0 (1 semaine post-injections), M1 (6 semaines post-injections) et M13 (1 an post-injections).

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

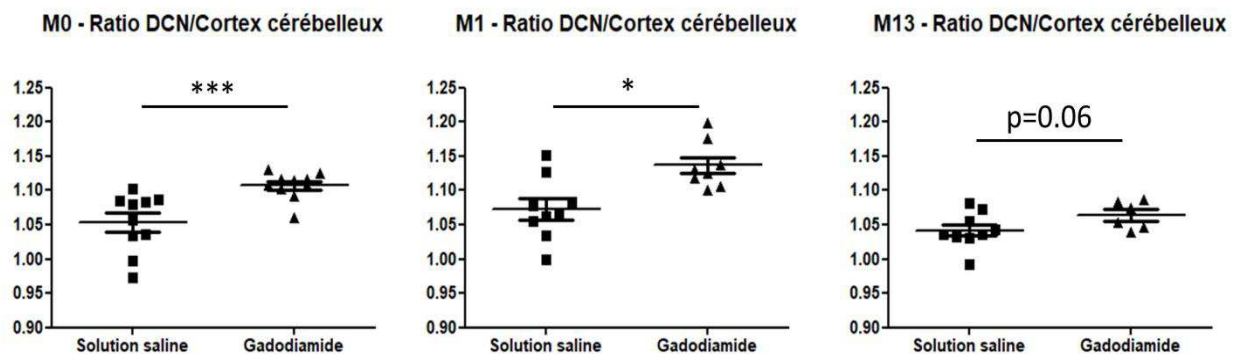


Figure 4.9 : Ratio intensité du signal des noyaux cérébelleux profonds/cortex cérébelleux chez les rates ayant reçu des injections répétées de gadodiamide ou de solution saline à M0 (1 semaine post-injections), M1 (6 semaines post-injections) et M13 (1 an post-injections). Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM. * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$.

A M0, une augmentation significative du ratio NCP/Cortex cérébelleux a été mesurée dans le groupe gadodiamide (+5,1% ; $1,107 \pm 0,006$ vs groupe solution saline : $1,053 \pm 0,013$). Cette hausse du signal est toujours présente à M1 chez les rates du groupe gadodiamide (+6,0% ; $1,073 \pm 0,015$ vs groupe solution saline : $1,137 \pm 0,012$). Il a été mesuré une persistance de l'hypersignal à 1 an après les injections cumulatives de gadodiamide chez les rates (+2,1% ; $1,042 \pm 0,008$ vs groupe solution saline : $1,064 \pm 0,008$).

4.2.3.2. Ratio NCP/ Tronc cérébral

Dans la **figure 4.10**, les graphes de dispersion du ratio NCP/Tronc cérébral sont présentés pour les groupes gadodiamide et solution saline à M0 (1 semaine post-injections), M1 (6 semaines post-injections) et M13 (1 an post-injections).

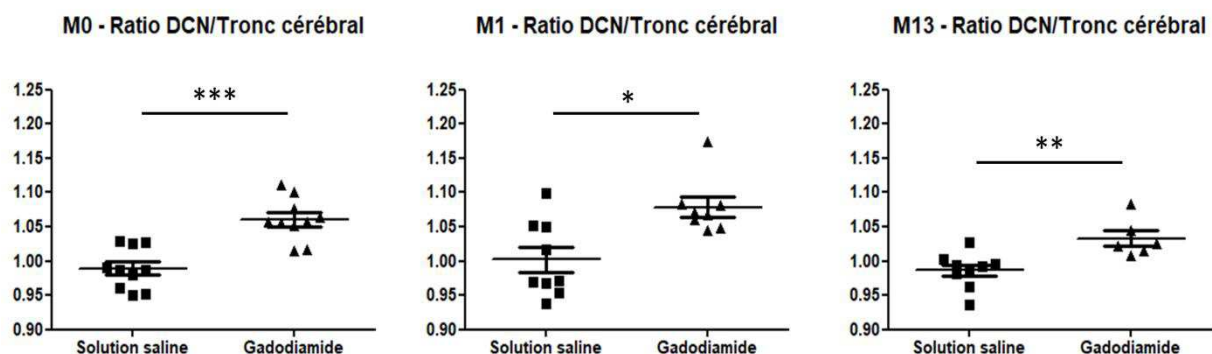


Figure 4.10 : Ratio intensité du signal des noyaux cérébelleux profonds/tronc cérébral chez les rates ayant reçu des injections répétées de gadodiamide ou de solution saline à M0 (1 semaine post-injections), M1 (6 semaines post-injections) et M13 (1 an post-injections). Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

De manière similaire au ratio NCP/Cortex Cérébelleux, le ratio NCP/tronc cérébral mesuré dans le groupe gadodiamide met en évidence une augmentation du signal dans les NCP à M0 (+7,2% ; $1,060 \pm 0,010$ vs groupe solution saline : $0,989 \pm 0,010$) et M1 (+7,6% ; $1,078 \pm 0,014$ vs groupe solution saline : $1,002 \pm 0,018$). Le ratio NCP/tronc cérébral confirme la persistance du rehaussement du signal à M13 chez les rates du groupe gadodiamide (+4,7% ; $1,033 \pm 0,011$ vs groupe solution saline : $0,9862 \pm 0,008$)

4.2.3.3. Comparaison des ratios

Dans le **tableau 4.3**, il est présenté les différences entre les moyennes des ratios du groupe de rates injectées au gadodiamide et la solution saline.

Tableau 4.3 : Comparaison de la normalisation de l'intensité du signal des noyaux cérébelleux profonds par le cortex cérébral ou le tronc cérébral

Gadodiamide vs Solution saline	M0	M1	M13
Ratio DCN/Cortex cérébelleux	+5,1%	+6,0%	+2,1%
Ratio DCN/Tronc cérébral	+7,2%	+7,6%	+4,7%

L'augmentation de l'intensité du signal dans les noyaux cérébelleux profonds mesurée chez les rates du groupe gadodiamide apparaît plus marquée lors de la normalisation par le tronc cérébral que le cortex cérébelleux.

4.2.3.4. Conclusion

De manière inédite, il a été mis en évidence que l'hypersignal persiste au niveau des noyaux cérébelleux profonds à très long terme (1 an post-injections). Cela indique que le gadodiamide reste accumulé au niveau cérébelleux jusqu'à un an après la dernière injection.

La comparaison des ratios NCP/cortex cérébelleux et NCP/tronc cérébral met en évidence que la normalisation par le tronc cérébral est plus optimale. Cette différence est probablement liée à l'accumulation de gadolinium dans le cortex cérébelleux, laquelle a été précédemment rapportée dans la littérature chez les rats ayant reçu des injections répétées d'agent de contraste linéaire (Lohrke et al. 2017). Pour le suivi de l'hyperintensité dans les études de l'accumulation cérébelleuse du gadolinium chez les rongeurs, il est préférable d'utiliser le ratio NCP/tronc cérébral équivalent aux études cliniques compte tenu de la possible présence de gadolinium dans le cortex cérébelleux.

4.2.4. Comparaison des méthodes de quantification en ¹H SRM sur les données obtenues dans les NCP

Compte tenu de l'augmentation de l'intensité du signal en IRM précédemment mesurée, les éventuelles modifications du métabolisme induites par l'accumulation du gadolinium dans les noyaux cérébelleux profonds ont été évaluées par ¹H SRM (**Fig. 4.11**). Afin de vérifier la robustesse de la méthode ERETIC digital que nous avons proposé d'utiliser pour obtenir les concentrations en mM, une comparaison a été réalisée avec les méthodes existantes : LCModel, QUEST et AMARES (*Cf. 2.3, p.45*).

Les métabolites cérébraux suivants ont été quantifiés avec les quatre méthodes de quantification à 1 semaine (M0), 6 semaines (M1) et 1 an post-injections (M13) : créatine et phosphocréatine (Cr+PCr) ; N-Acetyl Aspartate (NAA) ; choline, phosphocholine et glycérophosphocholine (tCho) ; glutamate (Glu), Taurine (Tau) et myo-Inositol (mI).

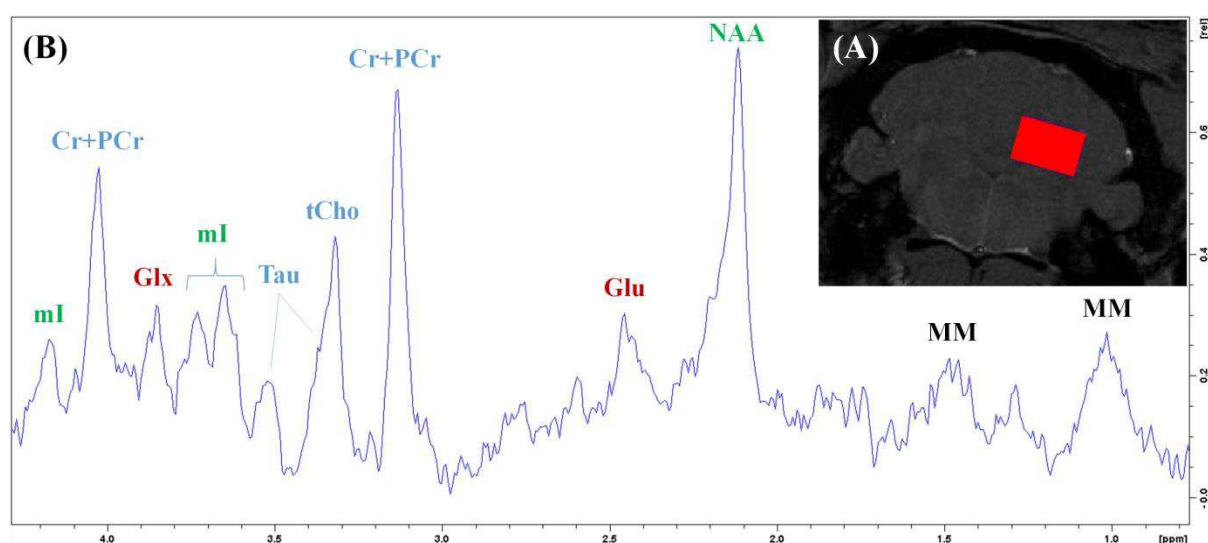


Figure 4.11 : (A) Position du voxel ($3 \times 2 \times 1,5 \text{ mm}^3$) sur une image pondérée en T1 ; (B) Spectre ¹H obtenu dans le noyau cérébelleux gauche chez une rate gadodiamide à M0 (1 semaine post-injections). L'attribution des pics est la suivante : macromolécules (MM) ; créatine et phosphocréatine (Cr+PCr) ; N-Acetyl Aspartate (NAA) ; choline, phosphocholine et glycérophosphocholine (tCho) ; glutamate (Glu), glutamate+glutamine (Glx), Taurine (Tau), myo-Inositol (mI).

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

4.2.4.1. ERETIC digital

La méthode ERETIC digital est une méthode de quantification dans le domaine fréquentiel que nous avons proposé de mettre en place pour obtenir les concentrations molaires des métabolites. Les résultats obtenus par cette méthode sont résumés dans la **figure 4.12**.

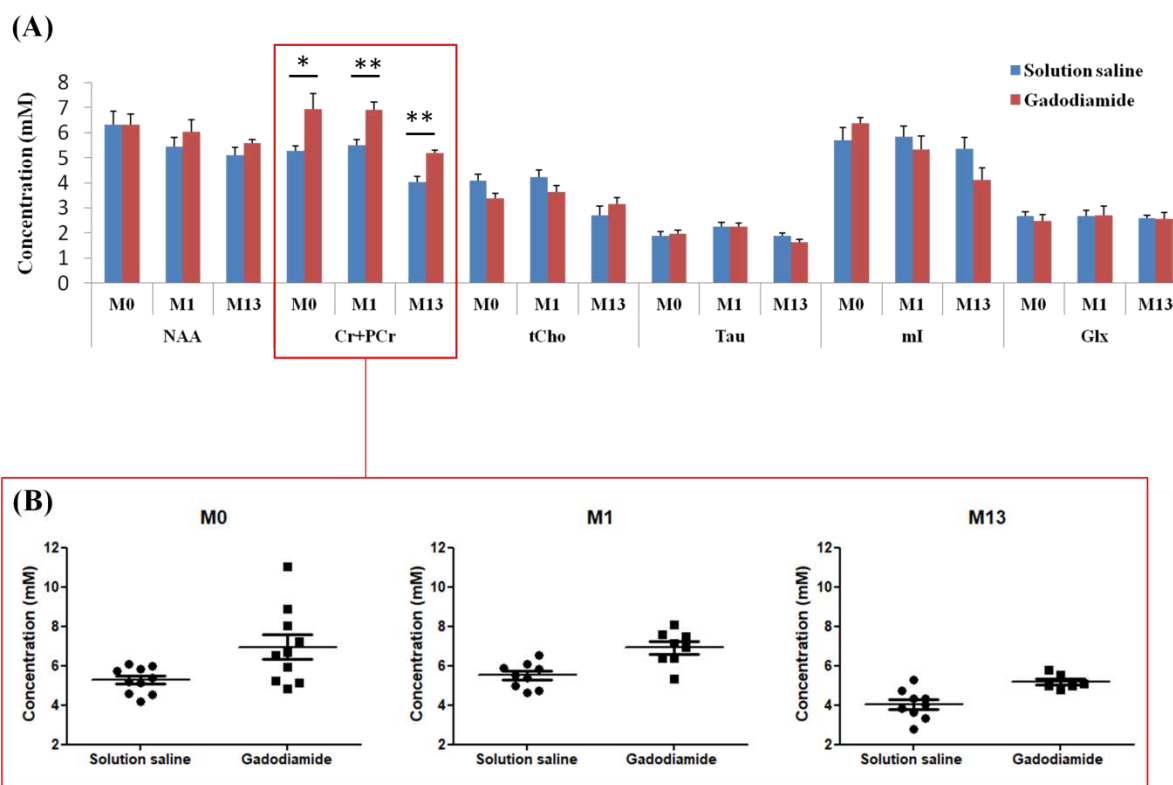


Figure 4.12 : (A) Quantification spectrale en mM par la méthode ERETIC digital à M0 (1 semaine post-injections), M1 (5 semaines post-injections) et M13 (1 an post-injections). (B) Diagrammes de dispersion de créatine+phosphocréatine. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

En comparaison du groupe de rates ayant reçu des injections de solution saline, aucune variation n'est observée chez les rates du groupe gadodiamide à M0, M1 et M13 pour : le NAA, les composés contenant de la choline, la taurine, le myo-Inositol et le glutamate (**Fig. 4.12A**).

Une augmentation significative de la créatine totale (créatine + phosphocréatine) a été mesurée chez les rates du groupe gadodiamide à M0 (+32% ; $6,95 \pm 0,61$ mM vs groupe solution saline : $5,27 \pm 0,21$ mM), M1 (+25,3% ; $6,91 \pm 0,31$ mM vs groupe solution saline : $5,51 \pm 0,20$ mM) et M13 (+28,8% ; $5,19 \pm 0,24$ mM vs groupe solution saline : $4,03 \pm 0,12$ mM) (**Fig. 4.12B**).

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

4.2.4.2. LCModel

De manière similaire à la méthode ERETIC digital, LCModel est une technique de quantification dans le domaine fréquentiel. Dans le cas de LCModel, la quantification est réalisée par modélisation des pics du spectre et la gestion de ligne de base a lieu par incorporation de spectres de macromolécules dans la base de données. Les résultats obtenus par cette méthode sont présentés dans la figure 4.13.

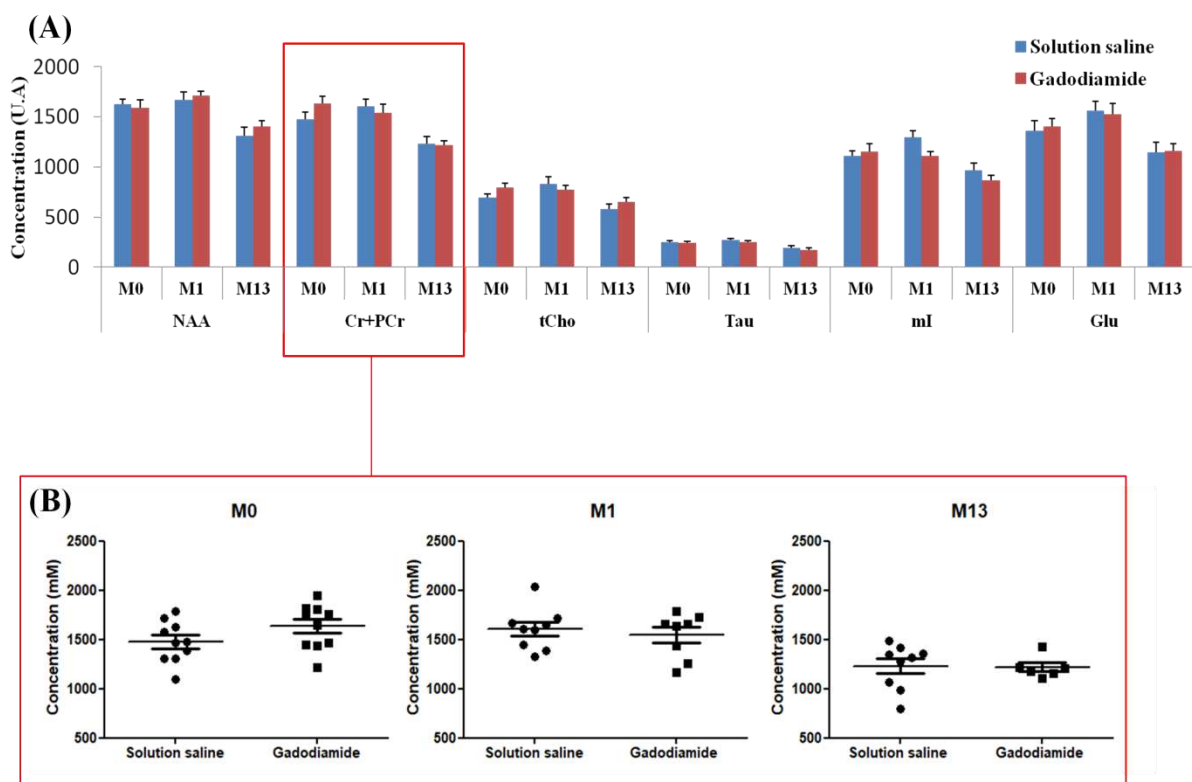


Figure 4.13 : (A) Quantification spectrale en unité arbitraire (U.A.) par la méthode LCModel à M0 (1 semaine post-injections), M1 (5 semaines post-injections) et M13 (1 an post-injections). (B) Diagrammes de dispersion de créatine+phosphocréatine. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM.

Comme pour la quantification par ERETIC digital, aucune variation n'a été mesurée chez les rates du groupe gadodiamide à M0, M1 et M13 comparée aux rates ayant reçu des injections de solution saline pour : le NAA, les composés contenant de la choline, la taurine, le myo-Inositol et le glutamate (**Fig. 4.13A**). Par contre, l'augmentation précédemment mesurée par ERETIC digital n'est pas retrouvée pour la créatine totale (créatine+phosphocréatine) lors de la quantification par LCModel (**Fig. 4.13B**).

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

4.2.4.3. QUEST

A la différence des méthodes ERETIC digital et LCModel, la méthode QUEST effectue la quantification dans le domaine temporel. La quantification est réalisée par modélisation des métabolites et la gestion des macromolécules (influençant la ligne de base) a lieu par des calculs itératifs sur des points de la FID. Les concentrations des métabolites obtenues sont représentées dans la **figure 4.14**.

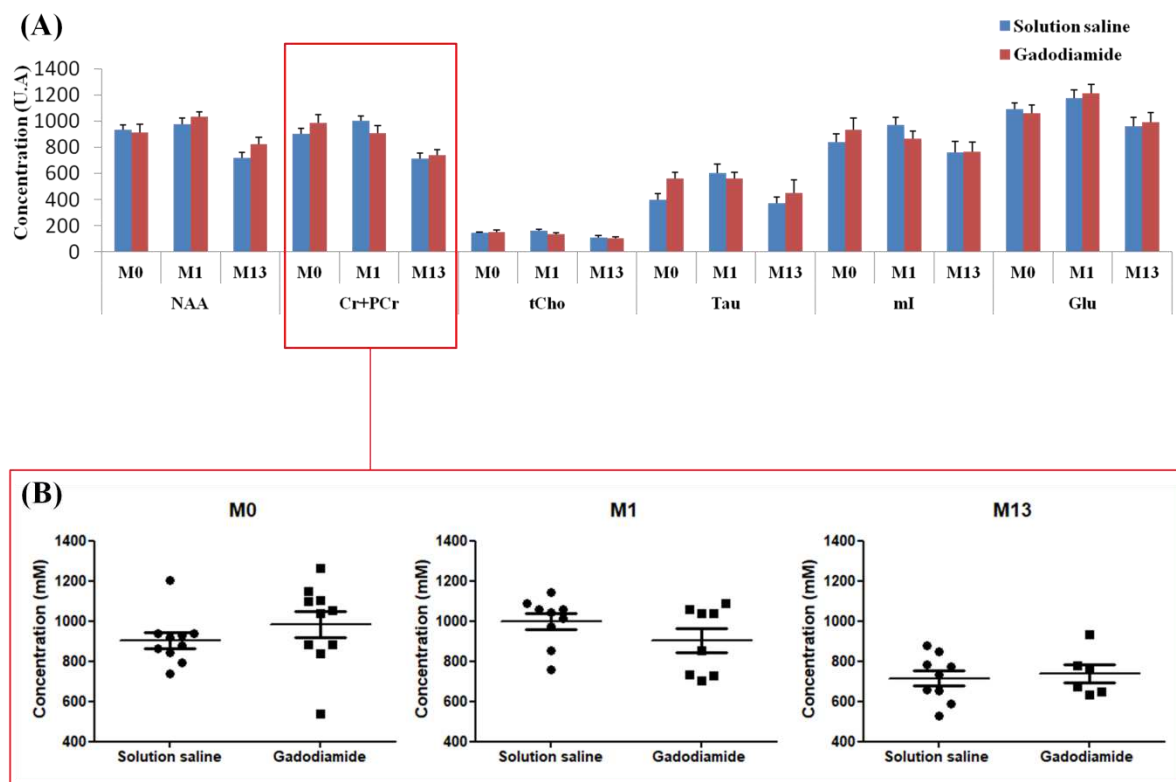


Figure 4.14 : (A) Quantification spectrale en unité arbitraire (U.A) par la méthode QUEST à M0 (1 semaine post-injections), M1 (5 semaines post-injections) et M13 (1 an post-injections). (B) Diagrammes de dispersion du pic de créatine+phosphocréatine. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM.

Comme pour LCModel et ERETIC digital, aucune variation n'a été mesurée chez les rates du groupe gadodiamide à M0, M1 et M13 en comparaison aux rates ayant reçu des injections de solution saline pour : le NAA, les composés contenant de la choline, la taurine, le myo-Inositol et le glutamate (**Fig. 4.14A**). De manière similaire à LCModel, l'augmentation de la créatine totale (créatine+phosphocréatine) n'est pas présente (**Fig. 4.14B**).

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

4.2.4.4. AMARES

La méthode AMARES réalise la quantification dans le domaine temporel comme la méthode QUEST. A la différence de QUEST, AMARES n'utilise pas de base de données simulée et donc elle nécessite une interaction plus importante avec l'opérateur pour la mise au point des connaissances préalables. En effet, il est nécessaire d'indiquer le déplacement chimique et la largeur à mi-hauteur des pics pour l'obtention du spectre estimé. Les résultats de la quantification AMARES sont illustrés dans la **figure 4.15**.

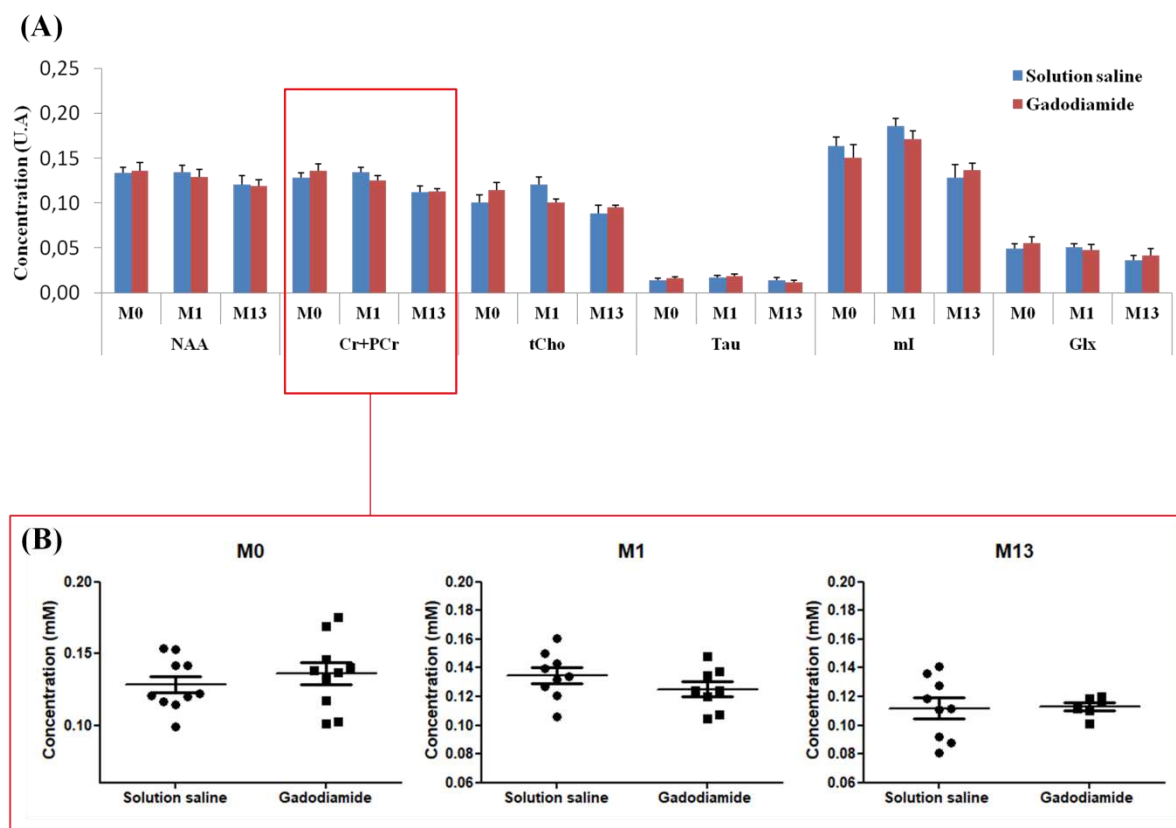


Figure 4.14 : (A) Quantification spectrale en unité arbitraire (U.A) par la méthode AMARES à M0 (1 semaine post-injections), M1 (5 semaines post-injections) et M13 (1 an post-injections). (B) Diagrammes de dispersion du pic de créatine+phosphocréatine. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM.

Comme pour les méthodes précédentes, aucune variation n'a été mesurée chez les rates du groupe gadodiamide à M0, M1 et M13 en comparaison aux rates ayant reçu des injections de solution saline pour : le NAA, les composés contenant de la choline, la taurine, le myo-Inositol et le glutamate (**Fig. 4.15A**). De manière similaire à LCModel et QUEST, l'augmentation de la créatine totale (créatine+phosphocréatine) n'a pas été détectée (**Fig. 4.15B**).

4.2.4.5. Comparaison des méthodes de quantification en ^1H SRM

La méthode ERETIC digital que nous avons proposé d'utiliser pour obtenir une quantification en concentration molaire a mis en évidence une augmentation de la créatine totale (créatine+phosphocréatine) chez des rates ayant reçu des injections répétées de gadodiamide en comparaison à des rates injectées avec de la solution saline. Cette augmentation apparaît persistante à 1 semaine, 5 semaines et 1 an post-injections.

Néanmoins, les trois méthodes de quantification classiquement utilisées en ^1H SRM (LCModel, QUEST et AMARES) n'ont pas montré de variation du profil métabolique des noyaux cérébelleux profonds chez des rates injectées au gadodiamide à 1 semaine, 5 semaines et 1 an post-injections. Il apparaît que les résultats obtenus avec les méthodes de quantification actuellement disponibles sont équivalents, et cela que la quantification soit effectuée dans le domaine fréquentiel (LCModel) ou temporel (QUEST et AMARES).

La principale différence entre la méthode ERETIC digital et les autres méthodes de quantification réside dans le traitement de la ligne de base. En effet, une correction de la ligne de base par une spline cubique est incluse dans les étapes de post-traitement avant la quantification effectuée par ERETIC digital. Nous avons fait l'hypothèse que la correction de la ligne de base pouvait influencer les mesures des aires sous les pics par la méthode ERETIC digital.

Afin de valider cette hypothèse, les spectres ^1H moyens des rates injectées avec de la solution saline et le gadodiamide ont été superposés en présence ou en absence de la correction de la ligne de base (**Fig. 4.15**).

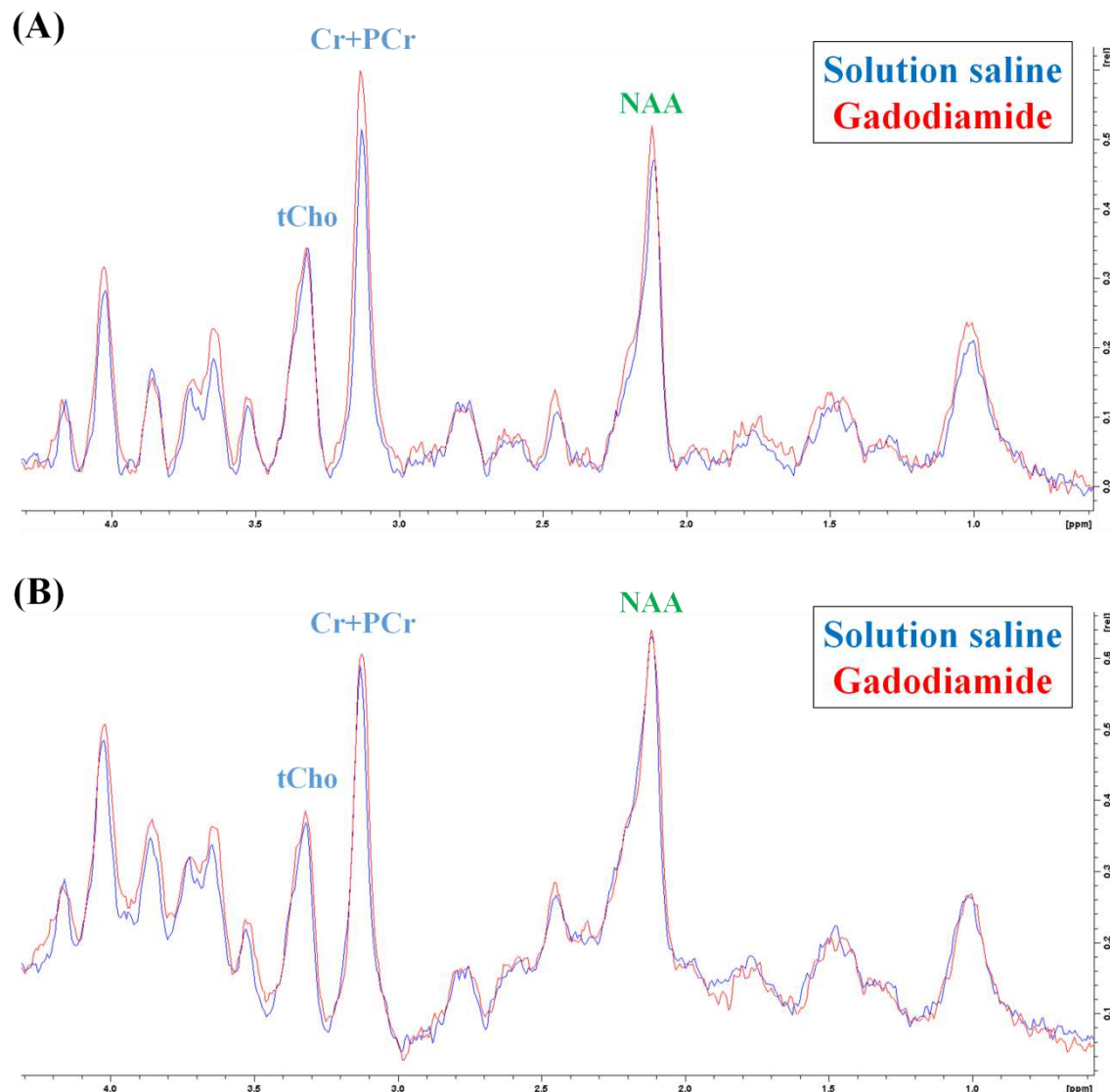


Figure 4.15 : Spectres ^1H moyens des noyaux cérébelleux profonds obtenus chez les rates injectées au gadodiamide ou avec une solution saline à M0 (1 semaine post-injections) (A) avec correction de ligne de base ; (B) sans correction de ligne de base.

Dans la **figure 4.15A**, une augmentation du pic de créatine totale dans le groupe gadodiamide peut être observée qualitativement en présence de la correction de la ligne de base. Dans la **figure 4.15B**, cette différence sur le pic de créatine totale n'est plus observable en absence de la correction de la ligne de base. Il apparaît que l'application de la correction de la ligne de base en post-traitement influence la quantification spectrale et pourrait être une source de biais.

4.2.5.6. Conclusion

Par les techniques de quantification actuelles en ^1H SRM (LCModel, AMARES et QUEST), nous avons mis en évidence que les injections répétées de l'agent de contraste linéaire neutre gadodiamide n'induisent pas d'altération apparente sur le métabolisme des noyaux cérébelleux profonds à court terme (1 et 6 semaines post-injections) et à long terme (1 an post-injections). En lien avec l'évaluation *in vitro* de l'effet du gadodiamide sur les spectres ^1H (Cf. 4.2.1, p.87), ces résultats *in vivo* confirment que l'accumulation au niveau cérébral de cet agent de contraste linéaire n'influence pas la largeur ou l'amplitude du signal des métabolites.

La comparaison avec les méthodes conventionnelles a mis en évidence l'influence de la correction de la ligne de base dans la quantification ERETIC digital. La correction de la ligne de base est nécessaire car les macromolécules ont des fréquences de résonance s'additionnant à l'ensemble du spectre. Ceci a pour conséquence que la ligne de base n'est pas proche de zéro et pourrait être une source de biais dans les mesures de l'aire sous le pic.

La correction de la ligne de base dans la méthode ERETIC digital est appliquée par une spline cubique qui est une courbe définie par fragments à l'aide de polynômes. Ce biais n'apparaît pas dans les autres méthodes de quantification car d'autres stratégies de gestion de la ligne de base sont effectuées. La méthode LCModel incorpore un spectre *in vivo* de macromolécules précédemment acquis dans son estimation dans le domaine fréquentiel. Les signaux de la ligne de base peuvent être identifiés comme des composés décroissants rapides dans les premiers points de la FID, les méthodes dans le domaine temporel (QUEST et AMARES) vont exploiter ce phénomène. Dans le cas de QUEST, les signaux des macromolécules sont estimés en réalisant des calculs itératifs sur les premiers points de la FID et l'ajuste à une base de données spécifique aux macromolécules. Dans le cas d'AMARES, la troncature des premiers points de la FID va permettre de réduire l'influence des macromolécules dans l'estimation des métabolites (Graveron-Demilly 2014).

Les stratégies de la correction de la ligne de base dans les méthodes classiques apparaissent plus robustes pour la quantification des métabolites que la méthode utilisée pour ERETIC digital. Il a été précédemment rapporté des quantifications de métabolites comparables entre LCModel et QUEST dans des modèles animaux d'ischémie cérébrale et de démence vasculaire (Shen et al. 2008; Jozefovičová et al. 2015).

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

Néanmoins, Jozefovičová et al. (2015) rapporte une sous-estimation de leurs mesures par QUEST en comparaison de LCModel et ils conjecturent que leur correction de la ligne de base par soustraction des macromolécules influence leurs résultats. En effet, ils n'ont pas incorporé les macromolécules dans leur base de données QUEST alors que dans notre étude les macromolécules ont été incluses. Sur un imageur clinique à 1.5T, les résultats obtenus par LCModel et AMARES donnent des résultats comparables pour la majorité des métabolites cérébraux à l'exception du pic de Glx (glutamate+glutamine) qui présente une forte superposition avec le NAA (Kanowski et al. 2004).

Le traitement du signal des macromolécules et son influence dans la correction de la ligne de base reste une question centrale dans la quantification des données de ^1H SRM *in vivo*. Au vue de notre comparaison, il apparait essentiel de tenir compte du signal des macromolécules dans la correction de ligne de base pour limiter des erreurs significatives d'estimation des métabolites.

4.2.5. Analyse histologique

Les figures de cette partie ont été fournies par la société Atlantic Bone Screen.

4.2.5.1. Analyse morphologique par immunohistochimie

Après les expériences IRM et ¹H SRM effectuées à 1 an post-injections, les cervelets ont été examinés par immunohistochimie. Une analyse semi-quantitative par immunofluorescence a été réalisée dans les noyaux cérébelleux profonds à l'aide de trois marqueurs : (i) la synaptophysine qui marque le corps cellulaire des neurones, (ii) la GFAP qui permet de détecter la morphologie des astrocytes ainsi que leurs interactions avec les neurones et les capillaires sanguins; (iii) le CD68 qui détecte les cellules microgliales activées (macrophages du cerveau) lesquelles sont impliquées dans l'inflammation.

Ces marqueurs ont permis d'évaluer trois populations cellulaires présentes dans le système nerveux central et les paramètres mesurés pour chacun de ces marqueurs sont résumés dans le **tableau 4.4**.

Tableau 4.4 : Critères d'évaluation des marqueurs utilisés en immunofluorescence

Marqueurs	Paramètres évalués
Synaptophysine	Signal général ; signal des péricaryons.
GFAP	Signal général ; astrocytes périneuronaux ; astrocytes périvasculaires ; épaisseur des processus astrocytaires.
CD68	Microglie activé en périvasculaire ; microglie activé de manière diffuse dans le neuropile (substance grise).

Dans la **figure 4.16**, il est illustré un exemple des images obtenues en épifluorescence des marquages par la GFAP (processus astrocytaires et astrocyte périvasculaire) et le CD68 (microglie activé).

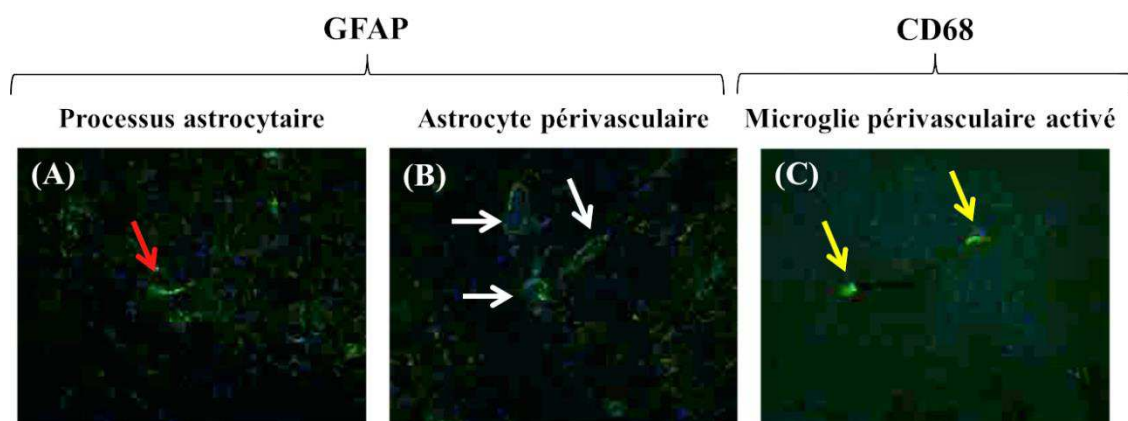


Figure 4.16 : Images par épifluorescence (x40) des marquages immunohistochimiques au sein des noyaux cérébelleux profonds par (A) & (B) GFAP et (C) CD68.

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

Chacun des paramètres de ces marqueurs a été évalué sur une échelle de 0 (aucun signal) à 3 (haute densité du signal). Les résultats semi-quantitatifs de la mesure du signal des trois marqueurs sont présentés dans la **figure 4.17** pour la synaptophysine, la **figure 4.18** pour la GFAP et la **figure 4.19** pour le CD68.

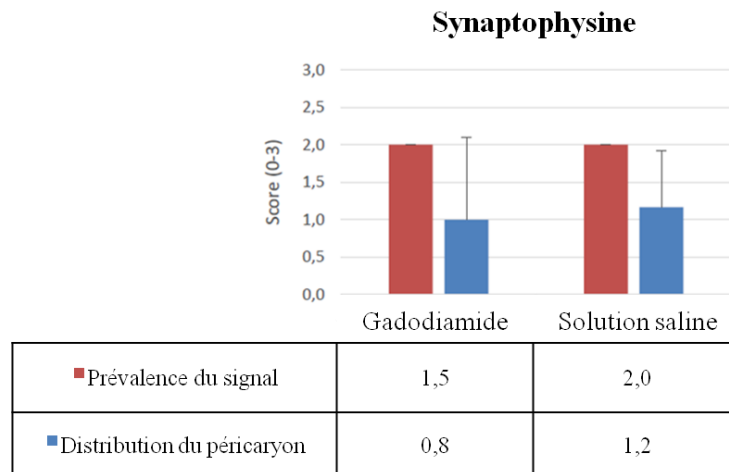


Figure 4.17 : Analyse semi-quantitative en immunohistochimie de la synaptophysine
Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SD.

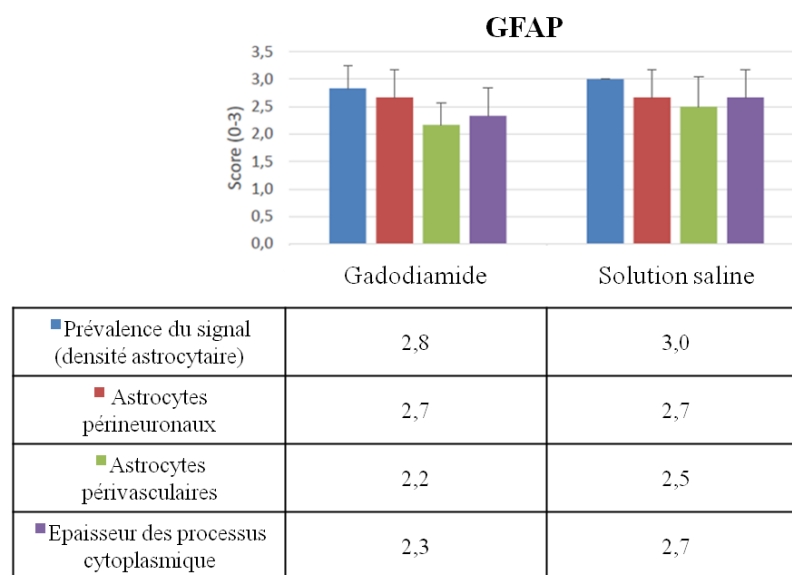


Figure 4.18 : Analyse semi-quantitative en immunohistochimie de la GFAP.
Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SD.

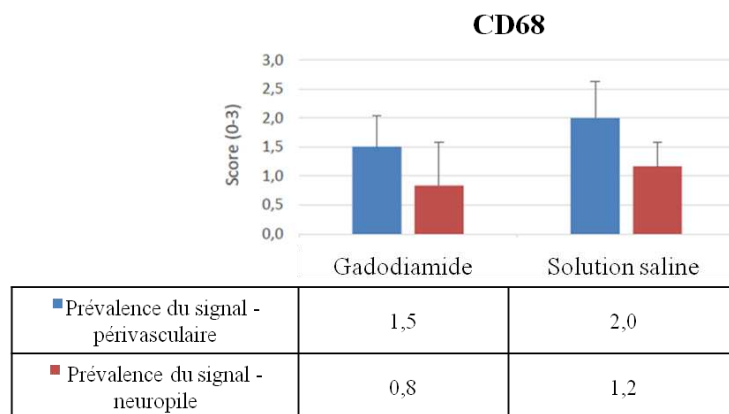


Figure 4.19 : Analyse semi-quantitative en immunohistochimie de CD68

Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SD.

En comparaison du groupe contrôle, aucune variation significative n'a été observée dans les noyaux cérébelleux profonds prélevés chez les rates du groupe gadodiamide pour les marqueurs morphologiques des cellules neuronales, des cellules astrocytaires et de la microglie.

4.2.5.2. Analyse quantitative de la créatine kinase B

Compte tenu de l'augmentation de la créatine totale initialement mesurée en ^1H SRM par la méthode ERETIC digital, une analyse quantitative a été effectuée par microscopie à épifluorescence pour la mesure de la créatine kinase B (CK-BB). La créatine kinase est une enzyme impliquée dans l'homéostasie énergétique et elle permet la phosphorylation de la créatine en phosphocréatine. Le signal CK-BB dans les noyaux cérébelleux profonds apparaît comme un signal diffus dans le corps cellulaire des neurones.

Les images des noyaux cérébelleux profonds obtenues en épifluorescence ont été converties en niveaux de gris puis segmentées avec un seuil fixé aux valeurs de 11-255. Cette valeur a été considérée comme la plus consistante pour séparer le signal de l'arrière-plan du signal positif. Les particules considérées comme positives ont été filtrées par leur taille afin de ne conserver que les particules supérieures à 60 μm consistantes avec les structures neuronales (Fig. 4.20).

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

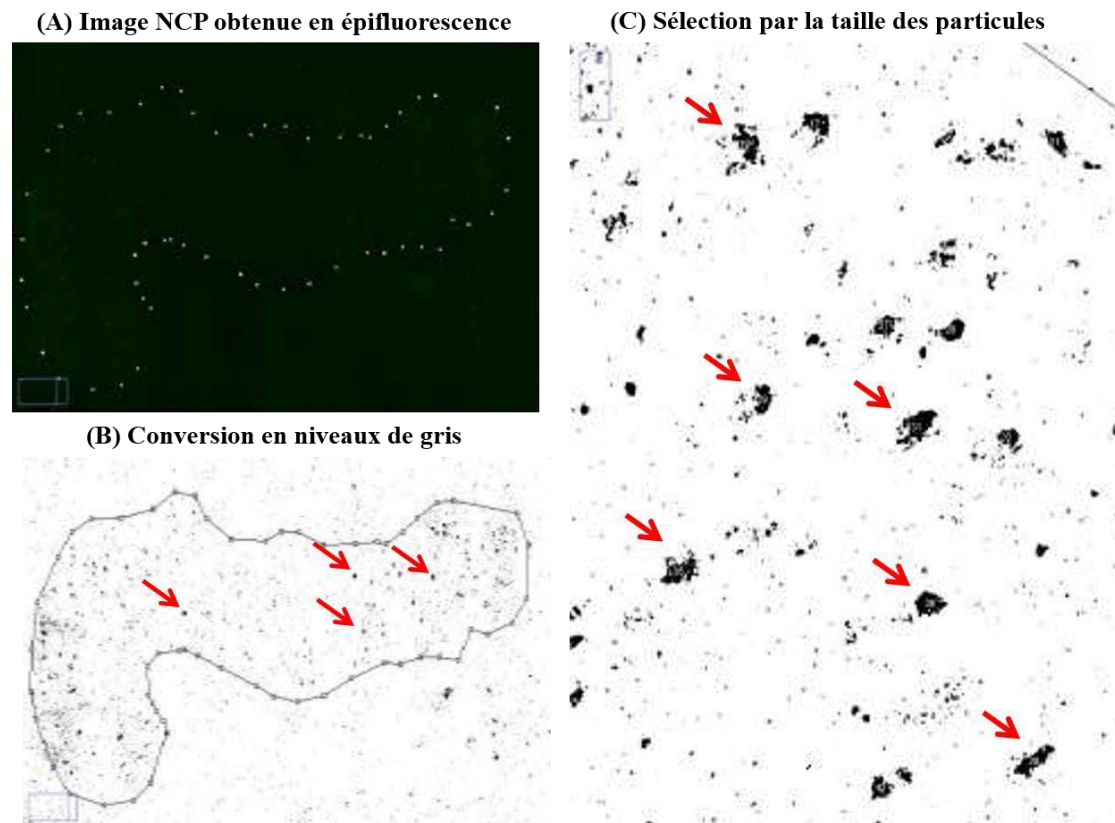


Figure 4.20 : Etapes de l'analyse quantitative en immunohistochimie de la créatine kinase B (CK-BB). Les flèches indiquant les particules de CK-BB d'une taille supérieure à $60 \mu\text{m}^2$.

Le nombre de particules de CK-BB supérieures à $60 \mu\text{m}^2$ et l'aire des particules sur la surface totale ont été calculés (**Fig. 4.21**).

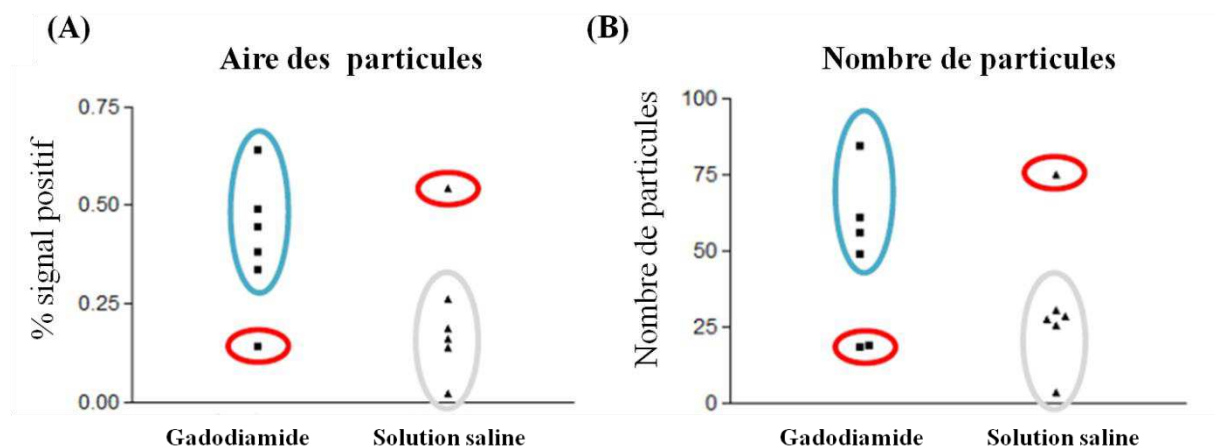


Figure 4.21 : Analyse quantitative en immunohistochimie de la créatine kinase B (CK-BB). (A) mesure de l'aire des particules d'une taille supérieure à $60 \mu\text{m}^2$ dans les noyaux cérébelleux profonds et (B) nombre de particules comptabilisées. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SD

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

La quantification du signal de CK-BB a mis en évidence une augmentation non significative du nombre de particules ($p=0,485$) avec un signal plus étendu dans la région d'intérêt ($p=0,132$). Le graphe de dispersion de l'aire des particules met en évidence une rate se comportant différemment au sein de chaque groupe (gadodiamide et solution saline) (**Fig. 4.20B**). Il en est de même pour le graphe de dispersion du nombre de particules qui met en évidence deux rates du groupe gadodiamide et une rate du groupe solution saline qui sont différentes.

4.2.5.3. Conclusion

Aucun changement morphologique n'a été observé par l'analyse en immunofluorescence des différentes populations cellulaires (neurones, astrocytes et microglie). Cela suggère que l'agent de contraste linéaire gadodiamide n'induit pas d'altération de ces marqueurs histologiques à long terme chez les rates ayant reçu des injections répétées. La créatine kinase BB qui est impliquée dans la régulation des niveaux de l'ATP au niveau cérébrale augmente mais de manière non significative chez les rates du groupe gadodiamide.

4.3. Discussion et perspectives

L'accumulation des agents de contraste à base de gadolinium (GBCA) au niveau cérébral induit un hypersignal au niveau des noyaux cérébelleux profonds (NCP) observable par IRM sur des images pondérées en T1. La persistance et les conséquences biologiques d'une telle accumulation posent encore de nombreuses interrogations. Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons voulu répondre aux problématiques concernant : (i) la persistance à long terme de l'hypersignal détecté par IRM au niveau des NCP ; (ii) l'évaluation du profil métabolique des NCP par ^1H SRM. Le suivi longitudinal a été réalisé pendant une période de 1 an chez des rates ayant reçu des injections répétées de gadodiamide (GBCA linéaire neutre).

Nous avons mis en évidence que les injections répétées de gadodiamide chez des rates saines induisent une augmentation de l'intensité du signal au niveau des NCP sur des images pondérées en T1 obtenues avec un aimant à haut champ (7 Tesla). Cette hausse du signal des NCP est observable à 1 semaine post-injections et 5 semaines post-injections. Ce résultat est en accord avec les précédentes observations sur l'hyperintensité et l'augmentation de la vitesse de relaxation R1 réalisées sur le même modèle animal (20 injections de 0,6 mmol/kg pendant 5 semaines) avec un aimant à 2.35 Tesla (Robert et al. 2015, 2016). La mesure de l'hypersignal sur ce modèle animal d'injections cumulatives de gadodiamide est donc reproductible à haut champ, et cela en dépit de la diminution du contraste que peut engendrer d'acquérir des images à haut champ.

De manière inédite, nous avons mis en évidence que le rehaussement du signal dans les NCP est présent à 1 an après la fin des injections de gadodiamide. Ce rehaussement semble indiquer que l'accumulation de gadolinium persiste dans le cervelet à très long terme. Une analyse par LA-ICP-MS des cervelets de rats est en cours afin de quantifier la concentration du dépôt de gadodiamide à 1 an post-injections.

Une comparaison a été effectuée entre la normalisation de l'intensité du signal des NCP par le tronc cérébral ou le cortex cérébelleux. En effet, la différence entre les rates du groupe gadodiamide et celles du groupe contrôle est plus élevée avec le ratio NCP/tronc cérébral que le ratio des signaux NCP/cortex cérébral. Cette différence pourrait être une indication de la présence possible du gadolinium dans le cortex cérébelleux malgré l'absence d'un hypersignal. Chez les rats, Lohrke et al. (2017) ont détecté de fortes concentrations de

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

gadodiamide par LA-ICP-MS dans les NCP et dans la couche granulaire du cortex cérébelleux à 8 semaines post-injections (50 mmol/kg sur 4 semaines).

Afin d'élucider les conséquences biologiques des injections cumulatives de gadodiamide, le profil métabolique des NCP obtenu par ^1H SRM a été quantifié. Compte tenu que les effets des GBCA sur les pics des métabolites en ^1H SRM sont peu connus, l'évaluation *in vivo* a été précédée par une étude *in vitro*. Les spectres ^1H de tubes de gel d'agarose contenant des composés représentatives du métabolisme cérébral (NAA, choline et créatine) n'ont pas mis en évidence de variation qualitative (largueur des pics) ou quantitative (aire sous les pics) en présence de gadodiamide (12,5 et 50 μM). Cela nous a permis de valider que le gadodiamide n'impacte pas la quantification des spectres ^1H et que les mesures réalisées *in vivo* étaient représentatifs du métabolisme des noyaux cérébelleux profonds.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons souhaité mettre en place une quantification en concentration molaire par la méthode ERETIC digital. La quantification par ERETIC digital a montré une augmentation prolongée au cours du temps de la concentration de créatine totale (créatine+phosphocréatine) dans les NCP en comparaison au groupe contrôle. Aucune modification dans le temps à ces délais (1 semaine, 6 semaines et 1 an post-injections) n'a été observée pour les autres métabolites.

Néanmoins, cette augmentation de créatine totale n'a pas été corroborée par les méthodes de quantification classiquement utilisées en ^1H SRM (LCModel, QUEST et AMARES). Or, les signaux impliqués dans la FID dans le domaine temporel ont une correspondance directe avec les pics des métabolites dans le domaine fréquentiel. Par conséquent, la quantification devrait être équivalente entre les méthodes dans le domaine temporel (QUEST et AMARES) et fréquentiel (LCModel et ERETIC digital). Le biais dans la mesure de créatine totale semble être lié à la stratégie employée pour la correction de la ligne de base au préalable de la quantification par la méthode ERETIC digital.

Par les méthodes de quantification conventionnelles en ^1H SRM, nous avons mis en évidence que les injections cumulatives de gadodiamide n'induisent pas de modification sur le profil métabolique des NCP à court et à long terme. Une interprétation possible de l'absence de modification du profil métabolique des NCP en présence de gadodiamide pourrait être liée à sa propriété de composé ionique neutre. En effet, il a été rapporté dans la littérature un élargissement accompagné d'une diminution de l'aire sous le pic de choline en ^1H SRM dans

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

le cas des GBCA ioniques et absents pour les GBCA neutres par des tests *in vitro* et chez un modèle de rat pour le cancer du sein (Lenkinski et al. 2009). Ce résultat a été confirmé en clinique sur les spectres obtenus après injection de GBCA linéaires ioniques (gadopentétate de diméglumine) au niveau des tumeurs mammaires (Baltzer et al. 2012) et des tumeurs cérébrales (Murphy et al. 2002). De la même façon, il a été montré que pour les GBCA neutres (gadodiamide ou de gadotérate de méglumine), aucune variation n'a été observée au niveau des tumeurs cérébrales après injection (Alkan et al. 2012). Il a été suggéré que la choline qui est chargée positivement par l'ammonium quaternaire (NH^{3+}) pourrait interagir avec la charge négative du complexe de gadolinium (J. K. Smith, Kwock, and Castillo 2000)

Au vue de la littérature, les GBCA neutres tels que le gadodiamide ne semble pas induire de modification spectrale. Qu'en-est-il des GBCA linéaires ioniques accumulés dans les noyaux dentelés cérébelleux des patients (gadopentétate de diméglumine et gadobénate de diméglumine)? Il serait intéressant d'explorer l'influence des GBCA linéaires ioniques accumulés au niveau cérébelleux par des expériences *in vitro* et *in vivo* chez les rats.

Au cours de notre protocole, l'état de bien-être des animaux et leurs poids ont été surveillés. Or, nous avons observé des lésions cutanées entre 2 et 8 semaines post-injections sur trois des dix rates du groupe gadodiamide. Lohrke et al. (2017) ont également observé des lésions cutanées à 8 semaines post-injections parmi quatre des dix rats administrés à une dose plus élevée de gadodiamide que notre étude (50 mmol/kg sur 4 semaines vs 12 mmol/kg sur 5 semaines). Dans l'étude de Lohrke et al. (2017), les lésions cutanées n'étaient pas observables chez les rats ayant reçu d'autres agents de contraste (gadopentétate de diméglumine, gadobutrol et gadotéridol). Ils ont corrélé leurs observations à une fibrose et une infiltration de cellules mononucléaires mesurées en histologie ainsi qu'à une forte concentration de gadodiamide dans la peau (1472 nmol/g). Dans notre étude, le poids des rates du groupe gadodiamide est significativement plus faible que celui du groupe contrôle à 1 an post-injections. Par conséquent, les lésions cutanées et la prise de poids plus faible semblent indiquer une altération systémique de l'état de santé des rates injectées au gadodiamide.

Afin d'explorer les possibles modifications structurales à long terme, des études immunohistochimiques ont été réalisées sur les cervelets prélevés après le point IRM et ^1H SRM à 1 an post-injections. Aucun changement de nos marqueurs pour les différentes populations cellulaires (neurones, astrocytes et microglie) n'a été observé au sein des noyaux cérébelleux profonds. Dans la littérature, les analyses histologiques chez les rats à 8 semaines

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

(Lohrke et al. 2017) ou 20 semaines (A. P. L. Smith et al. 2017) après des injections de gadodiamide à des doses plus élevées que notre étude n'avaient pas permis d'observer d'altérations histologiques.

Nous avons également mesuré une augmentation non significative de l'enzyme créatine kinase BB (CK-BB) chez les rates du groupe gadodiamide. L'enzyme CK-BB est une isoforme spécifique au cytosol des cellules cérébrales et elle est impliquée dans la régulation des niveaux de l'ATP. Cette hausse de CK-BB apparaît alors que la quantification des spectres ^1H au sein des NCP par les méthodes classiques (LCModel, QUEST, AMARES) ne met pas en évidence de variation pour la concentration de créatine totale chez les rates du groupe gadodiamide. Néanmoins, des écarts dans la mesure de CK-BB parmi les rates sont observables au sein de chaque groupe (gadodiamide et solution saline). Par conséquent, il serait intéressant d'augmenter le nombre d'animaux afin de vérifier cette tendance et valider la piste d'une modification du métabolisme énergétique induite par les injections répétées de gadodiamide.

Pour conclure, il a été mis en évidence dans le cadre de ces travaux de thèse la persistance d'un hypersignal dans les noyaux cérébelleux profonds chez les rates lors d'un suivi pendant un an après la dernière injection de gadodiamide. En perspective de ce travail, des dosages par LA-ICP-MS vont être effectués pour quantifier la concentration de gadodiamide dans les noyaux cérébelleux profonds. Ce dépôt de gadodiamide n'a pas induit de modification du métabolisme des noyaux cérébelleux profonds détectable par ^1H SRM. Compte tenu que le gadodiamide est un agent de contraste linéaire neutre, il serait intéressant d'explorer l'influence sur le profil métabolique des agents de contraste linéaires ioniques connus pour s'accumuler dans le cervelet (gadopentétate de diméglumine et gadobénate de diméglumine). La persistance de l'accumulation de gadolinium à long terme renforce la nécessité d'élucider les conséquences cliniques de l'accumulation des agents de contraste linéaires au niveau cérébelleux.

Bibliographie 2^{ème} partie

- Aime S., Caravan P. (2009) Biodistribution of gadolinium-based contrast agents, including gadolinium deposition. *J. Magn. Reson. Imaging* 30, 1259–1267.
- Alkan A., Burulday V., Oztanir N., Dogan M., Erbay M. F., Kocak A., Aralasmak A. (2012) Effects of contrast material on the metabolite ratios in single-voxel MR Spectroscopy of intraaxial brain tumors. *Med. Hypotheses* 79, 129–131.
- Aspelund A., Antila S., Proulx S. T., Karlsen T. V., Karaman S., Detmar M., Wiig H., Alitalo K. (2015) A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J. Exp. Med.* 212, 991–999.
- Bae S., Lee H.-J., Han K., Park Y.-W., Choi Y. S., Ahn S. S., Kim J., Lee S.-K. (2017) Gadolinium deposition in the brain: association with various GBCAs using a generalized additive model. *Eur. Radiol.* 27, 3353–3361.
- Baltzer P. A. T., Gussew A., Dietzel M., Rzanny R., Gajda M., Camara O., Reichenbach J. R., Kaiser W. A. (2012) Effect of contrast agent on the results of in vivo 1H MRS of breast tumors - is it clinically significant? *Nmr Biomed.* 25, 67–74.
- Balzer T. (2006) Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging, in *Clin. MR Imaging*, (Reimer P., Parizel P. M., Stichnoth F.-A., eds), pp. 53–63. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Cao Y., Huang D. Q., Shih G., Prince M. R. (2016) Signal Change in the Dentate Nucleus on T1-Weighted MR Images After Multiple Administrations of Gadopentetate Dimeglumine Versus Gadobutrol. *Am. J. Roentgenol.* 206, 414–419.
- Christensen K. N., Lee C. U., Hanley M. M., Leung N., Moyer T. P., Pittelkow M. R. (2011) Quantification of gadolinium in fresh skin and serum samples from patients with nephrogenic systemic fibrosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 64, 91–96.
- Errante Y., Cirimele V., Mallio C. A., Lazzaro V. Di, Zobel B. B., Quattrocchi C. C. (2014) Progressive Increase of T1 Signal Intensity of the Dentate Nucleus on Unenhanced Magnetic Resonance Images Is Associated With Cumulative Doses of Intravenously Administered Gadodiamide in Patients With Normal Renal Function, Suggesting Dechelation: *Invest. Radiol.* 49, 685–690.
- Frenzel T., Apte C., Jost G., Schöckel L., Lohrke J., Pietsch H. (2017) Quantification and Assessment of the Chemical Form of Residual Gadolinium in the Brain After Repeated Administration of Gadolinium-Based Contrast Agents: Comparative Study in Rats. *Invest. Radiol.* 52, 396–404.
- Frenzel T., Lengsfeld P., Schirmer H., Hütter J., Weinmann H.-J. (2008) Stability of Gadolinium-Based Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents in Human Serum at 37°C: *Invest. Radiol.* 43, 817–828.
- Geraldes C. F. G. C., Laurent S. (2009) Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging. *Contrast Media Mol. Imaging* 4, 1–23.
- Gibby W. A. (2004) Comparison of Gd DTPA-BMA (Omniscan) versus Gd HP-DO3A (ProHance) retention in human bone tissue by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. *Invest. Radiol.* 39, 138–142.
- Graveron-Demilly D. (2014) Quantification in magnetic resonance spectroscopy based on semi-parametric approaches. *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.* 27, 113–130.
- Greenberg S. A. (2010) Zinc Transmetallation and Gadolinium Retention after MR Imaging: Case Report. *Radiology* 257, 670–673.
- Gulani V., Calamante F., Shellock F. G., Kanal E., Reeder S. B. (2017) Gadolinium deposition in the brain: summary of evidence and recommendations. *Lancet Neurol.* 16, 564–570.

2^{ème} Partie : Evaluation des injections répétées d'un agent de contraste à base de gadolinium au niveau cérébral

- Hao D., Ai T., Goerner F., Hu X., Runge V. M., Tweedle M. (2012) MRI contrast agents: Basic chemistry and safety. *J. Magn. Reson. Imaging* 36, 1060–1071.
- Helm L., Merbach A. E., Tóth É., eds (2013) *The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging*. John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ.
- High W. A., Ayers R. A., Chandler J., Zito G., Cowper S. E. (2007) Gadolinium is detectable within the tissue of patients with nephrogenic systemic fibrosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 56, 21–26.
- Idée J.-M., Port M., Robic C., Medina C., Sabatou M., Corot C. (2009) Role of thermodynamic and kinetic parameters in gadolinium chelate stability. *J. Magn. Reson. Imaging* 30, 1249–1258.
- Iliff J. J., Lee H., Yu M., Feng T., Logan J., Nedergaard M., Benveniste H. (2013) Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. *J. Clin. Invest.* 123, 1299–1309.
- Jost G., Frenzel T., Lohrke J., Lenhard D. C., Naganawa S., Pietsch H. (2017) Penetration and distribution of gadolinium-based contrast agents into the cerebrospinal fluid in healthy rats: a potential pathway of entry into the brain tissue. *Eur. Radiol.* 27, 2877–2885.
- Jozefovičová M., Just I., Liptaj T., Kašparová S. (2015) Comparison of two programs for quantification of ¹H MR spectra of rat brain using a vascular dementia model. *Acta Chim. Slovaca* 8.
- Kanal E. (2016) Gadolinium based contrast agents (GBCA): Safety overview after 3 decades of clinical experience. *Magn. Reson. Imaging* 34, 1341–1345.
- Kanda T., Fukusato T., Matsuda M., Toyoda K., Oba H., Kotoku J., Haruyama T., Kitajima K., Furui S. (2015a) Gadolinium-based Contrast Agent Accumulates in the Brain Even in Subjects without Severe Renal Dysfunction: Evaluation of Autopsy Brain Specimens with Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy. *Radiology* 276, 228–232.
- Kanda T., Ishii K., Kawaguchi H., Kitajima K., Takenaka D. (2014) High Signal Intensity in the Dentate Nucleus and Globus Pallidus on Unenhanced T1-weighted MR Images: Relationship with Increasing Cumulative Dose of a Gadolinium-based Contrast Material. *Radiology* 270, 834–841.
- Kanda T., Osawa M., Oba H., Toyoda K., Kotoku J., Haruyama T., Takeshita K., Furui S. (2015b) High Signal Intensity in Dentate Nucleus on Unenhanced T1-weighted MR Images: Association with Linear versus Macrocyclic Gadolinium Chelate Administration. *Radiology* 275, 803–809.
- Kanowski M., Kaufmann J., Braun J., Bernarding J., Tempelmann C. (2004) Quantitation of simulated short echo time ¹H human brain spectra by LCModel and AMARES. *Magn. Reson. Med.* 51, 904–912.
- Kasahara S., Miki Y., Kanagaki M., Yamamoto A., Mori N., Sawada T., Taoka T., Okada T., Togashi K. (2011) Hyperintense Dentate Nucleus on Unenhanced T1-weighted MR Images Is Associated with a History of Brain Irradiation. *Radiology* 258, 222–228.
- Kuno H., Jara H., Buch K., Qureshi M. M., Chapman M. N., Sakai O. (2017) Global and Regional Brain Assessment with Quantitative MR Imaging in Patients with Prior Exposure to Linear Gadolinium-based Contrast Agents. *Radiology* 283, 195–204.
- Lenkinski R. E., Wang X., Elian M., Goldberg S. N. (2009) Interaction of gadolinium-based MR contrast agents with choline: Implications for MR spectroscopy (MRS) of the breast. *Magn. Reson. Med.* 61, 1286–1292.
- Lohrke J., Frisk A.-L., Frenzel T., Schöckel L., Rosenbruch M., Jost G., Lenhard D. C., *et al.* (2017) Histology and Gadolinium Distribution in the Rodent Brain After the

- Administration of Cumulative High Doses of Linear and Macrocyclic Gadolinium-Based Contrast Agents: *Invest. Radiol.* 52, 324–333.
- McDonald R. J., McDonald J. S., Kallmes D. F., Jentoft M. E., Murray D. L., Thielen K. R., Williamson E. E., Eckel L. J. (2015) Intracranial Gadolinium Deposition after Contrast-enhanced MR Imaging. *Radiology* 275, 772–782.
- Mitsumori L. M., Bhargava P., Essig M., Maki J. H. (2014) Magnetic Resonance Imaging Using Gadolinium-Based Contrast Agents: *Top. Magn. Reson. Imaging* 23, 51–69.
- Müller A., Jurcoane A., Mädler B., Ditter P., Schild H., Hattingen E. (2017) Brain relaxometry after macrocyclic Gd-based contrast agent. *Clin. Neuroradiol.*
- Murata N., Gonzalez-Cuyar L. F., Murata K., Fligner C., Dills R., Hippe D., Maravilla K. R. (2016) Macrocyclic and Other Non-Group 1 Gadolinium Contrast Agents Deposit Low Levels of Gadolinium in Brain and Bone Tissue: Preliminary Results From 9 Patients With Normal Renal Function. *Invest. Radiol.* 51, 447–453.
- Murphy P. S., Dzik-Jurasz A. S. K., Leach M. O., Rowland I. J. (2002) The effect of Gd-DTPA on T1-weighted choline signal in human brain tumours. *Magn. Reson. Imaging* 20, 127–130.
- Oksendal A. N., Hals P. A. (1993) Biodistribution and toxicity of MR imaging contrast media. *J. Magn. Reson. Imaging Jmri* 3, 157–165.
- Provencher S. W. (1993) Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn. Reson. Med.* 30, 672–679.
- Prybylski J. P., Maxwell E., Coste Sanchez C., Jay M. (2016) Gadolinium deposition in the brain: Lessons learned from other metals known to cross the blood–brain barrier. *Magn. Reson. Imaging* 34, 1366–1372.
- Puttagunta N. R., Gibby W. A., Smith G. T. (1996) Human in vivo comparative study of zinc and copper transmetallation after administration of magnetic resonance imaging contrast agents. *Invest. Radiol.* 31, 739–742.
- Quattrocchi C. C., Mallio C. A., Errante Y., Cirimele V., Carideo L., Ax A., Zobel B. B. (2015) Gadodiamide and Dentate Nucleus T1 Hyperintensity in Patients With Meningioma Evaluated by Multiple Follow-Up Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Examinations With No Systemic Interval Therapy: *Invest. Radiol.* 50, 470–472.
- Radbruch A., Weberling L. D., Kieslich P. J., Eidel O., Burth S., Kickingereider P., Heiland S., Wick W., Schlemmer H.-P., Bendszus M. (2015) Gadolinium Retention in the Dentate Nucleus and Globus Pallidus Is Dependent on the Class of Contrast Agent. *Radiology* 275, 783–791.
- Ramalho J., Castillo M., AlObaidy M., Nunes R. H., Ramalho M., Dale B. M., Semelka R. C. (2015) High Signal Intensity in Globus Pallidus and Dentate Nucleus on Unenhanced T1-weighted MR Images: Evaluation of Two Linear Gadolinium-based Contrast Agents. *Radiology* 276, 836–844.
- Rasschaert M., Idée J.-M., Robert P., Fretellier N., Vives V., Violas X., Ballet S., Corot C. (2017) Moderate Renal Failure Accentuates T1 Signal Enhancement in the Deep Cerebellar Nuclei of Gadodiamide-Treated Rats: *Invest. Radiol.* 52, 255–264.
- Ratney H., Sdika M., Coenradie Y., Cavassila S., Ormond D. van, Graveron-Demilly D. (2005) Time-domain semi-parametric estimation based on a metabolite basis set. *Nmr Biomed.* 18, 1–13.
- Robert P., Lehericy S., Grand S., Violas X., Fretellier N., Idée J.-M., Ballet S., Corot C. (2015) T1-Weighted Hypersignal in the Deep Cerebellar Nuclei After Repeated Administrations of Gadolinium-Based Contrast Agents in Healthy Rats: Difference Between Linear and Macrocyclic Agents. *Invest. Radiol.* 50, 473–480.

- Robert P., Violas X., Grand S., Lehericy S., Idée J.-M., Ballet S., Corot C. (2016) Linear Gadolinium-Based Contrast Agents Are Associated With Brain Gadolinium Retention in Healthy Rats: *Invest. Radiol.* 51, 73–82.
- Schlemm L., Chien C., Bellmann-Strobl J., Dörr J., Wuerfel J., Brandt A. U., Paul F., Scheel M. (2017) Gadopentetate but not gadobutrol accumulates in the dentate nucleus of multiple sclerosis patients. *Mult. Scler. J.* 23, 963–972.
- Shen Z. W., Chen Y. W., Wang H. Y., Lin Y., He J. K., Liu W. W., Chen F. Y., Wu R. H. (2008) Quantification of Metabolites in Swine Brain by ¹H MR Spectroscopy Using LCModel and QUEST: A Comparison Study, pp. 299–302. IEEE.
- Sherry A. D., Caravan P., Lenkinski R. E. (2009) Primer on gadolinium chemistry. *J. Magn. Reson. Imaging* 30, 1240–1248.
- Shokrollahi H. (2013) Contrast agents for MRI. *Mater. Sci. Eng. C* 33, 4485–4497.
- Smith A. P. L., Marino M., Roberts J., Crowder J. M., Castle J., Lowery L., Morton C., Hibberd M. G., Evans P. M. (2017) Clearance of Gadolinium from the Brain with No Pathologic Effect after Repeated Administration of Gadodiamide in Healthy Rats: An Analytical and Histologic Study. *Radiology* 282, 743–751.
- Smith J. K., Kwok L., Castillo M. (2000) Effects of contrast material on single-volume proton MR spectroscopy. *Ajnr Am. J. Neuroradiol.* 21, 1084–1089.
- Soher B. J., Young K., Bernstein A., Aygula Z., Maudsley A. A. (2007) GAVA: Spectral simulation for in vivo MRS applications. *J. Magn. Reson.* 185, 291–299.
- Stojanov D. A., Aracki-Trenkic A., Vojinovic S., Benedeto-Stojanov D., Ljubisavljevic S. (2016) Increasing signal intensity within the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1W magnetic resonance images in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: correlation with cumulative dose of a macrocyclic gadolinium-based contrast agent, gadobutrol. *Eur. Radiol.* 26, 807–815.
- Tedeschi E., Caranci F., Giordano F., Angelini V., Coccozza S., Brunetti A. (2017) Gadolinium retention in the body: what we know and what we can do. *Radiol. Med. (Torino)* 122, 589–600.
- Tedeschi E., Palma G., Canna A., Coccozza S., Russo C., Borrelli P., Lanzillo R., *et al.* (2016) In vivo dentate nucleus MRI relaxometry correlates with previous administration of Gadolinium-based contrast agents. *Eur. Radiol.* 26, 4577–4584.
- Vanhamme null, Boogaart A null van den, Huffel S null Van (1997) Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *J. Magn. Reson. San Diego Calif* 1997 129, 35–43.
- Weberling L. D., Kieslich P. J., Kickingereder P., Wick W., Bendszus M., Schlemmer H.-P., Radbruch A. (2015) Increased Signal Intensity in the Dentate Nucleus on Unenhanced T1-Weighted Images After Gadobenate Dimeglumine Administration: *Invest. Radiol.* 50, 743–748.
- Wedeking P., Kumar K., Tweedle M. F. (1993) Dose-dependent biodistribution of [¹⁵³Gd]Gd(acetate)_n in mice. *Nucl. Med. Biol.* 20, 679–691.
- Weinreb J. C., Kuo P. H. (2009) Nephrogenic Systemic Fibrosis. *Magn. Reson. Imaging Clin. N. Am.* 17, 159–167.
- Weller A., Barber J. L., Olsen Ø. E. (2014) Gadolinium and nephrogenic systemic fibrosis: an update. *Pediatr. Nephrol.* 29, 1927–1937.
- Yoo R.-E., Sohn C.-H., Kang K. M., Yun T. J., Choi S. H., Kim J., Park S.-W. (2017) Evaluation of Gadolinium Retention After Serial Administrations of a Macrocyclic Gadolinium-Based Contrast Agent (Gadobutrol): A Single-Institution Experience With 189 Patients. *Invest. Radiol.*, 1.

**3^{ème} partie : Etude des effets du
bisphénol A et de ses dérivés
chlorés au niveau hépatique et
cérébral**

Chapitre 5 : Les effets du BPA et de ses dérivés chlorés

5.1. Bisphénol A : un perturbateur endocrinien ubiquitaire

5.1.1. Les voies d'exposition chez l'Homme

Le Bisphénol A [2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane] (BPA) est un composé chimique utilisé principalement comme monomère des polycarbonates et additif des résines époxydes, lesquels trouvent de nombreuses applications industrielles pour la fabrication de produits manufacturés. Les polycarbonates entrent dans la composition des objets du quotidien tels que CD, lunettes, bouteilles en plastiques, vaisselles et certains composites dentaires. Les résines époxydes constituent les revêtements intérieurs des boîtes de conserves et des canettes préservant ainsi le goût des aliments et les protégeant des potentielles contaminations microbiologiques. Le BPA est également utilisé comme révélateur des papiers thermosensibles comme les tickets de caisse et les reçus de cartes bancaires (**Fig. 5.1.**).

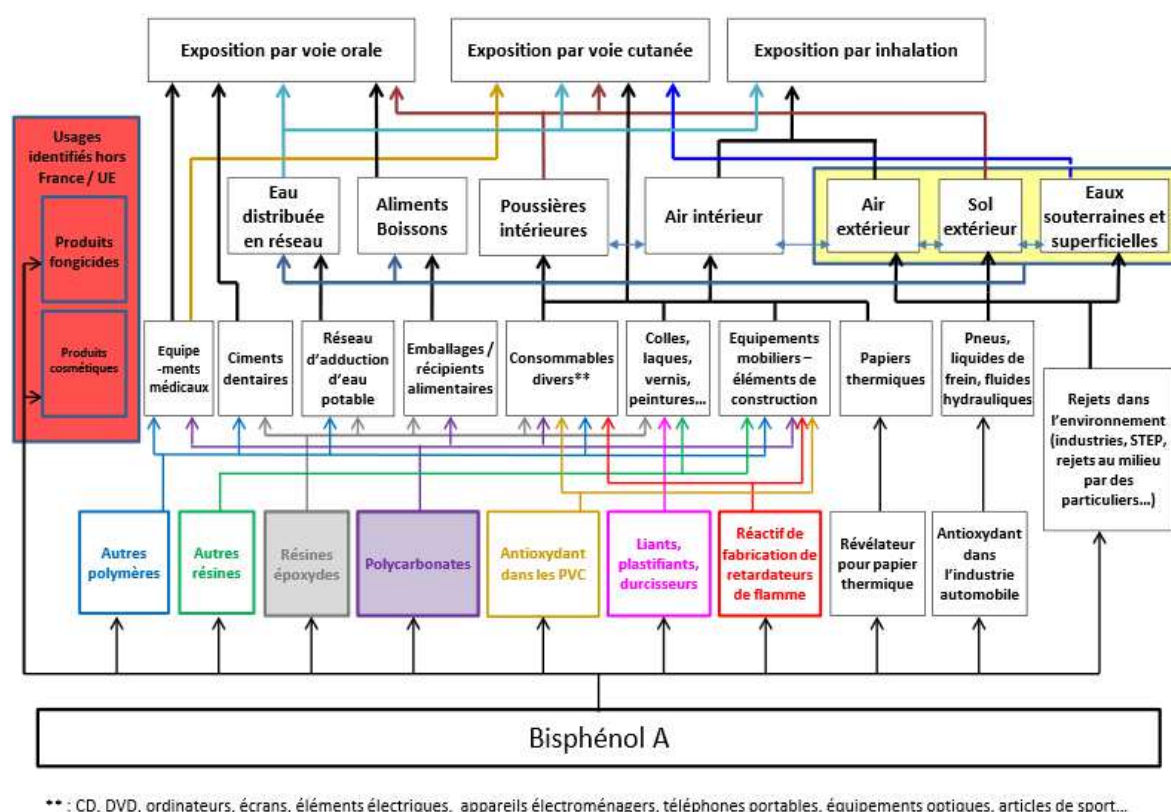


Figure 5.1 : Sources environnementales et voies d'exposition du BPA
Issue de ANSES (2013)

Du fait de sa large variété d'utilisations, la production mondiale du BPA est de 3 millions de tonnes par an et elle est corrélée à une émission dans l'atmosphère de 100 tonnes (Vandenberg et al. 2009). Le BPA se retrouve ainsi dispersé de manière ubiquitaire dans l'environnement et il a été détecté dans l'air, l'eau et le sol.

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Il a été rapporté des concentrations de BPA dans l'air de 2 à 208 ng/m³ (Rudel et al. 2001) avec une demi-vie de photo-oxydation de 0,74 à 7,4 heures (Staples et al. 1998). La concentration de BPA retrouvée dans les stations de traitement de l'eau dans le monde varie de 0,317 ng/L et jusqu'à 1,275 µg/L (Muhamad et al. 2016). La contamination des sols par le BPA dépend de la composition des effluents industriels à proximité ainsi que des déchets rejetés par l'Homme (Corrales et al. 2015).

De plus, par sa présence dans les contenants alimentaires, le BPA peut migrer en petites quantités dans les aliments et les boissons et cela même à température modérée (~60°C). La migration du BPA est engendrée par les étapes de chauffage effectuées lors des procédés de mise en conserve et l'accumulation de BPA dans les produits alimentaires peut se poursuivre pendant la période de stockage à température ambiante (Kang, Kondo, and Katayama 2006).

Par conséquent, l'exposition au BPA chez l'Homme a lieu par différentes voies : ingestion, inhalation et transdermique. L'Anses (Agence Nationale française de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail) estime à plus de 80% l'exposition de la population par l'alimentation, et notamment par les bombonnes d'eau en polycarbonates considérées comme une source importante de l'exposition au BPA.

L'exposition humaine au BPA a été récemment estimée par l'agence européenne de la sécurité alimentaire (European Food Safety Agency ; EFSA) de provenance alimentaires et non-alimentaires (poussières, jouet, papier thermique, cosmétiques) pour les différents groupes d'âge de la population (**Tableau 5.1**). L'ensemble de la population est exposée à une dose totale autour de 1 µg/kg/jour avec une exposition accrue chez les enfants de 3 à 10 ans, les adolescents et les adultes.

L'agence de protection environnementale américaine (US Environmental Protection Agency ; EPA) a fixé la dose tolérable journalière (Tolerable Dose Intake ; TDI) à 50 µg/kg/jour soit à une valeur 100 fois inférieure à la dose sans effet délétère observable (No Observed Adverse Effect Level ; NOAEL). L'EPA a également indiqué une dose de référence orale de 100 µg/L comme concentration totale autorisée dans l'eau de boisson (Willhite 2008). En 2015, l'agence européenne a abaissé la TDI de 50 µg/kg/jour à 4 µg/kg/jour considérant que cette nouvelle dose de référence était 4 fois supérieure aux valeurs d'exposition de la population (EFSA 2015).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Tableau 5.1 : Doses moyennes et élevées d'exposition au BPA (µg/kg/jour) de sources alimentaires et non alimentaires dans différents groupes d'âge de la population.
adapté de EFSA (2015)

Groupe d'âge	Niveau d'exposition	Exposition alimentaire	Exposition non-alimentaire	Exposition totale
Enfants 1 – 5 jours allaités	Moyenne	0,225	-	0,225
	Elevée	0,435		0,435
Enfant 6 jours à 3 mois allaités	Moyenne	0,165	0,009	0,174
	Elevée	0,600	0,015	0,615
Enfant 4 – 6 mois allaités	Moyenne	0,145	0,009	0,154
	Elevée	0,528	0,015	0,543
Enfant 0 – 6 mois au biberon	Moyenne	0,030	0,009	0,039
	Elevée	0,080	0,015	0,095
Enfants 6 – 12 mois	Moyenne	0,375	0,009	0,384
	Elevée	0,857	0,015	0,872
Enfants 1 – 3 ans	Moyenne	0,375	0,007	0,382
	Elevée	0,857	0,012	0,869
Enfants 3 – 10 ans	Moyenne	0,290	0,064	0,354
	Elevée	0,813	0,445	1,258
Adolescents 10 – 18 ans	Moyenne	0,159	0,130	0,289
	Elevée	0,381	1,068	1,449
Femmes 18 – 45 ans	Moyenne	0,132	0,084	0,216
	Elevée	0,388	0,675	1,063
Hommes 18 – 45 ans	Moyenne	0,126	0,084	0,210
	Elevée	0,335	0,675	1,010
Adultes 45 – 65 ans	Moyenne	0,126	0,084	0,210
	Elevée	0,341	0,675	1,016
Personnes âgées (>65 ans)	Moyenne	0,116	0,084	0,200
	Elevée	0,375	0,675	1,050

Du fait, de la présence ubiquitaire du BPA dans l'environnement et des effets suspectés sur la santé, des gestes de prévention au quotidien ont été recommandés par l'ANSES: (i) éviter le chauffage des récipients en plastique polycarbonate (micro-ondes, bain-marie, etc.), (ii) limiter la consommation d'aliments en boîtes de conserves et préférer les bouteilles en verre. Les récipients en polycarbonate sont identifiés par le sigle « PC » et les objets contenant probablement du polycarbonate sont indiqués avec un triangle entourant le chiffre « 7 ». Par principe de précaution, il a été interdit la fabrication, l'importation, l'exportation et la mise sur le marché de biberons à base de BPA depuis le 30 juin 2010 en France et depuis juin 2011 à l'échelle européenne ; ils ont été remplacés par des biberons en verre ou en polypropylène. Cette mesure a été étendue à tous les contenants alimentaires pour l'ensemble de la population depuis le 1^{er} janvier 2015 et tout en s'assurant de produits de substitution sûrs et adaptés.

5.1.2. Les impacts biologiques du BPA

5.1.2.1. Perturbateur endocrinien

Le BPA appartient à la catégorie des perturbateurs endocriniens c'est-à-dire « une substance ou un mélange de substances, qui altèrent les fonctions du système endocrinien et de ce fait induisent des effets néfastes dans un organisme intact, chez sa progéniture ou au sein de populations » (Organisation Mondiale de la Santé, 2002). Les perturbateurs endocriniens ont trois modes d'action distincts : (i) mimer l'action des hormones endogènes, (ii) bloquer les récepteurs hormonaux ou (iii) modifier les concentrations des hormones endogènes.

Le BPA peut se fixer sur des récepteurs au niveau cellulaire et au niveau nucléaire (**Fig. 5.2**) (Wetherill et al. 2007; Vandenberg et al. 2009). Le BPA a des propriétés de xénoœstrogène car il peut se fixer sur les récepteurs œstrogéniques (ER α et ER β) mais avec une affinité 1000 à 10000 fois moindre que le 17 β -estradiol (hormone endogène) (Kuruto-Niwa, Terao, and Nozawa 2002; Takemura et al. 2005). Le BPA est également un agoniste des récepteurs transmembranaires de l'œstrogène : le récepteur transmembranaire des œstrogènes (mER) qui est similaire à ER α et le récepteur transmembranaire couplé aux protéines G 30 (GPR30) (Watson et al. 2005; Thomas and Dong 2006). A la différence des ER, ces deux récepteurs ont des actions stéroïdiennes non génomiques.

Le BPA peut aussi se fixer sur des récepteurs non-œstrogéniques tels que :

- le récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR) lequel est un facteur de transcription activé par la fixation des ligands et qui semble réguler d'autres récepteurs dont les ER (Krüger, Long, and Bonefeld-Jørgensen 2008).
- le récepteur androgénique (AR) dont le BPA agit comme un anti-androgène modéré en entrant en compétition avec son ligand endogène le 5 α -hydrotestostérone (H. J. Lee 2003).
- le récepteur γ apparenté aux récepteurs aux œstrogènes (ERR γ) dont les ligands endogènes sont inconnus ; il semble impliqué dans la différenciation et la maturation du cerveau fœtal (Takayanagi et al. 2006).
- le récepteur des hormones thyroïdiennes (TR) dont le BPA agit comme un antagoniste en empêchant la fixation du ligand endogène (T3) (Moriyama et al. 2002).

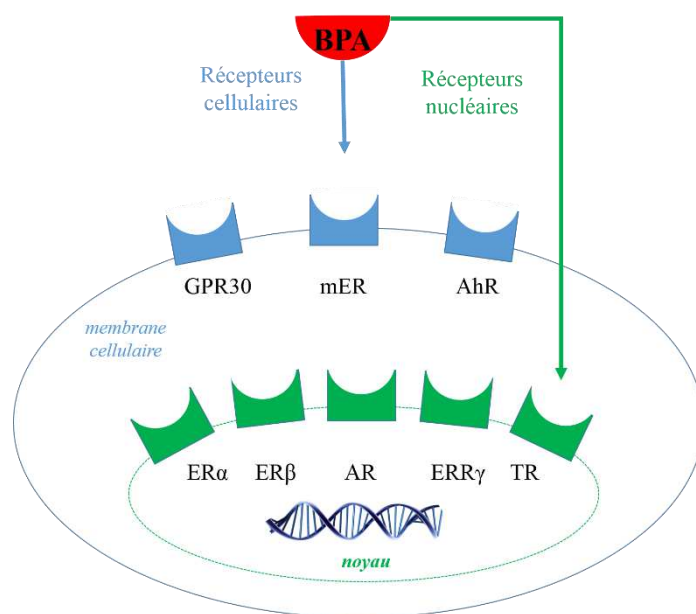


Figure 5.2 : Récepteurs cibles au niveau cellulaire et nucléaire du BPA

Le BPA induit des perturbations sur l'organisme en suivant une courbe non-monotone. Classiquement, les effets des xénobiotiques sont décrits comme suivant une courbe monotone dose-réponse. Cependant, les perturbateurs endocriniens ne suivraient pas ce principe et pourraient provoquer à de faibles doses des effets plus prononcés que ceux observés à fortes doses (ANSES 2013). Ce phénomène peut s'expliquer par les mécanismes d'action du BPA avec les récepteurs endocriniens (cellulaires et nucléaires). En effet, le BPA peut se lier à différents récepteurs avec des affinités différentes induisant plusieurs voies de signalisations intracellulaires selon la dose. Par exemple, le BPA a une affinité 6,6 fois plus élevée pour le récepteur ERβ que le récepteur ERα (Kuiper et al. 1997). Une autre hypothèse est celle d'un rétrocontrôle négatif par l'organisme à forte dose par la diminution de l'activité ou du nombre de récepteurs cibles (similaire à celle du cortisol par l'axe hypothalamo-hypophysaire-corticosurrénale) (ANSES 2013).

5.1.2.2. Impact du BPA sur la santé

Le BPA exerce une pléiotropie de perturbations sur l'organisme. Il est principalement suspecté de compromettre le système reproductif, le métabolisme, la glande thyroïde, le système immunitaire, le foie et le système nerveux central. *Les effets au niveau hépatique et cérébral ont été développés dans les parties 5.2 (p.125) et 5.3. (p.127) de ce chapitre.*

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Du fait de l'exposition chronique à faible dose au BPA de l'ensemble de la population, la période d'exposition (gestation, lactation, puberté, etc.) joue également un rôle clé dans les effets biologiques. Il a été formulé la théorie de « l'origine fœtale des pathologies adultes » qui stipule que des expositions délétères pendant la période du développement intra-utérin peuvent induire des perturbations physiopathologiques à l'âge adulte et conduire à une augmentation de l'incidence de maladies à l'âge adulte (Barker 1998; Alonso-Magdalena, Quesada, and Nadal 2015).

Afin d'étudier ce phénomène, il est mis en place deux types de protocole dans les modèles animaux : (i) une exposition prénatale pendant la gestation incluant la période du développement embryonnaire et fœtale ; (ii) une exposition périnatale pendant la gestation et la lactation.

Les effets reprotoxiques : Le BPA a été évalué comme un reprotoxique de niveau 1B correspondant à la catégorie des substances présumées toxiques pour la reproduction humaine (ANSES 2013). En effet, le BPA à de faibles doses d'exposition induit des perturbations sur le système reproducteur des rongeurs, il a été ainsi observé : (i) des anomalies de la croissance prostatique ainsi qu'une diminution de la qualité et de la mobilité des spermatozoïdes chez les mâles ; (ii) des altérations de l'ovogenèse et de la prolifération des cellules endométriales de l'utérus chez les femelles (Caserta et al. 2014; Peretz et al. 2014). L'exposition au BPA est également suspectée d'augmenter les risques de développer des cancers hormono-dépendants de la prostate, du testicule, du sein et de l'utérus (Gao et al. 2015).

Les effets métaboliques : Il a été récemment fait l'hypothèse qu'une exposition précoce au BPA peut contribuer comme facteur de risque à l'augmentation de la prévalence du syndrome métabolique qui inclut l'obésité, le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires (vom Saal et al. 2012; Chevalier and Fénichel 2015; P. Alonso-Magdalena, Quesada, and Nadal 2015). Des études épidémiologiques montrent une forte corrélation entre la concentration de BPA urinaire et l'obésité, l'insulinoresistance, le diabète de type 2 (Shankar and Teppala 2011; Carwile and Michels 2011; Wang et al. 2012).

Chez les rongeurs adultes, d'autres altérations métaboliques ont été rapportées telles qu'une perturbation de la voie de signalisation de l'insuline dans les tissus périphériques (muscles et foie) (Batista et al. 2012), une dérégulation dans l'expression des gènes des lipides hépatiques conduisant à une hypercholestérolémie et une intolérance au glucose (Marmugi et al. 2014),

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

une hyperglycémie et une hyperlipidémie associée à des changements dans les paramètres du stress oxydatif (Moghaddam, Samarghandian, and Farkhondeh 2015).

Il a été mis en évidence qu'une exposition au BPA pendant la période du développement fœtal peut conduire à des changements métaboliques tels que l'hypercholestérolémie (Miyawaki et al. 2007), la réduction de la sensibilité à l'insuline (Alonso-Magdalena et al. 2010) et une altération de l'homéostasie glucidique (Angle et al. 2013; García-Arevalo et al. 2014).

Les effets sur le système thyroïdien : Il a été mis en évidence *in vitro* que le BPA perturbe l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et dans la synthèse des hormones thyroïdiennes (Gentilcore et al. 2013). Chez les rats exposés pendant la période périnatale, le BPA induit un hyperthyroïdisme transitoire se traduisant par une augmentation sérique de l'hormone thyroxine (T4) (Zoeller, Bansal, and Parris 2005; X. Xu et al. 2007).

Les hormones thyroïdiennes sont importantes pour le développement cérébral car elles ont une action sur la prolifération, la migration et l'organisation neuronale ainsi que sur les fonctions cognitives (Luton et al. 2007). Il a été mesuré une augmentation transitoire du gène neuronal sensible aux hormones thyroïdiennes (RC3/neurogranin) dans l'hippocampe de rats exposés au BPA pendant la période périnatale (Zoeller, Bansal, and Parris 2005).

Chez les enfants, il a été mis en évidence une corrélation entre l'augmentation de la concentration du BPA urinaire et une diminution du volume de la glande thyroïde ainsi qu'un risque accru de développer de multiples nodules (N. Wang et al. 2015). Chez l'adulte, la concentration élevée de BPA urinaire semble être associée à une variation des hormones thyroïdiennes telles que la diminution de TSH (Thyréostimuline ; hormone régulatrice hypophysaire) et l'augmentation de triiodothyronine (T3) (T. Wang et al. 2013).

Les effets sur le système immunitaire : Il a été récemment recensé l'impact délétère du BPA sur le phénotype des cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes B et CD4⁺ (voir revue : Rogers, Metz, and Yong 2013). Le BPA semble également jouer un rôle dans la promotion de l'auto-immunité (asthme, diabète) (Jochmanová et al. 2015). Des mesures générales de la fonction immunitaire chez les adultes et les enfants ont montré une corrélation entre l'exposition au BPA et l'augmentation du cytomégalovirus, lequel est un marqueur précoce d'une dépression du système immunitaire (Clayton et al. 2010).

5.2. Les effets du BPA au niveau hépatique

5.2.1. La détoxification du BPA par le foie

Le foie joue un rôle essentiel dans la détoxification du BPA. Les principaux mécanismes impliqués dans l'élimination hépatique du BPA sont les voies de la phase 2 du métabolisme : (i) la glucurono-conjugaison du BPA par l'enzyme UDP-glucuronyl-transférase (UGT) ; (ii) la sulfatation par l'enzyme phénol sulfotransférase (ST). Les produits conjugués (BPA-glucuronide et BPA-sulfate) sont « inactifs » pour les récepteurs œstrogéniques (**Fig. 5.3**). La transformation hépatique rend le BPA plus hydrophile (polaire) et facilite ainsi sa solubilisation et son élimination par excrétion rénale (Vandenberg et al. 2009).

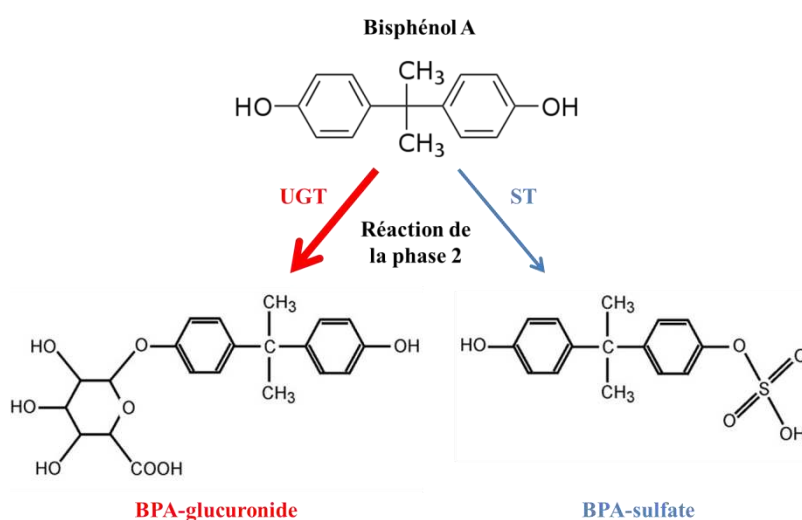


Figure 5.3 : Voies métaboliques majeures du BPA chez les mammifères
d'après ANSES (2011)

Les prélèvements urinaires chez les adultes montrent une proportion plus importante de BPA-glucuronide (69,5%) comparée au BPA-sulfate (21%) et au BPA non conjugué (9,5%) (Ye et al. 2005). A la différence de l'Homme, le BPA-glucuronide chez les rongeurs n'est pas directement éliminé dans l'urine. En effet, Le BPA-glucuronide (404 Da) a une taille supérieure au seuil d'excrétion urinaire du rat (350 Da) alors que ce seuil est plus élevé chez l'Homme (550 Da) (Ginsberg and Rice 2009). Par conséquent, le BPA-glucuronide est excrété dans la bile chez les rongeurs et il peut être déconjugué par une glucuronidase présente dans l'intestin grêle et le colon (Sakamoto et al. 2002).

Les conséquences de l'exposition prénatale au BPA pourraient être accrues du fait de la faible efficacité de la détoxification hépatique chez les fœtus au début de la grossesse (Corbel et al.

2015). Dans le foie fœtal humain, UGT est présente à une concentration cinq fois inférieure à celle d'un foie adulte (Cappiello et al. 2000). Les fœtus et les nouveau-nés de souris exposés pendant la période périnatale par voie orale ou sous-cutanée ont des concentrations similaires de BPA plasmatique liées à la faible expression de l'enzyme hépatique UGT (Taylor, Welshons, and vom Saal 2008). Dans un modèle d'exposition périnatale de mouton, il a été mis en évidence que le BPA-glucuronide peut être déconjugué par une glucuronidase (Corbel et al. 2015).

5.2.2. Le BPA et la stéatose hépatique

De récentes études mettent en évidence que l'exposition au BPA peut induire une perturbation du métabolisme lipidique et conduire au développement de la stéatose hépatique. La stéatose hépatique est classiquement causée par un déséquilibre dans le métabolisme des acides gras conduisant à leurs accumulations dans les hépatocytes. Cela se traduit par de larges vacuoles (macrovésicules) ou une multitude de gouttelettes lipidiques (microvésicules) accompagnées par les phénomènes de stress oxydatif, de peroxydation lipidique et de dysfonction mitochondriale (Begriche et al. 2006).

Les données *in vitro* obtenues sur des cellules hépatiques ont montré que le BPA peut favoriser le stockage lipidique dans les hépatocytes suite à des perturbations mitochondriales et à l'inflammation (Huc et al. 2012) ainsi qu'une interférence dans l'oxydation et la synthèse des lipides (Grasselli et al. 2013).

Les études *in vitro* sont en accord avec les expériences *in vivo*. Pendant la période périnatale ou à l'âge adulte, l'exposition au BPA à une dose inférieure ou égale à la dose journalière tolérable (50 µg/kg/jour) peut favoriser la stéatose hépatique chez les rongeurs avec une augmentation des triglycérides hépatiques et une régulation à la hausse des gènes lipogéniques (Marmugi et al. 2012; Jiang et al. 2014).

L'exposition périnatale avec un régime normal chez le rat peut conduire à une stéatose hépatique microvésiculaire chez la descendance avec un dysfonctionnement mitochondrial et un stress oxydatif (élévation des espèces réactives de l'oxygène) (Jiang et al. 2014). Il a été également rapporté dans la littérature que les lapins adultes exposés au BPA (400 µg/kg/jour pendant 12 semaines) présentent une stéatose légère avec une infiltration de cellules inflammatoires corrélée à une surexpression des gènes impliqués dans le stress oxydatif, le métabolisme lipidique et l'inflammation (Fang et al. 2014).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Les mécanismes moléculaires de l'action du BPA sur le développement de la stéatose hépatique ne sont pas clairement établis. L'implication des mécanismes épigénétiques dans ce phénomène a été récemment proposée. En effet, l'exposition périnatale au BPA semble induire une hypométhylation des gènes lipogéniques qui persiste dans le génome hépatique au-delà de la période d'exposition (Shimpi et al. 2017).

5.3. Les effets du BPA au niveau cérébral

5.3.1. Les modes d'action du BPA dans le cerveau

Lors d'une exposition à l'âge adulte ou lors de la période du développement cérébral, des effets délétères ont été rapportés dans la littérature au niveau morphologique, neurochimique et comportemental. Le risque est accru lorsque l'exposition a lieu pendant la période périnatale (gestation et lactation) du fait de la déficience en UGT fœtal. De plus, les propriétés lipophiles du BPA facilitent son passage à travers la barrière fœto-placentaire et la barrière hématoencéphalique (Nishikawa et al. 2010; Sun et al. 2002). Il a été mis en évidence que le BPA s'accumule préférentiellement dans le cerveau fœtal (Doerge et al. 2011).

L'impact du BPA est très largement étudié dans deux structures clés : l'hippocampe et le cortex cérébral. L'hippocampe appartient au système limbique et il est impliqué dans la mémoire déclarative et la navigation spatiale. Le gyrus dentelé de l'hippocampe et la zone subventriculaire sont les deux seules structures capables de neurogénèse adulte c'est-à-dire la prolifération de nouveaux neurones. Le cortex cérébral est la couche la plus externe du cerveau (substance grise) contenant les corps cellulaires et l'arbre dendritique des neurones ainsi que de cellules gliales. Dans une moindre mesure, le striatum semble également impacté par le BPA et il joue un rôle dans le système de récompense dopaminergique, la mémoire procédurale et les mouvements volontaires (Vibert 2011).

5.3.1.1. Les altérations morphologiques

Lors d'une exposition prénatale au BPA (400 µg/kg/jour), la morphologie neuronale (la longueur, les ramifications et le nombre de dendrites basales) au niveau des neurones de l'hippocampe est réduite chez les jeunes souris âgées de 3 semaines et cette diminution des épines dendritiques persiste chez les souris âgées de 14 mois (Kimura et al. 2016). De manière similaire, une diminution des épines dendritiques a été observée dans l'hippocampe chez des rats exposés à de fortes doses de BPA (0,15 ou 7,50 mg/kg/jour) lors de la période

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

périnatale et prolongée jusqu'à l'âge adulte (Liu et al. 2016). A l'inverse, lors d'une exposition périnatale chez des rongeurs à une faible dose de BPA ($\leq 50 \mu\text{g/kg/jour}$), il a été observé une augmentation des épines dendritiques au niveau du cortex cérébral et de l'hippocampe (Kumar and Thakur 2014; Kelly, Opanashuk, and Majewska 2014). Au vue de la littérature, il apparait que l'exposition au BPA pendant la période périnatale a un impact au niveau des épines dendritiques et cela pourrait conduire à une altération de la connectivité neuronale et des fonctions cognitives.

Le BPA inhibe la différenciation des cellules progénitrices des oligodendrocytes (induite par l'hormone thyroïdienne T3), lesquelles sont impliquées dans le processus de myélinisation dans le cerveau (Seiwa et al. 2004). L'exposition périnatale chez le rat ($40 \mu\text{g/kg/jour}$) diminue significativement les cellules progénitrices des oligodendrocytes de l'hippocampe (Tiwari et al. 2015).

Le développement du cortex cérébral est impacté à faible dose de BPA ($20 \mu\text{g/kg/jour}$), cela se traduit par une perturbation de l'histogenèse néocorticale et des connections thalamo-corticales (Nakamura et al. 2007). Cela peut être mis en lien avec la diminution de la migration neuronale dans le cortex cérébral observée chez des embryons de souris exposées au BPA ($40 \mu\text{g/kg/jour}$).

Le striatum possède des récepteurs pour l'œstrogène et il est donc une cible potentielle pour le BPA (Küppers and Beyer 1999). De plus, le striatum pourrait être altéré par la formation de radicaux hydroxyles induite par le BPA (Obata and Kubota 2000).

5.3.1.2. Les perturbations neurochimiques

Le BPA induit une perturbation des neurotransmetteurs monoaminergiques (dopamine, sérotonine). Une augmentation de la dopamine et de la sérotonine dans le striatum a été mesurée chez des souris exposées prénatalement au BPA ($20 \mu\text{g/kg/jour}$) (Itoh, Yaoi, and Fushiki 2012; Nakamura et al. 2010). Lors d'une exposition prénatale au BPA ($400 \mu\text{g/kg/jour}$) chez des singes, il a été observé une altération des synapses excitatrices dans l'hippocampe et la perte des neurones dopaminergiques dans le mésencéphale (Elsworth et al. 2013).

Des mesures par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ont mis en évidence chez des souris exposées prénatalement au BPA ($400 \mu\text{g/kg/jour}$) des variations du glutamate

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

et du GABA dépendant des structures cérébrales : cortex cérébral, ganglions de la base, amygdale, hippocampe, hypothalamus et le striatum (Ogi et al. 2015).

Une étude métabolomique par RMN du proton sur des échantillons de cerveaux entiers de souris exposées en période périnatale (25 µg/kg/jour) a mis en évidence une diminution de GABA et du glutamate accompagnée de variations d'acides aminés (aspartate et glycine) (Cabaton et al. 2013). La seule étude de ¹H SRM *in vivo* rapporte une augmentation du ratio glutamate/aspartate au niveau de l'hippocampe de souris exposées pendant la période périnatale au BPA (70µg/kg/jour) et pourrait refléter l'altération de la fonction mitochondriale (N. Kunz et al. 2010).

5.3.1.3. Les modifications comportementales

Des modifications comportementales induites par l'exposition au BPA ont été rapportées dans la littérature concernant le dimorphisme sexuel, la mémoire, l'activité motrice et l'anxiété. Une revue a été récemment réalisée concernant les effets de l'exposition au BPA *in utero* et des troubles neurocomportementaux chez les enfants tels que l'anxiété, la dépression, un déficit de l'attention, l'hyperactivité et l'agressivité (Mustieles et al. 2015).

La différenciation sexuelle (ou dimorphisme) est largement contrôlée par les hormones stéroïdes sexuelles (androgènes et œstrogènes). Le BPA compromet le dimorphisme sexuel au sein de l'hypothalamus, lequel est impliqué dans le contrôle du système reproducteur et le comportement sexuel ainsi que dans la cognition, la mémoire et les émotions (voir revue : Negri-Cesi 2015). L'exposition au BPA (1,5 mg/kg/jour) pendant la période périnatale chez le rat altère le dimorphisme sexuel du système nerveux central (Kubo et al. 2001). En effet, il a été observé une démasculinisation des mâles et une déféminisation des femelles dans les tests comportementaux corrélées à des variations du nombre de cellules dans le locus coeruleus (noyau sous-cortical situé dans le tronc cérébral).

Le BPA induit un déficit dans la mémoire spatiale chez les rongeurs en lien avec des altérations morphologiques au sein l'hippocampe (une diminution des branchements dendritiques et de la neurogénèse) (Kim et al. 2011; Liu et al. 2016). Chez les singes adultes, l'exposition au BPA (50 µg/kg/jour pendant 30 jours) cause une altération de la mémoire de travail qui est liée à une perte des synapses excitatrices dans l'hippocampe et le cortex préfrontal (Elsworth et al. 2015). Il a été mis en évidence que l'exposition perinatale au BPA (20 µg/kg/jour) cause une hypoactivité chez les souris, laquelle s'accompagne de

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

perturbations de la migration neuronale du cortex cérébral et de la variation des monoamines dans le striatum (Itoh, Yaoi, and Fushiki 2012).

Le BPA semble induire une augmentation de l'anxiété chez les rongeurs exposés lors de la période périnatale ou l'âge adulte. Plusieurs hypothèses de mécanismes sous-jacents ont été proposées telles qu'une réduction de l'acétylcholinestérase (enzyme de dégradation de l'acétylcholine) dans l'hippocampe, une diminution des récepteurs métabotropiques du glutamate au sein de l'hippocampe ou un déséquilibre du ratio des synapses excitatrices/inhibitrices dans le cortex cérébral et l'hippocampe (Luo et al. 2013; R. Zhou et al. 2015; Kumar and Thakur 2017).

5.3.2. Les connexines 43 et le BPA

Compte tenu des modifications morphologiques, neurochimiques et comportementales précédemment décrites, nous avons souhaité explorer dans le cadre de ces travaux de thèse l'hypothèse des connexines comme cibles potentielles du BPA dans le cerveau.

5.3.2.1. Définition et rôles des connexines

Les jonctions communicantes sont des canaux intercytoplasmiques formés par l'assemblage de 2 connexons (ou hémicanaux). Chaque connexon est constitué de 6 connexines. Les connexines (Cx) sont des protéines transmembranaires qui sont classées en 21 sous-types caractérisées par leur poids moléculaire en kDa (e.g. Cx 43 a un poids moléculaire de 43 kDa). Un hémicanal peut être composé de 6 connexines identiques (homomérique) ou différentes (hétéromérique) (**Fig. 5.4**) (Laird 2006).

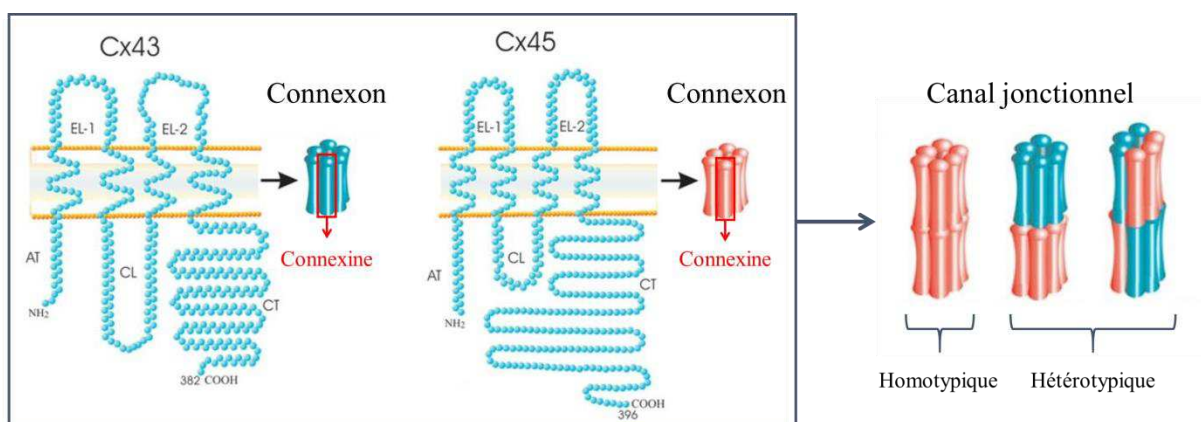


Figure 5.4 : La structure des canaux jonctionnels
(Issue de Laird 2006)

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

L'expression en connexines varie en fonction du type cellulaire. L'expression des connexines au sein des cellules cérébrales est la suivante : les neurones (Cx36, Cx45), les astrocytes (Cx26, Cx30 et Cx43), la microglie (Cx32, Cx36 et Cx43) et les oligodendrocytes (Cx29, Cx32 et Cx47) (**Fig. 5.5**) (Orellana, Giaume, and Saez 2011).

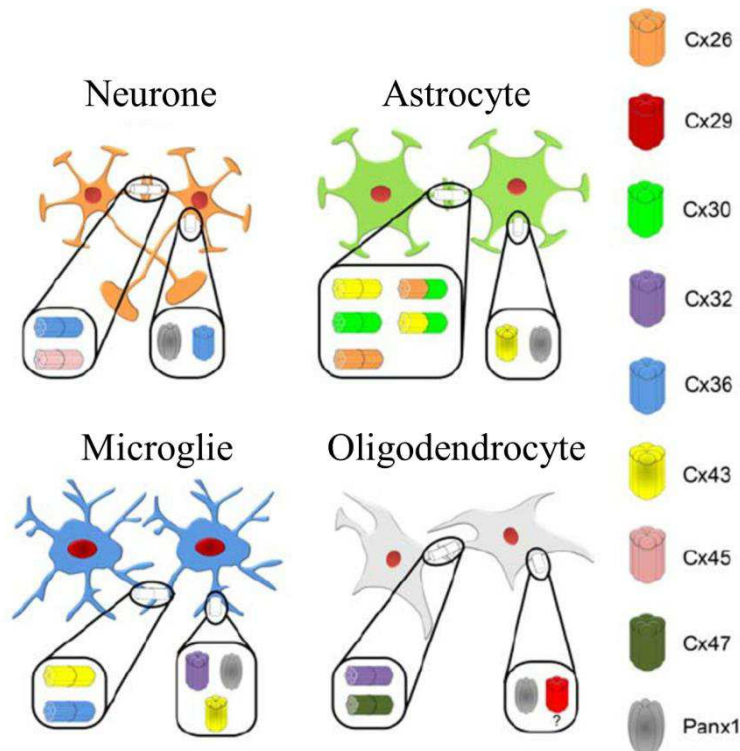


Figure 5.5 : Distribution des connexines (Cx) dans les cellules cérébrales
(Issue de Orellana, Giaume, and Saez 2011)

Les canaux jonctionnels permettent le passage intercellulaire de petites molécules hydrophiles (<1200 Da) telles que les seconds messagers, les ions, les nucléotides. Ces canaux jonctionnels sont impliqués dans le développement fœtal, le maintien de l'homéostasie cellulaire (e.g. ions, pH), le contrôle du cycle cellulaire et le cancer (e.g. gliomes : diminution de la prolifération ou augmentation de la migration) (voir thèse : Chepied 2015). Il est à noter que l'absence de Cx43 chez les souris KO induit des malformations cardiaques létales après la naissance.

5.3.2.2. Impact du BPA sur la connexine 43

La connexine 43 est principalement exprimée au niveau des astrocytes qui sont le type cellulaire majoritaire au niveau cérébral. Il a été montré que les astrocytes peuvent moduler la transmission synaptique et la plasticité en libérant des substances neuroactives

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

(gliotransmetteurs) ou capturer et diffuser les neurotransmetteurs via le réseau des jonctions communicantes (Pannasch et al. 2012; Stehberg et al. 2012).

Or, il a été rapporté dans la littérature que plusieurs substances reprotoxiques (pentachlorophénol, dieldrine, dinitrobenzène, chlorure de cadmium, cisplatine, gossypol, tert-octylphénol, etc.) ont une action inhibitrice sur les protéines membranaires Cx43 en diminuant leurs expressions et en induisant une localisation cytoplasmique aberrante (Fiorini et al. 2004).

De plus, il a été mis en évidence que le BPA est capable d'inhiber les jonctions communicantes au niveau des cellules de Sertoli (tube séminifères des testicules) en induisant une baisse de l'expression des Cx43 et en altérant sa localisation membranaire (Salian, Doshi, and Vanage 2009; Li et al. 2009). De manière similaire, le BPA altère les Cx43 des cellules épithéliales de glandes mammaires de rat (I.-K. Lee and Rhee 2007). Il a été également rapporté que le BPA inhibe les hémicanaux de Cx46 présents au niveau cardiaque (Oh 2015).

L'expression et/ou le fonctionnement des jonctions communicantes apparaissent comme une cible potentielle du BPA. Il serait important d'explorer cette hypothèse des Cx comme cible du BPA pour expliquer les effets observés au niveau cérébral chez les modèles animaux. Dans le cadre de ces travaux de thèse, il a été évalué *in vivo* la sensibilité de la Cx43 au BPA et à ses dérivés chlorés lors du développement cérébral. Pour cela, il a été utilisé un modèle de souris exposées lors la période périnatale à ces polluants et présentant un niveau d'expression « sauvage » ou hétérozygote pour la connexine 43.

5.4. Les dérivés chlorés du BPA

5.4.1. Formation des dérivés chlorés dans l'eau potable

La structure moléculaire du BPA consiste en des atomes de carbones centraux tétraèdres avec deux groupes méthyles et deux groupes phénols. Le Bisphénol A est un composé modérément soluble dans l'eau (120–300 mg/L) (Corrales et al. 2015). Des prélèvements de 291 échantillons d'eau du robinet potable ont été effectués en France et le BPA a été mesuré pour une gamme de concentration de 9 ng/L à 50 ng/L dans 5% des échantillons (Colin et al. 2014).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Lors du traitement de l'eau potable par l'hypochlorite de sodium, le BPA contaminant présent dans l'eau va subir une chloration. Cela a pour conséquence la formation spontanée de dérivés chlorés du BPA par attaque électrophile des groupes phénoliques du BPA (Hu, Aizawa, and Ookubo 2002; Yamamoto and Yasuhara 2002).

Ces dérivés chlorés du BPA sont monochlorés (3-ClBPA), dichlorés sur un phénol ou les deux phénols (3,5-dichloroBPA et 3,3'-dichloroBPA) ou trichlorés (3,3',5-trichloroBPA) (**Fig. 5.5**). Le BPA tétrachloré peut être détecté dans l'eau et il est utilisé dans la fabrication industrielle comme retardateurs de flammes. En effet, il est ajouté dans les matériaux plastiques pour supprimer le processus de combustion (Polo et al. 2006).

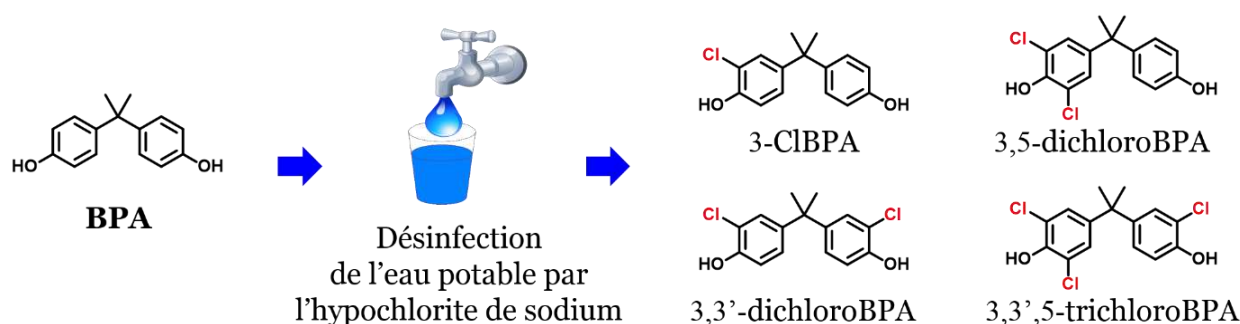


Figure 5.5 : Les dérivés chlorés du bisphénol A
(adapté de Viñas, Goldblum, and Watson 2013)

En Chine, les dérivés chlorés du BPA ont été plus fréquemment détectés dans les usines de traitements que dans les eaux de source. Les fréquences de détection et les concentrations des dérivés chlorés du BPA dans l'eau de boisson sont : 97% et 0,2 à 26,7 ng/L pour le BPA monochloré, 98% et <0,05 à 6,3 ng/L pour les BPA dichloré, 60%, <0,05 à 7,7 ng/L pour le BPA trichloré, 50% et <0,02 à 4,9 ng/L pour le BPA tétrachloré (Fan et al. 2013). La concentration des dérivés chlorés du BPA dans les stations de traitement de l'eau en France (région de Poitiers) sont en dessous du seuil de détection (Dupuis et al. 2012).

Dans les effluents à proximité d'usines de fabrication de papier thermique, la concentration peut atteindre jusqu'à 2 µg/L (Fukazawa et al. 2001). Contrairement au BPA non-chloré, les dérivés polychlorés du BPA sont biodégradés très lentement. En effet, le 3,3'-dichloroBPA a une demi-vie de 7 jours alors que le BPA et le BPA monochloré sont biodégradés en seulement une journée (Fukazawa et al. 2001).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Ces dérivés chlorés ont également été détectés dans les papiers en contact avec les aliments (e.g. filtre de café) à une concentration de 19 pg/g pour le BPA monochloré et 3 pg/g pour le BPA dichloré (Y. Zhou et al. 2015). Cela est lié au recyclage du papier contenant du BPA et au processus de blanchissement du papier. Une autre source possible des dérivés chlorés sont les produits d'entretien ménagers et d'hygiène personnelle contenant du chlore, dans lesquels des résidus de BPA sont fréquemment retrouvés (Dodson et al. 2012).

5.4.2. La bioaccumulation des dérivés chlorés du BPA chez l'Homme

Les dérivés ont été détectés chez l'Homme dans plusieurs tissus et liquides tels que le tissu adipeux, le placenta, le lait maternel et l'urine (**Tableau 5.2**). Dans ces échantillons, les dérivés dichlorés BPA sont détectés plus fréquemment et à des concentrations plus élevées que les autres dérivés chlorés. Il a été également rapporté que les dérivés monochlorés et dichlorés sont plus fréquemment détectés dans les embryons humains que le BPA et ils ont été corrélés à un transfert maternel élevé (Mo Chen et al. 2016).

Tableau 5.2 : Concentrations des dérivés chlorés dans les tissus et les liquides humain (liste non exhaustive)

	BPA	MCBPA	3,3'-DCBPA	3,5-DCBPA	3,3',5-TCBPA
Tissu adipeux (Fernandez et al. 2007) (n=20)	5,83 ng/g (55%)	3,05 ng/g (15%)	9,21 ng/g (80%)		0,74 ng/g (10%)
Placenta (Jiménez-Díaz et al. 2010) (n=49)	5,7 à 22,2 ng/g (20%)	5,1 à 21,4 ng/g (51%)	4,0 à 31,2 ng/g (49%)		4,0 à 31,2 ng/g (49%)
Lait maternel (Migeot et al. 2013) (n=21)	1,87 ng/mL (90%)	<LOQ	1,87 ng/mL (52%)	1,56 ng/mL (100%)	0,68 ng/mL (19%)
Urine (Liao and Kannan 2012) (n=31)	<LOQ–18,7 ng/mL (97%)	<LOQ–1,68 ng/mL (16%)	<LOQ–1,06 ng/mL (19%)		<LOQ–0,67 5 ng/mL (19%)
Embryon (Mo Chen et al. 2016) (n=25)	11,86 ng/g (36%)	3,70 ng/g (80%)	4,30 ng/g (72%)		1,45 ng/g (16%)

< LOQ: Limite de quantification

5.4.3. Les propriétés des dérivés chlorés du BPA

Les dérivés chlorés du BPA possèdent un caractère plus lipophile que le BPA (Andra, Charisiadis, et al. 2015; Fernandez et al. 2007), la détoxification hépatique par glucurono-conjugaison semble peu probable (Migeot et al. 2013). Il semble néanmoins éliminé par excrétion rénale du fait de sa détection dans l'urine.

A l'aide d'un système de gène rapporteur fluorescent, il a été mis en évidence une activité œstrogénique plus importante pour 3-ClBPA, 3,3'-dichloroBPA et 3,5-dichloroBPA que le composé parent BPA et les autres dérivés chlorés (Kuruto-Niwa, Terao, and Nozawa 2002). Les dérivés monochloré et 3,3'-dichloré du BPA montrent également une affinité plus élevée aux récepteurs œstrogéniques ER α que le BPA alors que l'affinité est similaire pour ER β (Takemura et al. 2005). Dans cette même étude, il a été mesuré l'activité utérotrophique de ces composés chez des rates âgées ovariectomisées. Elles présentent des poids de l'utérus comparables à la suite d'un traitement à forte dose au BPA ou à ses dérivés chlorés (100 mg/kg pendant 3 jours). De plus, il a été mis en évidence que le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes γ (PPAR γ) est une cible pour les dérivés trichlorés et tétrachlorés du BPA (Riu et al. 2011).

5.5. Conclusion

Il existe actuellement peu d'études sur les effets biologiques des dérivés chlorés du BPA. Il a été seulement rapporté chez l'Homme une association entre la concentration de BPA monochloré urinaire et l'obésité ainsi que le diabète de type 2 (Andra and Makris 2015; Andra, Kalyvas, et al. 2015). Par ailleurs, la concentration urinaire des dérivés chlorés du BPA (monochloré et dichloré) ne semble pas être associée à une perturbation de la fonction thyroïdienne (Andrianou et al. 2016).

Dans le cadre de ces travaux de thèse réalisés en collaboration avec l'équipe « Implications physiologiques et physiopathologiques des connexines » (STIM, CNRS ERL 7368, Poitiers, France), les effets du BPA et de ses dérivés chlorés sont étudiés au niveau du foie et du cerveau chez des souris dont les mères ont été traitées pendant la gestation et la lactation. Chez les rongeurs, il a été précédemment démontré que le BPA peut atteindre le placenta (0,55% du BPA administré ; 3,14 ng/g), le fœtus (4% du BPA administré ; 3,7 ng/g) et le liquide amniotique (0,34% du BPA administré ; 4,85 ng/ml) (Zalko et al. 2003).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

L'exposition a été réalisée à une faible dose de 20 µg/kg/jour, inférieure à la dose tolérable journalière du BPA (50 µg/kg/jour) fixée par l'EPA et l'EFSA. Ces travaux se sont focalisés sur l'étude des dérivés monochlorés et dichlorés dans le cadre d'une exposition périnatale car ces derniers ont été détectés le plus fréquemment chez les embryons humains.

De plus, les dérivés monochlorés et dichlorés du BPA présentent une activité œstrogénique plus importante que le BPA non conjugué. Par conséquent, ces dérivés chlorés du BPA pourraient induire des perturbations plus délétères que le composé parent BPA. En dépit de l'importante littérature sur les effets du BPA, les effets des dérivés chlorés du BPA au niveau hépatique et cérébral chez les rongeurs sont inconnus.

Le BPA et ses dérivés chlorés étant des perturbateurs endocriniens, les descendance mâle et femelle ont été analysées afin d'évaluer les effets liés au sexe. Nous avons également formulé l'hypothèse de la connexine 43 comme cible potentielle du BPA pour expliquer les effets observés au niveau cérébral chez les modèles animaux. Il a été évalué la sensibilité des souris présentant un phénotype hétérozygote pour la Cx43 lors d'une exposition au BPA et à ses dérivés chlorés pendant la période périnatale.

L'originalité de ces travaux de thèse est l'utilisation des outils IRM et ¹H SRM pour examiner l'impact de ces xénobiotiques au niveau du foie (Cf. 3^{ème} partie, Chap.6, p.137) et du cerveau (Cf. 3^{ème} partie, Chap.7, p.160). Ces techniques sont classiquement utilisées dans les études cliniques et précliniques pour le diagnostic ou la surveillance de la progression de pathologies.

Chapitre 6 : Evaluation d'une exposition périnatale au BPA et à ses dérivés dichlorés au niveau hépatique chez la souris

6.1. Matériels et Méthodes

6.1.1. Le modèle animal

Les traitements ont été effectués par Amandine Chepied et Norah Defamie de l'équipe « Implications Physiologique et Physiopathologique des Connexines » du laboratoire STIM - CNRS ERL 7368 (Poitiers, France).

Les procédures d'expérimentation animale ont été réalisées en accord avec les recommandations de l'Union Européenne (2010/63/EU) pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire et conformément aux règles d'éthique du ministère français de l'agriculture et de la forêt (service de santé animale et service de protection vétérinaire). Le protocole a été approuvé par le comité local d'éthique de l'université de Poitiers "COMETHEA n°84" (n° 02.160).

La salle d'hébergement des animaux a été maintenue à un cycle de 12h de lumière/obscurité et à une température de $22 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

Des femelles gestantes Swiss (Jackson labs) ont reçu des injections intrapéritonéales journalières du jour embryonnaire 1 (E1) à 3 semaines post-natal (gestation et lactation) (**Fig. 6.1.**) :

- l'huile de tournesol utilisée pour solubiliser le BPA et sert de contrôle (CTR) (n=5)
- 20 µg/kg/jour de BPA (n=5)
- 20 µg/kg/jour de BPA monochloré (MCBPA) (n=3)
- 20 µg/kg/jour de 3,5-dichloroBPA (3,5-DCBPA) (n=5)
- 20 µg/kg/jour de BPA 3,3'-dichloroBPA (3,3'-DCBPA) (n=4)
- un mélange de BPA dichloré (mix-DCBPA) (n=5) avec 10 µg/kg/jour de 3,5-DCBPA et 10 µg/kg/jour de 3,3'-DCBPA.

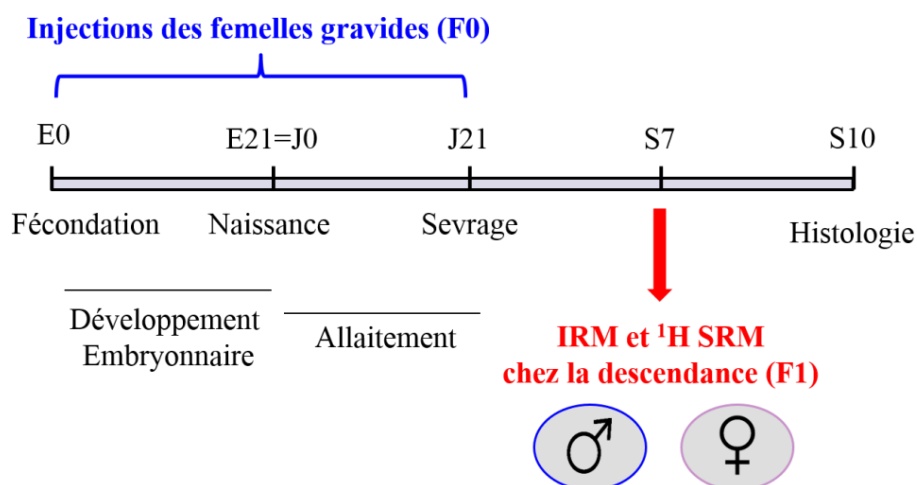


Figure 6.1 : Protocole expérimental de l'exposition périnatale au BPA et à ses dérivés chlorés et analyse du foie par IRM et ¹H SRM

Les descendances mâles (M) et femelles (F) ont été séparées en 12 groupes expérimentaux comme répertoriés dans le **tableau 6.1**. Les expériences IRM et ¹H SRM ont été réalisées sur les progénitures âgées de 7 semaines (après le sevrage), puis les animaux ont été sacrifiés à 10 semaines et les foies ont été prélevés pour réaliser une analyse histologique.

Tableau 6.1 : Nombre de descendants mâle et femelle pour chaque traitement

n/groupe	CTR	BPA	MCBPA	3,3'-DCBPA	3,5-DCBPA	mix-DCBPA
Male (M)	13	19	5	15	16	19
Femelle (F)	16	16	9	12	14	17

6.1.2. Les expériences IRM et ¹H SRM

Les acquisitions de résonance magnétique ont été réalisées sur un aimant supraconducteur 7 Tesla Pharmascan 70/16 (Bruker, Wissembourg, France) avec des gradients blindés présentant une amplitude de gradient maximum de 230 mT.m⁻¹ et un diamètre intérieur de 90 mm. Une bobine de transmission et réception de type quadrature avec un diamètre interne de 38 mm a été utilisée.

L'anesthésie des animaux a été induite par inhalation de 2% isoflurane mélangé dans l'air et l'oxygène (ratio 1 :1) et un débit de 0,5 L.min⁻¹. L'anesthésie est stabilisée à 1,5% durant les acquisitions. La température corporelle physiologique des animaux est maintenue à l'intérieur de l'aimant par un système de circulation d'eau chaude. Un capteur de pression est placé au

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

niveau de l'abdomen des animaux afin de surveiller la fréquence respiratoire et de s'assurer de l'efficacité de l'anesthésie. La fréquence respiratoire obtenue sert également à la reconstruction de la séquence Ig-FLASH (intra-gate fast low angle shot).

La séquence Ig-FLASH pondérée en densité de protons a été paramétrée avec : TE/TR, 4 ms/174 ms; angle de bascule, 20°; résolution dans le plan, 117x117 $\mu\text{m}^2/\text{pixel}$ et fréquence respiratoire pour la reconstruction, 40 cycles/min ; 18 coupes/1 mm ; temps d'acquisition, 3 min 44 s. La séquence Ig-FLASH a été utilisée pour l'analyse de texture et pour placer le voxel de la séquence PRESS (Point Resolved Spectroscopy).

La séquence PRESS a été utilisée avec : un voxel 4 x 4 x 3 mm^3 ; TE/TR, 16 ms/3260 ms; bande spectrale, 4006,41 Hz (13,34 ppm) ; 2048 points ; temps d'acquisition, 21 min 47 s. Le module de suppression d'eau VAPOR a été utilisé pour la suppression d'eau afin d'évaluer la composition lipidique. Le module OVS est activé pour supprimer le signal en dehors du voxel. Le TR de la séquence PRESS a été réglé pour être plus grand que 3 secondes afin d'éviter les effets de relaxation T1 et d'obtenir toutes les protons complètement relaxés (Ramamonjisoa et al. 2013). Le voxel de 48 mm^3 a été positionné dans le lobe droit du foie après la comparaison entre le placement dans le lobe droit et gauche. Une homogénéisation du champ magnétique B_0 de premier et second ordre a été effectuée au sein du voxel.

6.1.3. Analyse des données IRM et 1H SRM

6.1.3.1. Analyse de texture des images du foie obtenues par IRM

L'analyse de texture des images obtenues par IRM a été réalisée selon une méthode précédemment décrite (Herlidou et al. 1999). Les images axiales de l'abdomen de souris ont été normalisées avec la même intensité (3.10^6) dans Paravision 5.1. La **figure 6.2** illustre une image axiale de l'abdomen obtenue chez une souris contrôle, il peut être observé le foie (en rouge), l'estomac (en vert) et la veine porte (bleu).

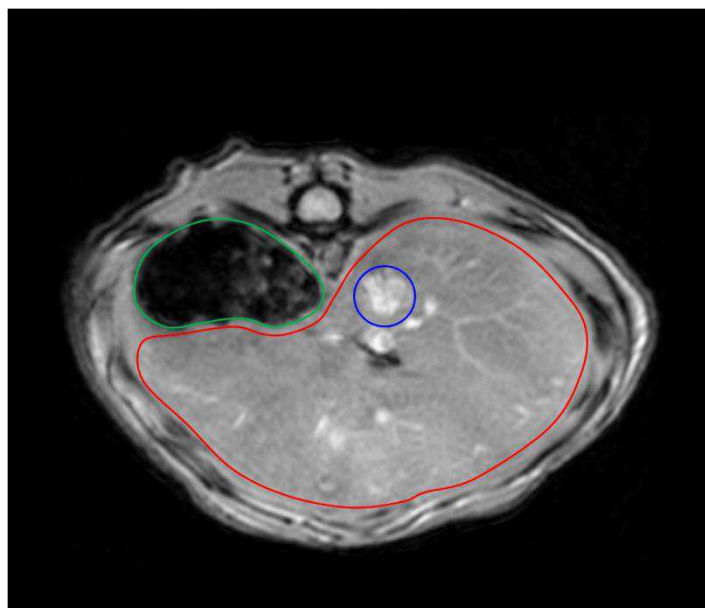


Figure 6.2 : Image axiale pondérée en densité de proton de l'abdomen de souris contrôle

Trois images axiales par animal ont été sélectionnées puis transférées sur un ordinateur externe pour le post-traitement. Une région d'intérêt (ROI) ($\sim 1,2 \text{ cm}^2$; $\sim 1.10^5$ pixels) correspondant au foie a été dessinée manuellement pour chaque image et la ROI correspondante a été analysée à l'aide du logiciel Mazda (Szczyński et al. 2009) (Mazda 4.6, ©1998-2007 by P.M Szczyński). Deux méthodes d'analyse de texture ont été utilisées : l'histogramme des niveaux de gris (ordre 1) et les matrices de cooccurrence (ordre 2).

Pour chaque ROI du foie, plusieurs paramètres ont été calculés (*Cf. 1.2.3., p.21 et Annexe 1, p.218*) afin d'obtenir un profil de texture unique. Pour chaque animal, un profil de texture moyen de trois images a été calculé.

6.1.3.2. Analyse spectrale et quantification

Les spectres ont été analysés sur TopSpin 3.2 (Bruker, Ettlingen, Allemagne). Après la transformée de Fourier, une apodisation de 2 Hz est appliquée. Le résidu de l'eau à 0 Hz est réglé à 4,7 ppm. La correction manuelle de la phase (0 et 1^{er} ordre) et la correction de la ligne de base sont effectuées. La quantification des pics est réalisée en unité arbitraire (U.A.) en utilisant la méthode ERETIC digital (Electronic reference to access *in vivo* concentrations) implémentée sur TopSpin 3.2.

La méthode ERETIC digital est un pic synthétique précédemment calibré et incorporé dans le spectre à analyser en post-traitement (*Cf. 2.3.2., p.48*). La calibration est effectuée avec un spectre d'un fantôme avec une concentration connue (1% agarose, 5 mM choline dans une

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

solution saline isotonique) et réalisé dans les mêmes conditions expérimentales que les spectres de foie *in vivo*. La valeur de référence est obtenue suite à la calibration puis validée *in vitro* avec un fantôme (tube test) contenant de la choline et du D-glucose (1% agarose, 5 mM dans une solution saline isotonique). Les index de la composition des acides gras ont été calculés à partir des ratios décrits dans la littérature et répertoriés dans le chapitre 2 (Cf. 2.3.1.2., p.47) de cette thèse.

6.1.4. Analyse histologique

Les analyses histologiques ont été réalisées par Amandine Chepied et Norah Defamie de l'équipe « Implications Physiologique et Physiopathologique des Connexines » du laboratoire STIM - CNRS ERL 7368 (Poitiers, France).

Suite aux expériences IRM et ¹H SRM, les souris ont été sacrifiées à 10 semaines par une perfusion intracardiaque de paraformaldehyde (4%). Le lobe hépatique droit fixé (correspondant au lobe utilisé en SRM) a été coupé en utilisant la station cryostat (Leica CM 3050) et les coupes ont été placées dans une solution antigel (40 mM solution saline tamponnée au phosphate, 0,8 mM acide de sodium, 4 M glycérol, 5 M éthylène glycol).

Avant utilisation, les coupes ont été rincées trois fois avec une solution saline tamponnée au phosphate. L'hématoxyline a été ajoutée pendant 30 secondes puis rincée à l'eau. Les coupes ont été traitées dix fois avec de l'alcool acide (70% éthanol, 0,25% HCl) et deux fois avec l'eau. La solution d'éosine jaune a été ajoutée pendant 15 secondes puis l'éthanol à 95% et l'éthanol à 100% sont utilisés pour déshydrater les coupes. Le xylène a été ensuite ajouté et les coupes ont été montées sur lame avec du Mowiol. Les coupes ont été observées avec un microscope (Olympus FVX10) à un grossissement de 6.3.

La coloration hématoxyline éosine (HE) est réalisée pour évaluer la stéatose microvésiculaire qui est l'accumulation des acides gras dans les hépatocytes sous la forme de gouttelettes lipidiques. Elle est définie par la présence de plaques contiguës et non-zonales d'hépatocytes spumeux à noyaux centralisés c'est-à-dire présentant un cytoplasme hétérogène lié à l'accumulation des lipides. La présence ou l'absence des gouttelettes lipidiques sont observées sous un faible grossissement (4x à 10x) (Tandra et al. 2011).

6.1.5. Les analyses statistiques

L'analyse en composantes principales (ACP) (modèle non-paramétrique Spearman) a été utilisée pour comparer les profils de texture (XLSTAT version 2016.03.31175 ©Addinsoft 1995-2016) des groupes contrôles et exposés. L'utilisation de statistiques multivariées est indispensable compte tenu du nombre important de variables (les paramètres de texture) et d'observations (les foies de souris).

L'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode de statistiques descriptives de données quantitatives. Elle va permettre de résumer l'information complexe contenue dans le jeu de données initial en 2 axes factoriels appelés composantes principales.

Pour cela, ces axes factoriels doivent maximiser l'inertie du nuage des observations c'est-à-dire la somme des variances des variables considérées. L'ACP a deux objectifs principaux : (i) la visualisation des observations dans un espace à deux dimensions afin d'identifier des groupes d'observations homogènes ou atypiques, (ii) l'étude des corrélations entre les variables afin d'éventuellement limiter leurs nombres et les analyser avec des statistiques classiques (test de comparaison deux à deux ou analyses de variances de plusieurs groupes).

L'analyse de variance (ANOVA ; test non-paramétrique) est effectuée sur les données de spectroscopie pour la comparaison globale selon le sexe et le type de traitement (Kruskall-Wallis avec post-hoc Dunn) (GraphPad Prism 5.1).

6.2. Résultats et conclusions

6.2.1. Evaluation de la structure hépatique par IRM et histologie

6.2.1.1. Analyse de texture des images IRM

De récentes études ont mis en évidence que l'exposition au BPA peut induire une perturbation du métabolisme lipidique et conduire au développement de la stéatose hépatique (*Cf. 5.2., p.125*). A l'aide de l'analyse de texture des images pondérées en densité de proton, nous avons décidé d'évaluer les potentielles modifications induites sur la structure hépatique chez les souris âgées de 7 semaines exposées pendant la période périnatale au BPA et à ses dérivés chlorés.

Les paramètres de texture (*Cf. Annexe 1, p.218*) quantifiés donnent un profil de texture pour chaque souris des traitements contrôle, BPA, BPA monochloré (MCBPA) et BPA dichlorés (3,3'-DCBPA et/ou 3,5-DCBPA). Compte tenu du nombre important de souris, nous avons utilisé l'analyse en composantes principales (ACP) pour évaluer si les profils de texture des souris étaient différents selon les traitements.

Les graphes de la **figure 6.3** montrent les ACP obtenues chez les souris mâles témoins ou exposées au BPA et à ses dérivés chlorés. Les ACP montrent la visualisation des profils de texture de chaque souris mâles (représenté par un point) dans un espace à deux dimensions. Cela va permettre d'identifier la présence de groupes homogènes ou atypiques. La somme des axes factoriels 1 et 2 sélectionnés regroupent un minimum de ~70% de l'information du jeu de données pour chaque comparaison.

.

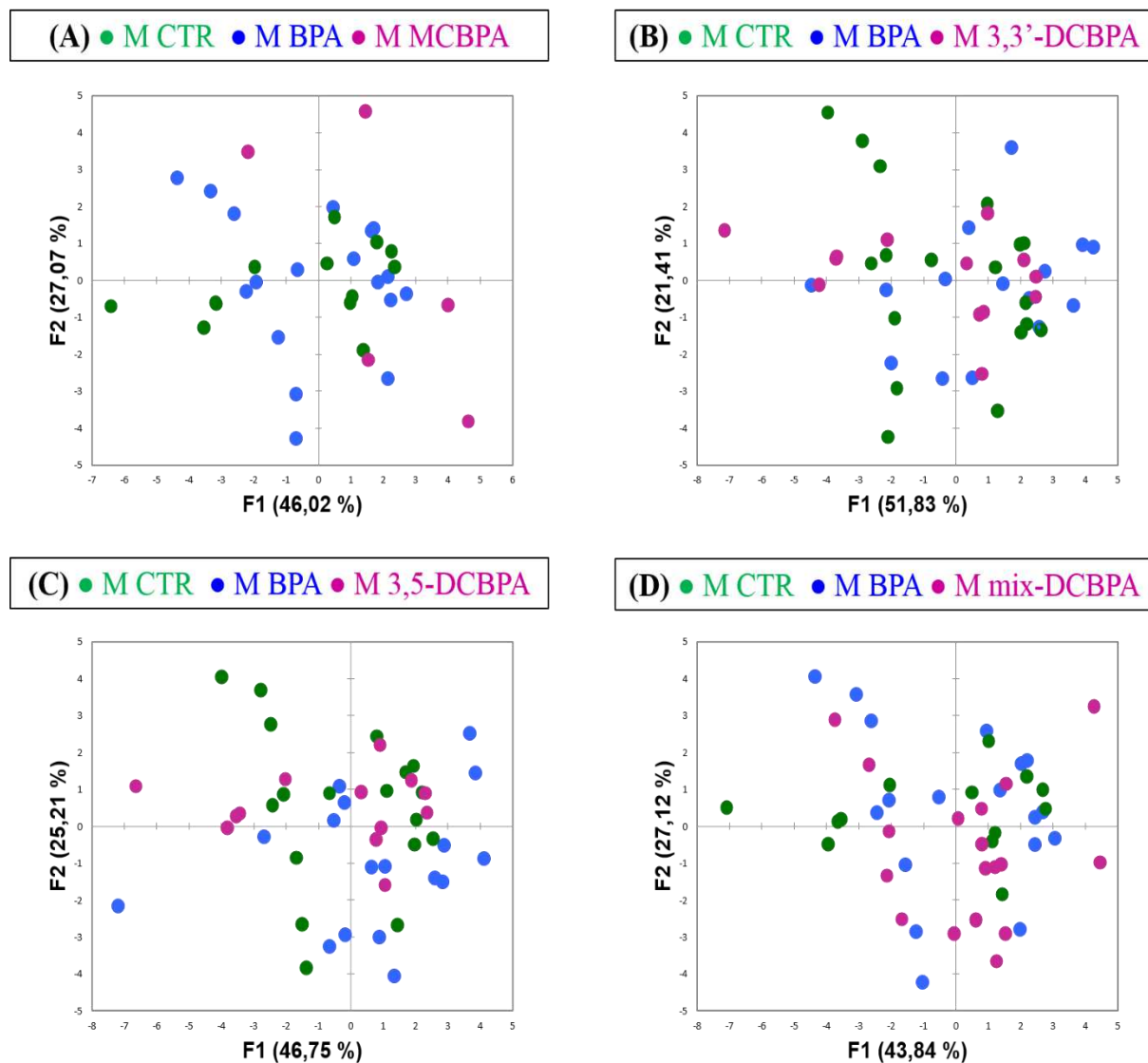


Figure 6.3 : ACP des profils de textures hépatiques des souris mâles contrôles (CTR) et de souris mâles exposées au bisphénol A (BPA) et à ses dérivés chlorés
 (A) MCBPA (MCBPA) ; (B) 3,3'-DCBPA ; (C) 3,5-DCBPA ; (D) mélange de 3,5-DCBPA et 3,3'-DCBPA (mix-DCBPA). *F1* et *F2* : axes factoriels 1 et 2.

Les profils de texture des souris mâles exposées pendant la période périnatale au BPA ou à ses dérivés chlorés du BPA ne mettent pas en évidence des groupes homogènes distincts des souris contrôles. Par conséquent, l'analyse de texture des images IRM ne montrent pas de modifications structurales dans le foie des souris exposées au BPA ou à ses dérivés chlorés.

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

De la même manière, la **figure 6.4** représente les ACP obtenues chez les souris femelles témoins ou exposées aux dérivés chlorés du BPA (MCBPA, 3,3'-DCBPA ; 3,5-DCBPA et mix-DCBPA). Les axes factoriels 1 et 2 choisis regroupent un minimum de ~70% de l'information du jeu de données pour chaque comparaison.

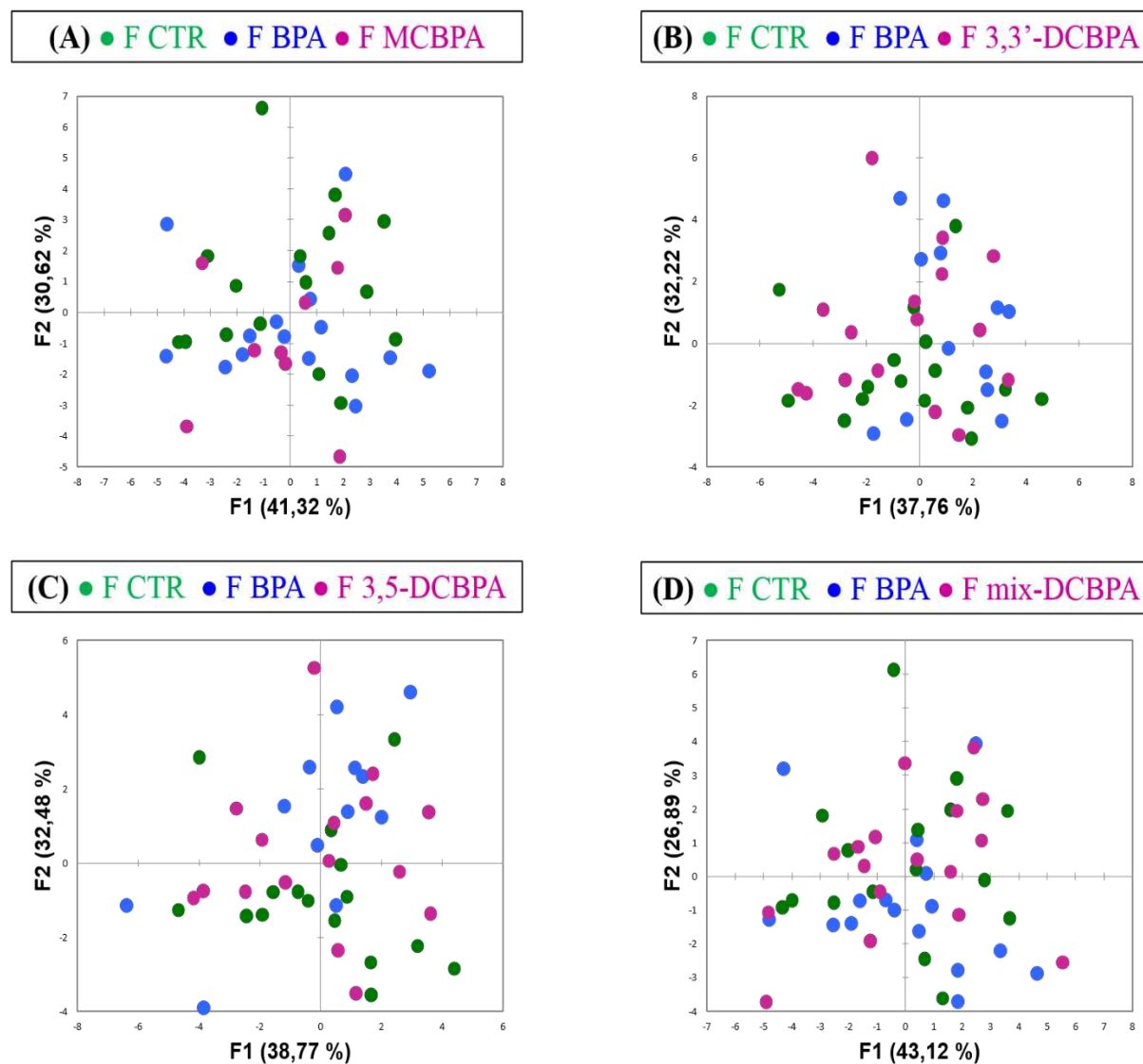


Figure 6.4 : ACP des profils de textures hépatiques des souris femelles contrôles (CTR) et de souris femelles exposées au bisphénol A (BPA) et à ses dérivés chlorés (A) MCBPA ; (B) 3,3'-DCBPA ; (C) 3,5-DCBPA ; (D) mélange de 3,5-DCBPA et 3,3'-DCBPA (mix-DCBPA). F1 et F2 : axes factoriels 1 et 2.

Les profils de texture des souris femelles exposées pendant la période périnatale au BPA ou à ses dérivés chlorés du BPA ne mettent pas en évidence des groupes homogènes distincts des souris contrôles. Les résultats sont similaires aux mâles et indiquent que l'exposition au BPA et aux dérivés chlorés n'induit pas de modifications au niveau des profils de texture du foie.

6.2.1.2. Analyse histologique du foie

Afin de confirmer les résultats obtenus par l'analyse de texture, une analyse histologique a été réalisée à 10 semaines chez les mêmes souris exposées au BPA ou à ses dérivés chlorés (n=3/4 par groupe).

Une coloration hématoxyline éosine (HE) a été effectuée pour la caractérisation morphologique des foies. La coloration HE est réalisée pour évaluer la stéatose microvésiculaire qui est l'accumulation des acides gras dans les hépatocytes sous la forme de gouttelettes lipidiques.

Dans la **figure 6.5A**, des images du lobe droit hépatique en fonction du sexe et du traitement sont représentées. La **figure 6.5B** est un agrandissement d'un lobule hépatique de F mix-DCBPA sur laquelle une veine centro-lobulaire et les cellules hépatiques sont observables.

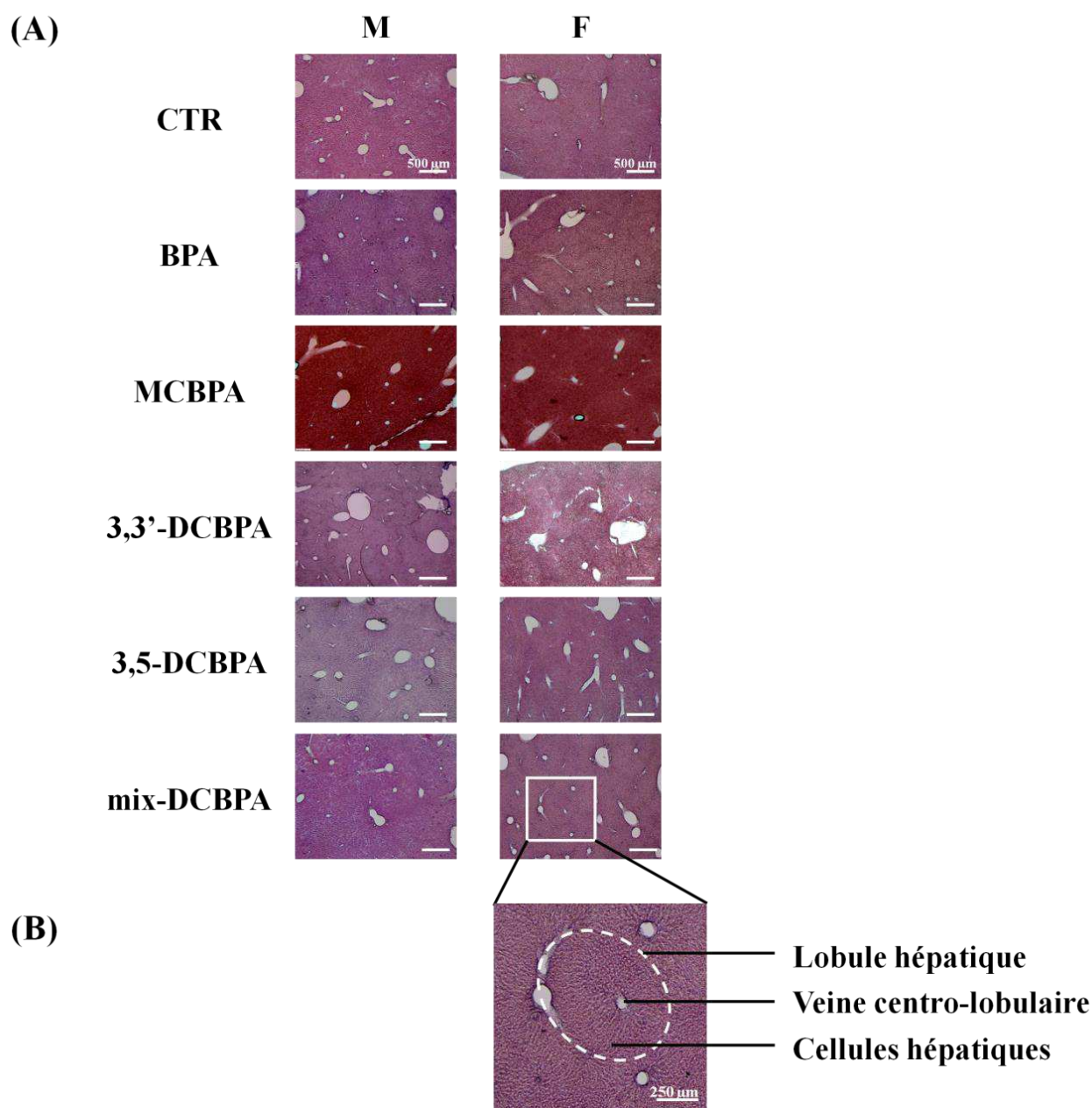


Figure 6.5 : (A) Images représentatives macroscopiques (échelle 500 μm) de coupes du lobe hépatique droit colorées à l'hématoxyline éosine chez les souris mâles (M) et les femelles (F) exposées au contrôle (CTR), au bisphénol A (BPA) et à ses dérivés chlorés (MCBPA ; 3,5-DCBPA et/ou 3,3'-DCBPA) ; (B) Agrandissement du lobule hépatique de F mix-DCBPA (échelle 250 μm).

Sur les images de foies des souris mâles et femelles exposées au BPA ou à ses dérivés chlorés, il n'est pas observable de cytoplasme hétérogène ou de gouttelettes lipidiques caractéristiques de l'accumulation des acides gras dans les hépatocytes. L'analyse histologique par coloration HE ne montre pas de stéatose microvésiculaire induite par une exposition périnatale au BPA ou à ses dérivés mono ou dichlorés chez les souris mâles et femelles.

6.2.1.3. Conclusion

L'analyse de texture des images obtenues par IRM a servi précédemment pour la quantification de la fibrose hépatique et la catégorisation de l'activité nécroinflammatoire chez des patients avec une hépatite C chronique (Yu et al. 2015; Yokoo et al. 2015; Wu et al. 2015). Dans notre étude, l'analyse de texture des images pondérées en densité de proton n'a pas mis en évidence de modifications précoces de la structure du foie chez les souris (âgées de 7 semaines) exposées pendant la période périnatale au BPA et à ses dérivés chlorés (MCBPA, 3,3'-DCBPA et/ou 3,5-DCBPA) en comparaison des souris contrôles.

Ces résultats ont été confirmés par l'analyse histologique par coloration hématoxyline qui n'a pas détecté de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes. Cela indique que l'exposition périnatale au BPA ou à ses dérivés chlorés n'induit pas de stéatose hépatique microvésiculaire chez les souris âgées de 10 semaines.

Au vue des analyses de texture et de l'analyse histologique par coloration hématoxyline éosine, les traitements au BPA et à ses dérivés chlorés pendant la période périnatale n'induisent pas de modifications précoces dans la structure hépatique chez les souris mâles et femelles.

6.2.2. Evaluation quantitative de la composition lipidique du foie par ¹H SRM

Après l'analyse de la structure hépatique, nous avons étudié si le métabolisme hépatique pouvait être impacté de manière précoce par l'exposition périnatale au BPA et à ses dérivés chlorés.

6.2.2.1. Placement du voxel dans le foie

En parallèle de l'évaluation quantitative du métabolisme lipidique pour l'étude de la composition lipidique chez les souris exposées au BPA et à ses dérivés chlorés, nous avons souhaité réaliser une comparaison entre le lobe droit et gauche du foie afin d'établir le choix de la position du voxel (48 mm³). Le but était de s'assurer que le métabolisme lipidique et la qualité spectrale étaient comparables entre les deux lobes hépatiques. Ces tests préliminaires ont été réalisés de manière systématique chez les souris mâles et femelles contrôles et BPA. Dans cette partie, les résultats des tests préliminaires réalisés chez les souris mâles contrôles (n=13) sont présentés.

Dans la **figure 6.6A**, il est présenté le placement des voxels dans le lobe hépatique gauche et droit utilisés pour la comparaison des spectres ¹H. Dans la **figure 6.6B**, il est présenté un exemple de la comparaison qualitative des spectres obtenus dans le lobe droit et gauche chez la même souris.

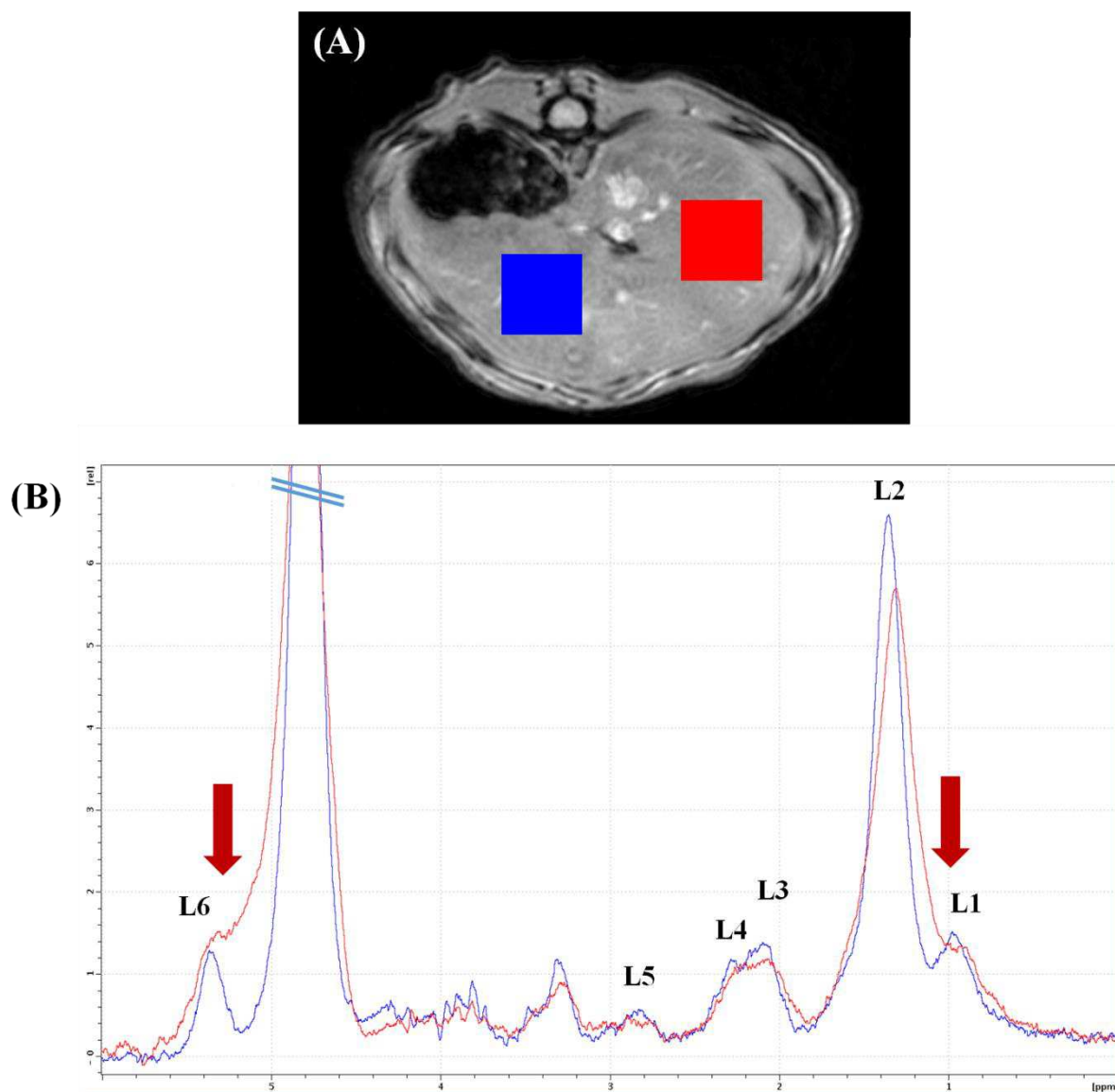


Figure 6.6 : (A) Positionnement des voxels dans le lobe hépatique droit (bleu) et gauche (rouge) chez une souris mâle contrôle ; (B) Superposition des spectres ¹H obtenus dans les voxels positionnés dans le lobe droit (bleu) et le lobe gauche (rouge) avec des flèches indiquant l'élargissement du pic L2 et de l'eau résiduel. L'attribution des pics des groupements des acides gras est la suivante : L1, méthyle (0,90 ppm) ; L2, méthylène (1,30 ppm) ; L3, allylique (2,04 ppm) ; L4, α méthylène au carbonyle (2,25 ppm); L5, diallylique (2,80 ppm); L6, méthine (5,4 ppm).

Il a été observé qualitativement que les spectres dans le lobe gauche présentent un élargissement du pic L2 et du résidu de l'eau comme indiqué par les flèches rouges dans la **figure 6.6**, ce qui affecte la résolution spectrale pour les pics L1 et L6.

Après la comparaison qualitative, nous avons mesuré les aires sous les pics afin de vérifier si l'altération de la qualité spectrale affectait la quantification des pics. Les résultats obtenus pour les souris mâles contrôles sont présentés dans la **figure 6.7**.

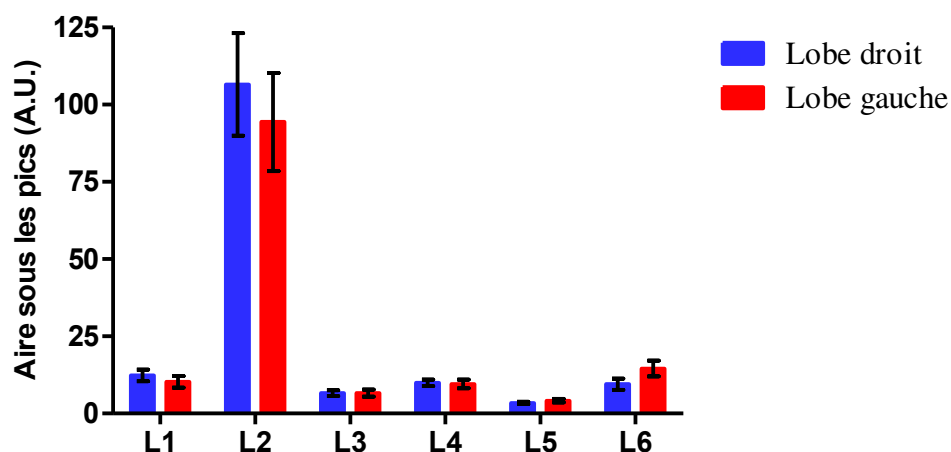


Figure 6.7 : Aire sous les pics des acides gras mesurée dans le lobe droit et le lobe gauche des souris mâles contrôles (moyenne $\pm$ ESM ; n=13)

La quantification des aires sous les pics des acides gras a mis en évidence une baisse non significative pour L1 (-17,2%) et L2 (-11,4%) et une hausse non significative pour L6 (+53,0%) dans le voxel gauche en comparaison au voxel droit (**Fig. 6.7**).

Cette altération de la qualité spectrale dans le voxel placé dans le lobe gauche du foie est liée à la proximité de larges vaisseaux sanguins (e.g. veine porte hépatique) et des structures biliaires. Par conséquent, la composition lipidique de souris exposées au BPA et à ses dérivés chlorés a été réalisée dans un voxel placé dans le lobe droit.

6.2.2.2. La composition lipidique en ^1H SRM

La composition des acides gras (AG) hépatiques a été mesurée par ^1H SRM et les paramètres calculés ont été précédemment présentés (Cf. 2.3.1.2., p.47). Pour rappel, les ratios utilisés permettent de mesurer : (i) la fraction saturée des AG (SC), (ii) l'index des AG insaturés (TUFI), (iii) l'index des liaisons des AG insaturés représentant la moyenne des doubles liaisons de l'ensemble des AG insaturés présents dans le voxel (TUBI), (iv) l'index des liaisons des AG polyinsaturés (PUBI) correspondant à la moyenne des doubles liaisons des AG polyinsaturés présents dans le voxel Corbin et al. (2009).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

La **figure 6.8** montre la superposition des spectres ^1H obtenus à partir du voxel positionné dans le lobe droit hépatique chez des souris mâles exposées pendant la période périnatale au contrôle (en bleu) et au mélange de BPA dichlorés (en rouge).

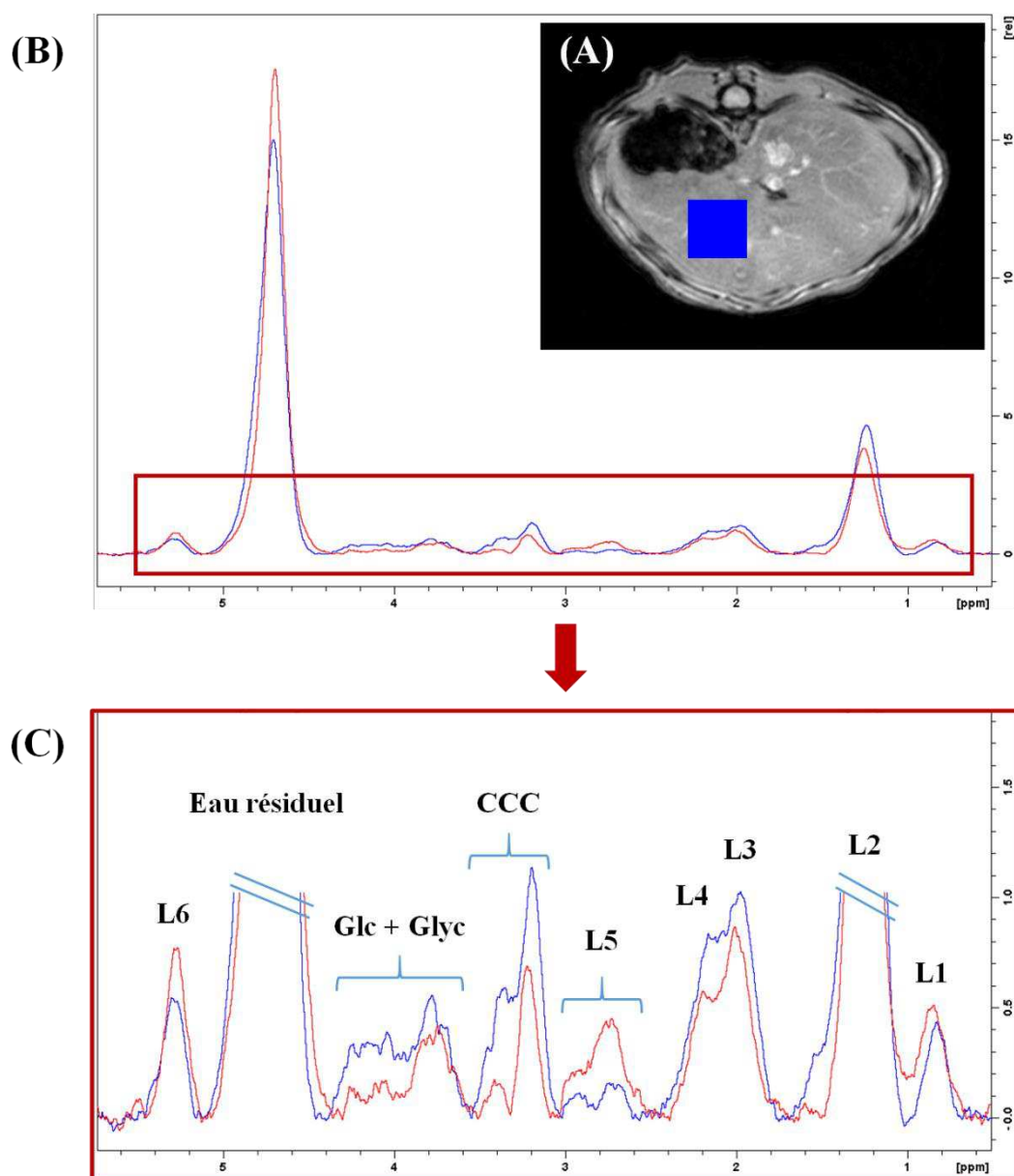


Figure 6.8 : (A) Position du voxel dans le lobe droit du foie ; (B) La superposition des spectres du lobe droit hépatique chez des souris mâles contrôle (bleu) et mix-DCBPA (rouge) et (C) montre un agrandissement de (B). L'attribution des pics est la suivante : L1, méthyle (0,90 ppm) ; L2, méthylène (1,30 ppm) ; L3, allylique (2,04 ppm) ; L4, α méthylène au carbonyle (2,25 ppm) ; L5, diallylique (2,80 ppm) ; L6, méthine (5,4 ppm) ; CCC, composés contenant de la choline ; Glc, glucose ; Glyc, glycogène.

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

La **figure 6.9** illustre les moyennes des index de la composition lipidique obtenues pour les souris mâles (en bleu sur les histogrammes) et les souris femelles (en rouge sur les histogrammes) exposées aux traitements contrôle, BPA, BPA monochloré et BPA dichloré (3,3'-DCBPA et/ou 3,5-DCBPA).

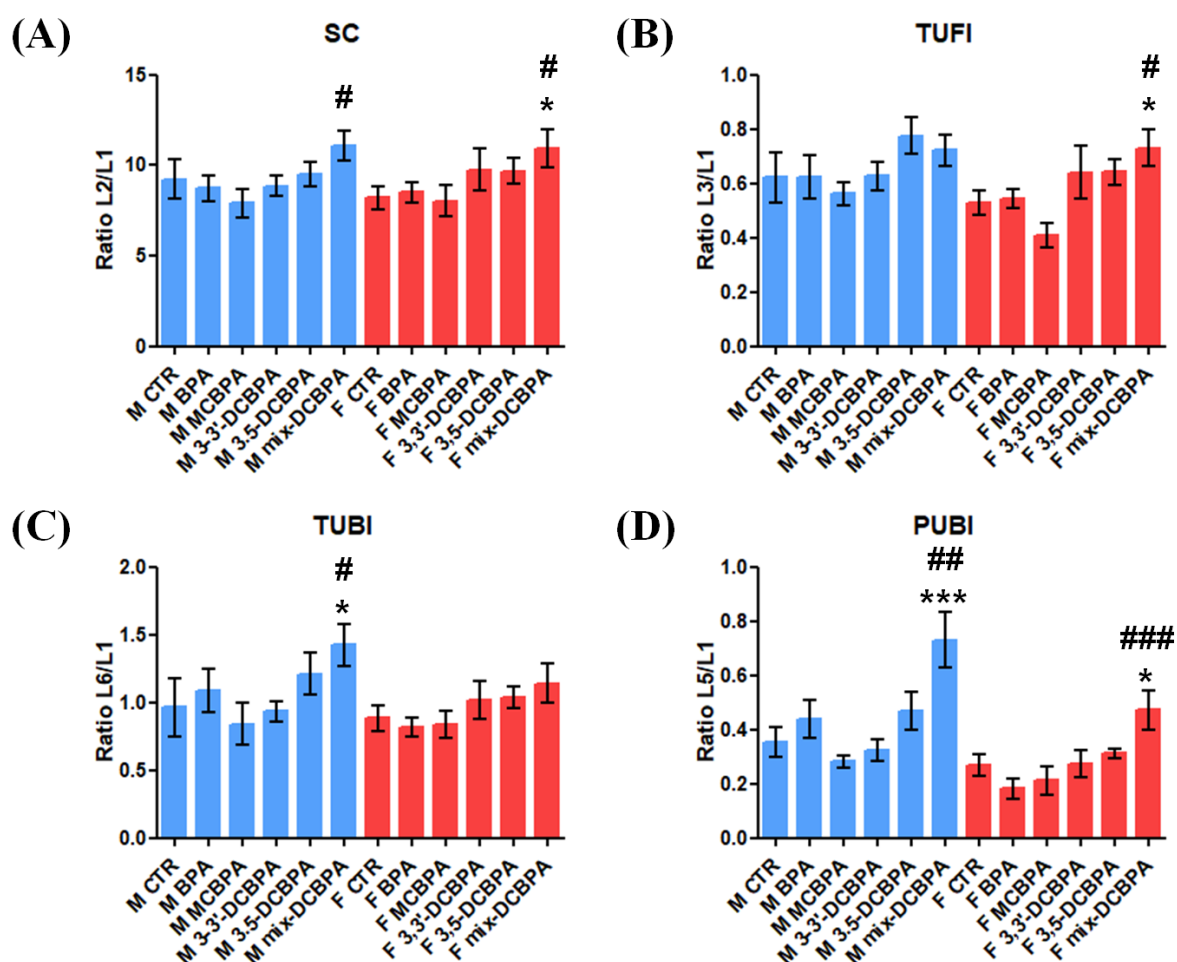


Figure 6.9 : Index de la composition des acides gras obtenus par ¹H SRM chez les mâles (M) et femelles (F) exposés pendant la période périnatale au contrôle (CTR), au bisphénol A (BPA) et à ses dérivés chlorés (MCBPA ; 3,5-DCBPA et/ou 3,3'-DCBPA) : (A) la fraction saturée des AG (SC) ; (B) l'index des AG insaturé (TUF1) ; (C) l'index des liaisons des AG insaturés (TUBI) ; (D) l'index des liaisons des AG polyinsaturés (PUBI). Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs CTR

$p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs BPA

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

En comparaison des groupes contrôles, aucune variation dans la fraction saturée des AG (SC) n'a été mesurée chez les progénitures mâles et femelles exposées lors de la période périnatale au BPA ou à ses dérivés chlorés MCBPA, 3,5-DCBPA ou 3,3'-DCBPA. Cependant, SC augmente significativement chez M mix-DCBPA (+20,5% ; $11,08 \pm 0,84$ vs M CTR= $9,19 \pm 0,56$) et F mix-DCBPA (+33,3% ; $10,93 \pm 1,03$ vs F CTR= $8,20 \pm 0,65$) (**Fig. 6.9A**).

Une hausse non significative de l'index des AG insaturés (TUF_I) a été mesurée chez les souris du groupe M 3,5-DCBPA (+24,6% ; $0,78 \pm 0,07$) et du groupe M mix-DCBPA (+16,1% ; $0,72 \pm 0,06$) comparé aux groupes des souris mâles contrôles ($0,62 \pm 0,09$), mais ce n'est pas le cas pour les traitements BPA, MCBPA et 3,3'-DCBPA. Chez les femelles, TUF_I est augmenté significativement seulement dans le groupe F mix-DCBPA (+37,7% ; $0,72 \pm 0,07$ vs F CTR= $0,53 \pm 0,05$) (**Fig. 6.9B**).

Une augmentation des pics L5 et L6 peut être observée dans la **figure 6.8** en accord avec les variations mesurées pour les index des liaisons des AG insaturés (TUB_I) et des liaisons des AG polyinsaturés (PUB_I). Par comparaison aux souris contrôles, M mix-DCBPA a montré une élévation significative de TUB_I (+47,2% ; $1,42 \pm 0,15$ vs M CTR= $0,97 \pm 0,21$) et PUB_I (+105,9% ; $0,73 \pm 0,10$ vs M CTR= $0,35 \pm 0,06$). De manière similaire, les souris F mix-DCBPA présentent un accroissement de TUB_I (+28,8% ; $1,14 \pm 0,15$ vs F CTR= $0,88 \pm 0,10$) et PUB_I (+76,8% ; $0,47 \pm 0,07$ vs F CTR= $0,27 \pm 0,04$) (**Fig. 6.9C et 6.9D**).

6.2.2.3. Conclusion

La technique ^1H SRM est utile en clinique pour la détermination de biomarqueurs dans plusieurs pathologies du foie telles que le carcinome hépatocellulaire subsidiaire à la cirrhose hépatique, tumeurs hépatique malignes primaires et la stéatose hépatique (Bohte et al. 2011; D. Wang and Li 2015; Zhang et al. 2016). Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons utilisé cette méthode pour caractériser la composition lipidique des souris exposées pendant la période périnatale au BPA et à ses dérivés chlorés.

En parallèle de l'étude des effets de nos traitements, nous avons effectué une comparaison dans le placement des voxels dans le lobe droit et gauche. Bien que les aires sous les pics des lipides soient comparables quantitativement, il a été observé une altération de la qualité spectrale dans le voxel placé dans le lobe gauche du foie. Cette altération est liée à la proximité de larges vaisseaux sanguins (e.g. veine porte hépatique) et des structures biliaires. Ces structures environnantes semblent compromettre l'efficacité de l'homogénéisation du champ magnétique B_0 . Par conséquent, la composition lipidique de souris exposées au BPA et à ses dérivés chlorés a été réalisée dans un voxel placé dans le lobe droit.

En comparaison avec les groupes contrôles mâles et femelles, le traitement du mélange des dérivés dichlorés (10 $\mu\text{g/kg/jour}$ 3,3'-DCBPA et 10 $\mu\text{g/kg/jour}$ 3,5-DCBPA) induit un changement dans la composition lipidique alors que les traitements de 20 $\mu\text{g/kg/jour}$ de BPA, BPA monochloré et les dérivés dichlorés seuls (3,3'-DCBPA ou 3,5-DCBPA) ne montrent pas de variation. En effet, il a été mesuré une hausse significative des index de la fraction saturée des AG (SC), des liaisons des AG insaturés (TUBI) et des liaisons des AG polyinsaturés (PUBI) dans les groupes M mix-DCBPA et F mix-DCBPA. Cette modification précoce de la composition lipidique apparaît plus prononcée chez les souris mâles que les femelles exposées pendant la période périnatale au mélange de BPA dichlorés (10 $\mu\text{g/kg/jour}$ 3,3'-DCBPA et 10 $\mu\text{g/kg/jour}$ 3,5-DCBPA).

Nous faisons l'hypothèse que cette modification précoce de la composition lipidique induite par le mélange de BPA dichlorés dans la composition est liée aux propriétés des perturbateurs endocriniens : (i) relation dose-réponse non-monotone avec des effets plus marqués à faible dose ; (ii) sensibilité liée au sexe par les activités œstrogéniques plus importante pour les dérivés chlorés que le composé parent BPA.

6.3. Discussion et perspectives

Le but de notre étude était de caractériser les effets du BPA et de ses dérivés chlorés au niveau du foie chez des souris exposées pendant la période périnatale à faible dose (20 µg/kg/jour). Pour cela, des méthodes complémentaires ont été utilisées sur les mêmes souris pour évaluer : (i) la structure du foie par analyse de texture des images obtenues par IRM et par histologie, (ii) la composition lipidique par ¹H SRM non invasive.

L'analyse de texture des images de résonance magnétique (à 7 semaines) et la coloration hématoxyline éosine (à 10 semaines) n'ont pas révélé de modification structurale chez la descendance exposée au BPA, MCBPA, 3,3'-DCBPA et/ou 3,5-DCBPA. Dans la littérature, une infiltration graisseuse hépatique modérée a été détectée chez les rats mâles exposés pendant la période périnatale au BPA (40 µg/kg/jour) à 15 semaines mais pas à 3 semaines. Cet effet était accentué à 26 semaines avec une accumulation graisseuse plus prononcée et des vacuoles lipidiques (Jiang et al. 2014). Dans notre étude, les observations de la structure hépatique ont été réalisées à un stade précoce chez des jeunes souris. Il est possible que nos analyses se situent à un stade infraclinique pour observer des modifications induites par le BPA et ses dérivés chlorés. Il serait intéressant d'examiner les conséquences à long terme (plus de 10 semaines) sur la structure du foie à la suite de l'exposition périnatale aux dérivés chlorés du BPA. En complément de l'analyse histologique par coloration à l'hématoxyline, la coloration à l'huile rouge pourrait apporter une information plus fine sur la stéatose microvésiculaire en colorant les gouttelettes lipidiques.

De manière inédite, nous avons mis en évidence que l'exposition périnatale au mix-DCBPA a induit une augmentation des acides gras insaturés et ce de manière plus prononcée que les acides gras saturés. Ce résultat peut être expliqué par l'augmentation de la fraction des acides gras polyinsaturés (AGPI). Nous faisons l'hypothèse que l'index des liaisons des acides gras polyinsaturés (PUBI) est un potentiel biomarqueur de l'exposition au BPA dichloré. En effet, l'élévation du ratio $\Omega 6/\Omega 3$ AGPI est un biomarqueur de la stéatose hépatique causée par la déplétion de $\Omega 3$ AGPI. La modification de ce ratio est induit par une diminution de la désaturation des acides gras, l'augmentation du stress oxydatif et/ou un déséquilibre du régime alimentaire (Araya et al. 2004; Videla et al. 2004).

Aucune donnée n'est actuellement disponible pour les dérivés dichlorés du BPA et les acides gras polyinsaturés. Cependant, plusieurs études ont exploré le BPA non-conjugué et les

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

AGPI. Par exemple, les rats adultes exposés au BPA à forte dose (50 mg/kg/jour) ont présenté une augmentation de $\Omega 6$ AGPI dans les testicules avec un déséquilibre des enzymes antioxydantes (SOD, GSH et CAT) indiquant que le stress oxydatif a eu lieu (M. Chen et al. 2012). Le BPA est capable d'accroître la synthèse des acides gras et induire une accumulation des lipides en interférant dans la voie de l'oxydation lipidique des cellules hépatiques du rat (Grasselli et al. 2013) ou en augmentant l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras dans le foie de souris adultes (Marmugi et al. 2012). Au vue de la littérature, l'évaluation du stress oxydatif et des gènes de la lipogenèse pourrait être une piste intéressante à explorer pour interpréter nos observations.

Dans notre étude, les perturbations des AGPI ont été mesurées chez les souris mâles et femelles mais il apparait clairement que cette hausse est davantage accentuée chez la descendance mâle. De précédentes études de l'exposition périnatale du composé parent BPA ont montré que les effets hépatiques peuvent être spécifiques au sexe et plus marqués chez les mâles. En effet, il a été rapporté qu'une exposition périnatale au BPA (100 $\mu\text{g/kg/jour}$) induit une augmentation des triglycérides et des acides gras libres dans le foie des jeunes rats mâles alors que cette hausse est absente chez les femelles (Strakovsky et al. 2015). Il a été également rapporté que l'exposition pendant la gestation (~ 239 $\mu\text{g/kg/jour}$) et la lactation (~ 466 $\mu\text{g/kg/jour}$) induit une intolérance au glucose seulement dans le foie des rats mâles adultes (Galyon et al. 2016). Cette sensibilité liée au sexe est probablement lié à la capacité réduite de détoxification de l'enzyme UDP-glucuronosyltransférase (UGT) dans le foie des rongeurs mâles (Shibata et al. 2002).

Nous n'avons observé aucune modification métabolique ou structurale avec les traitements des dérivés du BPA monochloré ou dichloré (3,3'-DCBPA et 3,5-DCBPA). L'activité œstrogénique de 3,3'-DCBPA a lieu à une plus faible concentration que le BPA non-conjugué et pourrait déclencher des effets non-monotonique (Kuruto-Niwa, Terao, and Nozawa 2002; Fukazawa et al. 2001; Viñas, Goldblum, and Watson 2013). De plus, 3,3'-DCBPA a montré une affinité plus élevée que le BPA au récepteur PPAR γ . Ce dernier est impliqué dans la régulation de l'équilibre énergétique telle que l'accumulation lipidique, la variation de la longueur de la chaîne et le degré de saturation des acides gras (Riu et al. 2011). Or, 3,3'-DCBPA est présent à une dose de 10 $\mu\text{g/kg/jour}$ dans le groupe mix-DCBPA et l'augmentation de PUBI dans ce groupe pourrait être le reflet d'un effet non-monotonique.

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Compte tenu que le devenir métabolique des dérivés chlorés est inconnu pour le moment, il pourrait exister des voies de détoxification et de pharmacocinétiques différentes. En effet, les dérivés chlorés du BPA possèdent un caractère plus lipophile que le BPA (Andra, Charisiadis, et al. 2015; Fernandez et al. 2007) et de ce fait la détoxification hépatique par glucurono-conjugaison semble peu probable (Migeot et al. 2013). Il semble néanmoins éliminé par excrétion rénale du fait de sa détection dans l'urine (Liao and Kannan 2012) . La combinaison d'une activité œstrogénique plus importante des dérivés dichlorés du BPA et d'une élimination rénale plus lente pourrait conduire à une action plus prolongée et donc à des effets plus prononcés que le composé parent BPA.

Une limite de notre étude est que la technique ^1H SRM *in vivo* est seulement sensible aux molécules avec un haut degré de mouvement moléculaire rotationnel. En effet, les résonances des acides gras observées dans le spectre proviennent des acides gras contenus dans les gouttelettes lipidiques intracellulaires mais les lipides présents dans la couche phospholipidique des gouttelettes ne sont pas détectables (Williams et al. 1973). En complément de l'évaluation de la quantité de lipides dans le foie par ^1H SRM, la chromatographie gazeuse pourrait apporter des précisions qualitatives dans la caractérisation de la composition lipidique hépatique telles que le degré d'insaturation et la longueur de la chaîne.

Pour conclure, nous avons mis en évidence pour la première fois que le mélange de BPA dichlorés (3,5-DCBPA and 3',3'-DCBPA) administré à faible dose (20 $\mu\text{g/kg/jour}$; inférieure à la dose journalière tolérable de 50 $\mu\text{g/kg/jour}$) induit des altérations de la composition lipidique hépatique chez les jeunes souris mâles et femelles et cela préalablement à tout changement structural hépatique. Les mécanismes moléculaires sous-jacents ce phénomène n'ont pas encore été élucidés. D'autres études sont requises pour corroborer que l'augmentation des acides gras polyinsaturés est un nouveau biomarqueur à l'exposition périnatal au BPA dichloré telles que l'analyse RT-qPCR pour les gènes impliqués dans la lipogenèse et le dosage par spectrophotométrie des marqueurs du stress oxydatif. En complément à notre étude, un suivi longitudinal pourrait fournir des informations sur le rôle du BPA dichloré dans les pathologies métaboliques croissantes dans les sociétés occidentales.

Chapitre 7 : Evaluation d'une exposition périnatale au BPA et à ses dérivés chlorés au niveau cérébral chez la souris

7.1. Matériels et méthodes

7.1.1. Le modèle animal

Les traitements ont été réalisés par Amandine Chepied et Norah Defamie de l'équipe « Implications Physiologique et Physiopathologique des Connexines » du laboratoire STIM - CNRS ERL 7368 (Poitiers, France).

L'étude de l'exposition périnatale du BPA et de ses dérivés chlorés a été effectuée sur les mêmes souris que l'analyse du foie (Cf. 6.1.1., p.138). La principale différence réside dans l'inclusion des souris présentant un phénotype hétérozygote pour la connexine 43. En effet, la connexine 43 apparaît comme une cible potentielle du BPA au niveau cérébral.

Des croisements entre des souris Swiss (Jackson labs) ont été réalisés : femelles gravides homozygotes (Wild-type ; WT) et des mâles hétérozygotes pour la connexine 43 (Cx43).

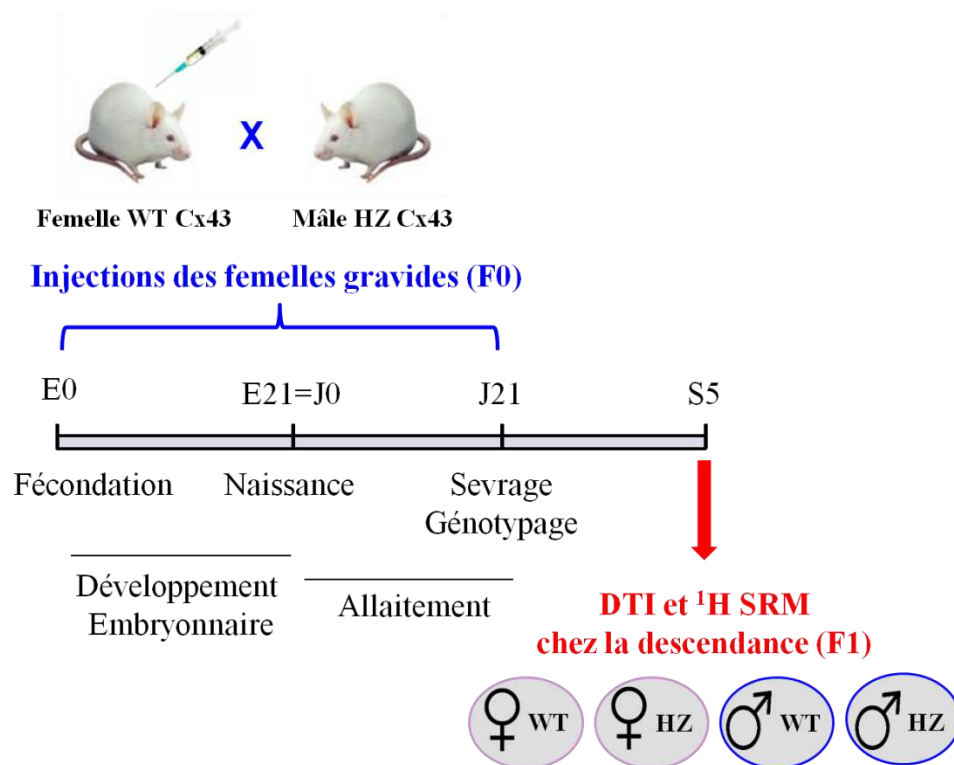


Figure 7.1 : Protocole expérimental de l'exposition périnatale au BPA et à ses dérivés chlorés et analyse du cerveau par IRM et ¹H SRM

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Les femelles gestantes ont reçu des injections intrapéritonéales journalières du jour embryonnaire 1 (E1) à 6 semaines (gestation et lactation) (**Fig. 7.1.**) :

- l'huile de tournesol utilisée pour solubiliser le BPA et sert de contrôle (CTR) (n=5)
- 20 µg/kg/jour de BPA (n=5)
- 20 µg/kg/jour de BPA monochloré (MCBPA) (n=3)
- 20 µg/kg/jour de 3,5-dichloroBPA (3,5-DCBPA) (n=5)
- 20 µg/kg/jour de BPA 3,3'-dichloroBPA (3,3'-DCBPA) (n=4)
- un mélange de BPA dichloré (mix-DCBPA) (n=5) avec 10 µg/kg/jour de 3,5-DCBPA et 10 µg/kg/jour de 3,3'-DCBPA.

Après génotypage, les progénitures mâles (M) et femelles (F) âgées de 21 jours ont été séparées en 24 groupes expérimentaux comme répertorié dans le **tableau 7.1**. Les analyses par imagerie des tenseurs de diffusion et ¹H SRM ont été effectuées chez les souris âgées de 5 semaines.

Tableau 7.1 : Nombre de descendants mâles (M) et femelles (F), sauvages (wild type ; WT) et hétérozygotes (HZ) pour chaque traitement.

n/groupe	CTR	BPA	MCBPA	3,3'-DCBPA	3,5-DCBPA	mix-DCBPA
M WT	14	18	5	15	17	23
M HZ	14	11	12	7	15	9
F WT	17	16	9	11	14	18
F HZ	9	7	12	3	10	9

7.1.2. Les expériences DTI et ¹H SRM

Les acquisitions de résonance magnétique ont été réalisées sur un aimant supraconducteur 7 Tesla Pharmascan 70/16 (Bruker, Wissembourg, France). Une bobine de transmission et réception de type quadrature avec un diamètre interne de 23 mm a été utilisée.

L'anesthésie des animaux a été induite par inhalation de 2% isoflurane mélangé dans l'air et l'oxygène (ratio 1 :1) et un débit de 0,5 L.min⁻¹. L'anesthésie est stabilisée à 1,5% durant les acquisitions. La température corporelle physiologique des animaux est maintenue à l'intérieur de l'aimant par un système de circulation d'eau chaude. Un capteur de pression est placé au niveau de l'abdomen des animaux afin de surveiller le cycle respiratoire.

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Compte tenu des altérations morphologiques décrites dans la littérature (*Cf. 5.3.1.1., p.127*), la microstructure cérébrale dans le cortex, le striatum et l'hippocampe a été évaluée par imagerie des tenseurs de diffusion (DTI). La séquence EPI-DTI (echo planar imaging – diffusion tensor imaging) a été paramétrée : TE/TR, 50 ms/2500 ms ; durée des gradients de diffusion (δ), 5 ms ; délai entre les gradients de diffusion (Δ), 10 ms ; valeurs de b, 0 et 800 mm²/s² ; 12 directions ; 4 segments EPI ; résolution dans le plan, 78x78 μ m²/pixel ; 10 coupes/1 mm ; temps d'acquisition, 14 min 40 s.

Une séquence RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) pondérée en T2 a été utilisée pour le placement du voxel en ¹H SRM et elle a été paramétrée avec : TE/TR, 12 ms/2000 ms ; résolution dans le plan, 78x78 μ m²/pixel ; 13 coupes/1 mm ; temps d'acquisition, 5 min 20 s ; 8, facteur de RARE. La séquence RARE a été synchronisée avec la fréquence respiratoire (~40 cycles/min).

Compte tenu des modifications neurochimiques rapportées dans la littérature (*Cf. 5.3.1.2., p.128*) et des résultats obtenus en DTI, il a été privilégié d'étudier le métabolisme de l'hippocampe par ¹H SRM. La séquence PRESS (Point Resolved Spectroscopy) a été utilisée avec les paramètres suivants : taille voxel, 2 x 2 x 2 mm³ ; TE/TR, 16 ms/4000 ms ; bande spectrale, 4006,41 Hz (13,34 ppm) ; 2048 points ; temps d'acquisition, 20 min. Le module VAPOR a été utilisé pour la suppression d'eau afin d'observer les métabolites cérébraux. Le module OVS est activé pour supprimer le signal en dehors du voxel. Une homogénéisation du champ magnétique B₀ de premier et second ordre a été effectuée au sein du voxel.

7.1.3. Analyse des données DTI et ¹H SRM

7.1.3.1. Analyse des paramètres DTI

Les paramètres mesurés en DTI sont la diffusivité moyenne (MD) et la fraction d'anisotropie (FA). Pour rappel, la MD est la moyenne des valeurs propres exprimée en mm²/s et elle correspond à la vitesse de la diffusion des mouvements des molécules d'eau. La FA quantifie le degré de directionnalité de la diffusion avec des valeurs comprises entre 0 (milieu isotrope) à 1 (milieu anisotrope). Après l'acquisition des données DTI (dans chaque direction et pour chaque valeur de b), des cartographies FA et MD sont construites à l'aide du logiciel Paravision 5.1 (Bruker, Ettlingen, Allemagne). Une moyenne de ces paramètres a été calculée pour chaque structure cérébrale (cortex cérébral, striatum et hippocampe) chez les souris analysées.

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Comme représenté dans la figure 7.2, les mesures des paramètres DTI ont été réalisées dans trois régions d'intérêts (ROI) : le cortex cérébral (3 coupes, $\sim 0,10 \text{ cm}^2$), le striatum (2 coupes, $\sim 0,08 \text{ cm}^2$) et l'hippocampe (2 coupes, $\sim 0,08 \text{ cm}^2$).

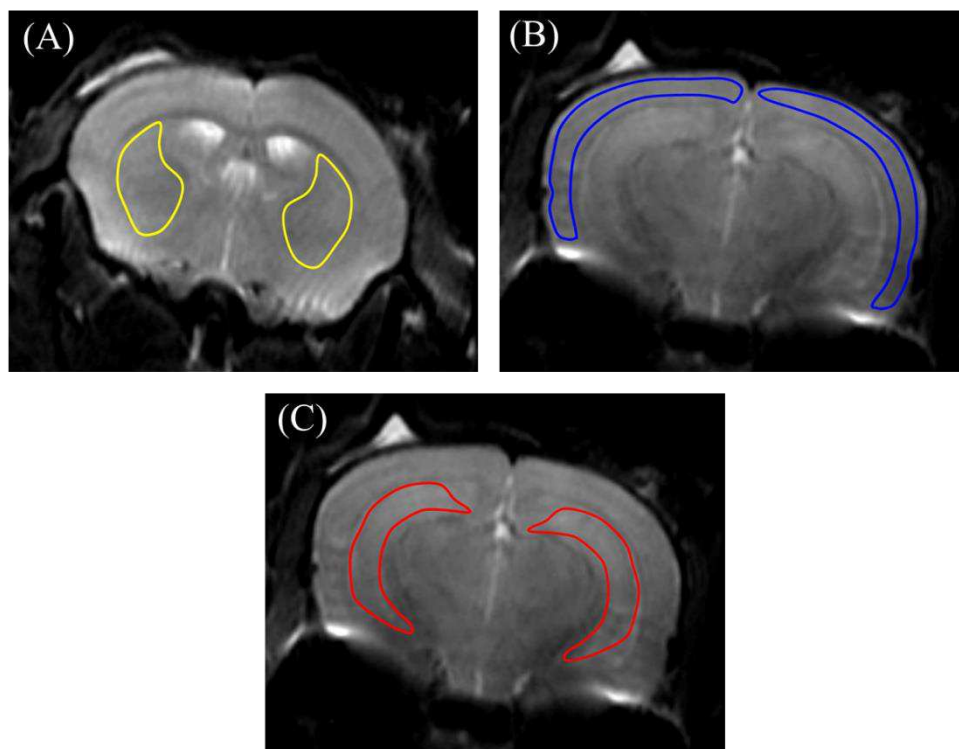


Figure 7.2 : Images DTI obtenues au niveau cérébral chez une souris mâle contrôle avec les régions d'intérêts sélectionnées au niveau : (A) Striatum ; (B) Cortex ; (C) Hippocampe.

7.1.3.2. Quantification spectrale

Les spectres ont été analysés à l'aide du logiciel jMRUI (version 6.0 beta). Une apodisation de 2 Hz est appliquée aux données spectrales. Les métabolites cérébraux ont été quantifiés dans le domaine temporel par l'algorithme AMARES (Advanced Method for Accurate, Robust and Efficient Spectral) (Cf. 2.3.3.2., p.52) et les valeurs obtenues sont exprimées en unité arbitraire (U.A.).

7.1.4. L'optimisation *in vitro* et la validation *in vivo* de la séquence de diffusion spectroscopique

La diffusion spectroscopique permet de mesurer la diffusion des métabolites (Cf. 2.4., p.55). Certains métabolites au niveau cérébral sont considérés comme des biomarqueurs spécifiques d'un compartiment cellulaire et la DWS a donc le potentiel d'apporter des informations biologiques pertinentes sur ces compartiments. Dans le cadre de ces travaux de thèse, une séquence DWS-PRESS a été développée par Didier Wecker (Bruker, Ettlingen, Allemagne).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Les tests *in vitro* de l'optimisation de cette séquence ainsi que de la validation chez la souris sont présentés dans ce chapitre.

7.1.4.1. Optimisation *in vitro*

Les expériences préliminaires de la séquence de diffusion spectroscopique DWS-PRESS (Cf. 1^{ère} partie, Chap. 2) ont été effectuées sur un fantôme de gel d'agarose 1% contenant de la choline et du NAA à une concentration de 15 mM. Les tests ont consisté aux variations successives des paramètres de la séquence DWS-PRESS : le temps d'écho (TE) et le temps de répétition (TR), la durée des gradients de diffusion (δ) et le délai entre les gradients de diffusion (Δ). Les valeurs de b sont : 0, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 et 6000 s/mm². Ces tests ont été réalisés dans la direction x compte tenu que le tube de gel d'agarose est un milieu isotrope avec un voxel de 2 x 2 x 2 mm³ et 150 accumulations.

(1) Test du TE : Les paramètres δ/Δ ont été fixés à 12 ms/22 ms afin que la puissance des gradients soit à 50% pour la valeur de b à 6000 s/mm². Pour un TR à 2500ms, les valeurs testées pour TE sont 75 ms ; 100 ms ; 125 ms ; 150 ms ; 175 ms.

(2) Test du TR : Les paramètres δ/Δ ont été fixés à 12 ms/22 ms afin que la puissance des gradients soit à 50% pour la valeur de b à 6000 s/mm². Pour un TE à 75 ms, les valeurs testées pour TR sont 1500 ms ; 2000 ms ; 2500 ms ; 3000 ms ; 3500 ms.

(3) Test de la durée des gradients de diffusion δ : Les paramètres de TE/TR (75 ms/2500 ms) ont été fixés. Avec un délai Δ de 22 ms, les valeurs testées pour δ sont 8 ms ; 10 ms ; 12 ms ; 14 ms ; 16 ms.

(4) Test du délai entre les gradients de diffusion Δ : Les paramètres de TE/TR (75 ms/2500 ms) ont été fixés. Avec une durée δ de 12 ms, les valeurs testées pour Δ sont : 18 ms ; 20 ms ; 22 ms ; 24 ms ; 26 ms.

7.1.4.2. Validation *in vivo*

Après l'optimisation, la séquence DWS-PRESS a été testée chez des souris âgées de 5 semaines et exposées pendant la période périnatale au traitement contrôle (CTR) ou au mélange de BPA dichlorés (mix-DCBPA). Ces souris présentaient un phénotype sauvage (WT) ou hétérozygote (HZ) pour la connexine 43 (n=6/groupe). Le voxel (2 x 2 x 2 mm³) a été positionné au niveau de l'hippocampe. Les paramètres suivants ont été utilisés : δ = 14 ms ; Δ = 20 ms ; TE = 75 ms ; TR = 3000 ms ; 200 accumulations (10 min).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

La gamme des valeurs de b (0 – 1500 – 3000 – 4500 – 6000 s/mm²) a été appliquée dans trois directions orthogonales (x, y, z) afin de mesurer les valeurs du coefficient de diffusion (ADC) de la choline, la créatine et le NAA. Le module de suppression d'eau VAPOR a été utilisé pour la suppression d'eau afin d'observer les métabolites cérébraux. Le module OVS est activé pour supprimer le signal en dehors du voxel. Une homogénéisation du champ magnétique B_0 de premier et second ordre a été effectuée au sein du voxel.

La quantification des pics (NAA, choline et créatine) a été réalisée pour chaque valeur de b en utilisant l'algorithme AMARES (logiciel jMRUI version 6.0 beta). Des graphes des intensités des pics en fonction des valeurs de b sont tracés. La valeur du coefficient de diffusion (ADC) moyen est déterminée par régression linéaire en traçant le logarithme de l'atténuation du signal S/S_0 en fonction des valeurs de b (Cf. 2.4.2.2., p.59).

7.1.5. Les méthodes statistiques

L'analyse de variance (ANOVA ; test non-paramétrique) est effectuée sur les données de DTI, ¹H SRM et DWS *in vivo* pour la comparaison globale de l'interaction phénotype et traitement (Kruskall-Wallis with post-hoc Dunn) (GraphPad Prism 5.1).

7.2. Résultats et Conclusions

7.2.1. Evaluation de la structure cérébrale par DTI

Dans la littérature, il a été rapporté des modifications morphologiques induites par l'exposition au BPA au niveau du cortex, du striatum et de l'hippocampe (Cf. 5.3.1.1., p.127). Dans le cadre de ces travaux de thèse, l'imagerie des tenseurs de diffusion (DTI) a été utilisée pour étudier les modifications de la microstructure dans ces structures lors de l'exposition pendant la période périnatale aux traitements BPA et à ses dérivés chlorés.

A partir des données DTI, il est possible de réaliser une cartographie de la fraction d'anisotropie en fonction des principales directions. Sur la **figure 7.3A**, il est observable le corps calleux qui possèdent des faisceaux transverses très orientés dans la direction droite-gauche (en rouge) reliant les deux hémisphères cérébraux. Sur une image pondérée en T2 illustrée dans la **figure 7.3B**, les faisceaux du corps calleux apparaissent en hyposignal. En comparaison du corps calleux, le cortex cérébral et l'hippocampe ne présentent pas de direction principale sur la cartographie de la fraction d'anisotropie.

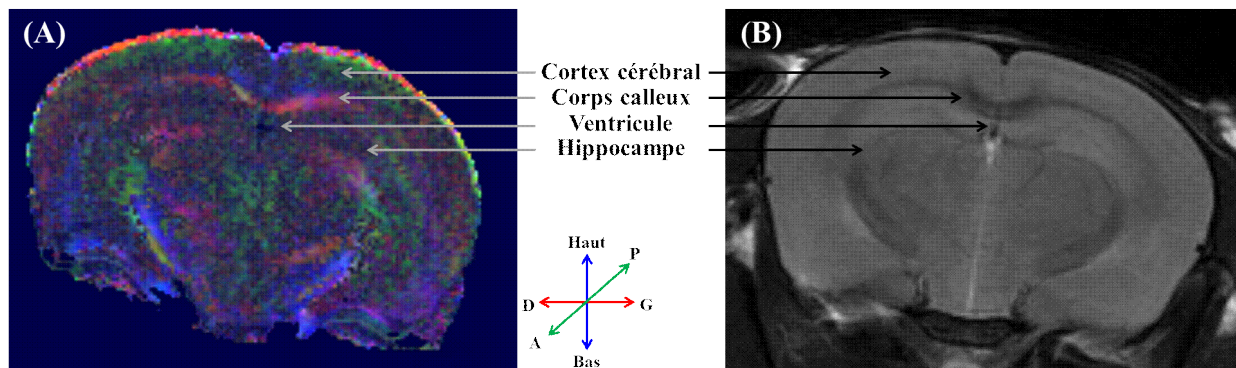


Figure 7.3 : (A) Cartographie de la fraction d'anisotropie au niveau cérébral chez une souris mâle contrôle (direction droite-gauche en rouge, direction haut en bas en bleu et direction antéro-postérieur en vert) ; (B) Image pondérée en T2 au niveau cérébral chez une souris mâle contrôle (séquence RARE).

Par conséquent, il est nécessaire de quantifier la fraction d'anisotropie (FA) et la diffusivité moyenne (MD) pour avoir accès à l'information sur la microstructure. Il a été ainsi sélectionné des régions d'intérêts (striatum, cortex et hippocampe) sur les images obtenues en DTI. Les moyennes des valeurs de MD et de FA ont été effectuées au sein de chaque structure pour chaque souris et elles sont présentées dans la suite de ce chapitre.

7.2.1.1. Striatum

La **figure 7.4** présente les moyennes de la diffusivité moyenne (**Fig. 7.4A et 7.4B**) et de la fraction d'anisotropie (**Fig. 7.4C et 7.4D**) mesurées dans le striatum des souris mâles exposées au BPA et à ses dérivés chlorés.

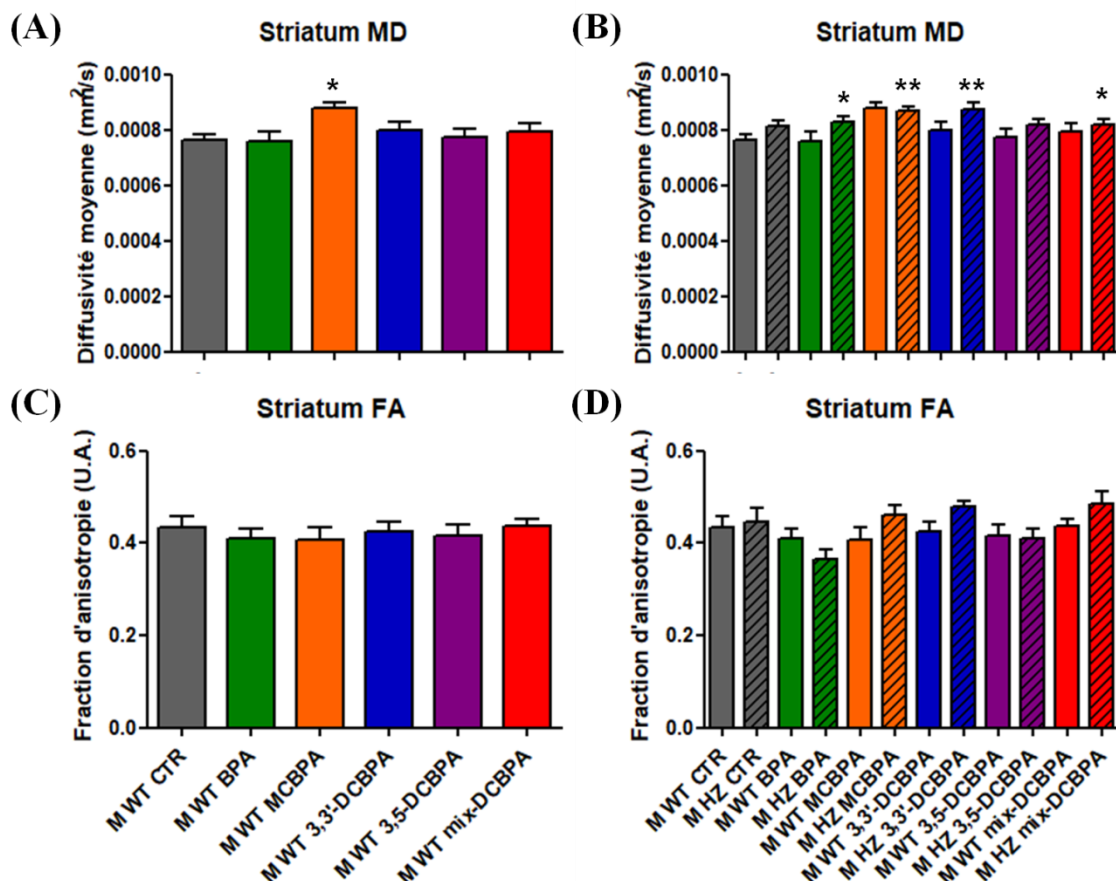


Figure 7.4 : Paramètres des tenseurs de diffusion mesurés au niveau du striatum chez les souris mâles. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM.

(A) Diffusivité moyenne chez les mâles sauvages (WT) pour les traitements BPA et ses dérivés chlorés et (B) comparaison des mâles WT et hétérozygotes (HZ) ;

(C) Fraction d'anisotropie chez les mâles sauvages (WT) pour les traitements BPA et ses dérivés chlorés et (D) comparaison des mâles WT et hétérozygotes (HZ).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs M WT CTR.

Une augmentation de la diffusivité moyenne dans le striatum a été observée suite à l'exposition périnatale au BPA monochloré chez les souris mâles WT ($+15,2\%$; $8,804 \cdot 10^{-4} \pm 1,851 \cdot 10^{-5}$ vs M WT CTR = $7,641 \cdot 10^{-4} \pm 1,878 \cdot 10^{-5}$) alors que les traitements par le BPA et ses dérivés dichlorés n'induisent pas de variation (**Fig. 7.4A**).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

En comparaison avec le groupe M WT CTR, une élévation de la MD a été mesurée chez les souris au phénotype hétérozygote pour la connexine 43 exposées aux traitements BPA (+8,5% ; $8,293.10^{-4} \pm 1,798.10^{-5}$), MCBPA (+13,8% ; $8,698.10^{-4} \pm 1,567.10^{-5}$), 3,3'-DCBPA (+14,0% ; $8,710.10^{-4} \pm 2,689.10^{-5}$) et mix-DCBPA (+7,0% ; $8,178.10^{-4} \pm 1,825.10^{-5}$) mais pas dans le groupe 3,5-DCBPA ($8,181.10^{-4} \pm 2,194.10^{-5}$) (**Fig. 7.4B**). Néanmoins, aucune différence significative n'a été mesurée pour la fraction d'anisotropie parmi ces traitements (**Fig. 7.4C et 7.4D**).

La **figure 7.5** montre les moyennes de la diffusivité moyenne (**Fig. 7.5A et 7.5B**) et de la fraction d'anisotropie (**Fig. 7.5C et 7.5D**) mesurées dans le striatum des souris femelles exposées au BPA et à ses dérivés chlorés.

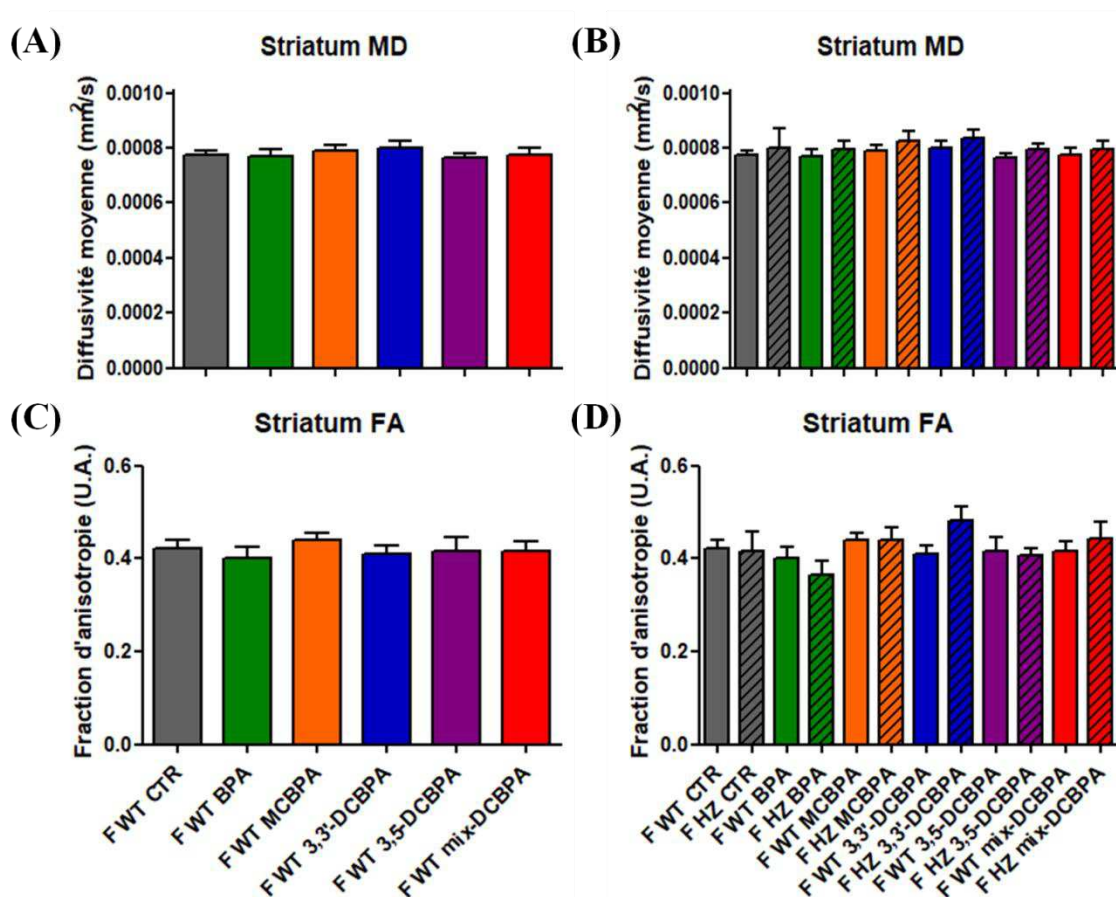


Figure 7.5 : Paramètres des tenseurs de diffusion mesurés au niveau du striatum chez les souris femelles. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM.

(A) Diffusivité moyenne chez les femelles sauvages (WT) pour les traitements BPA et ses dérivés chlorés et (B) comparaison des femelles WT et hétérozygotes (HZ) ;

(C) Fraction d'anisotropie chez les femelles sauvages (WT) pour les traitements BPA et ses dérivés chlorés et (D) comparaison des femelles WT et hétérozygotes (HZ).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Par contraste aux résultats des souris mâles, l'exposition lors de la période périnatale aux traitements BPA et à ses dérivés chlorés (MCBPA, 3,3'-DCBPA et/ou 3,5-DCBPA) ne modifient pas les paramètres de la diffusivité moyenne et de la fraction d'anisotropie chez les femelles (**Fig. 7.5A et 7.5C**). De plus, les souris au phénotype hétérozygote pour la connexine 43 ne présentent pas de différence significative entre les traitements pour les paramètres DTI (**Fig. 7.5B et 7.5D**).

7.2.1.2. Cortex cérébral

La **figure 7.6** illustre les moyennes de la diffusivité moyenne (**Fig. 7.6A et 7.6B**) et de la fraction d'anisotropie (**Fig. 7.6C et 7.6D**) obtenues dans le cortex cérébral des souris mâles exposées au BPA et à ses dérivés chlorés.

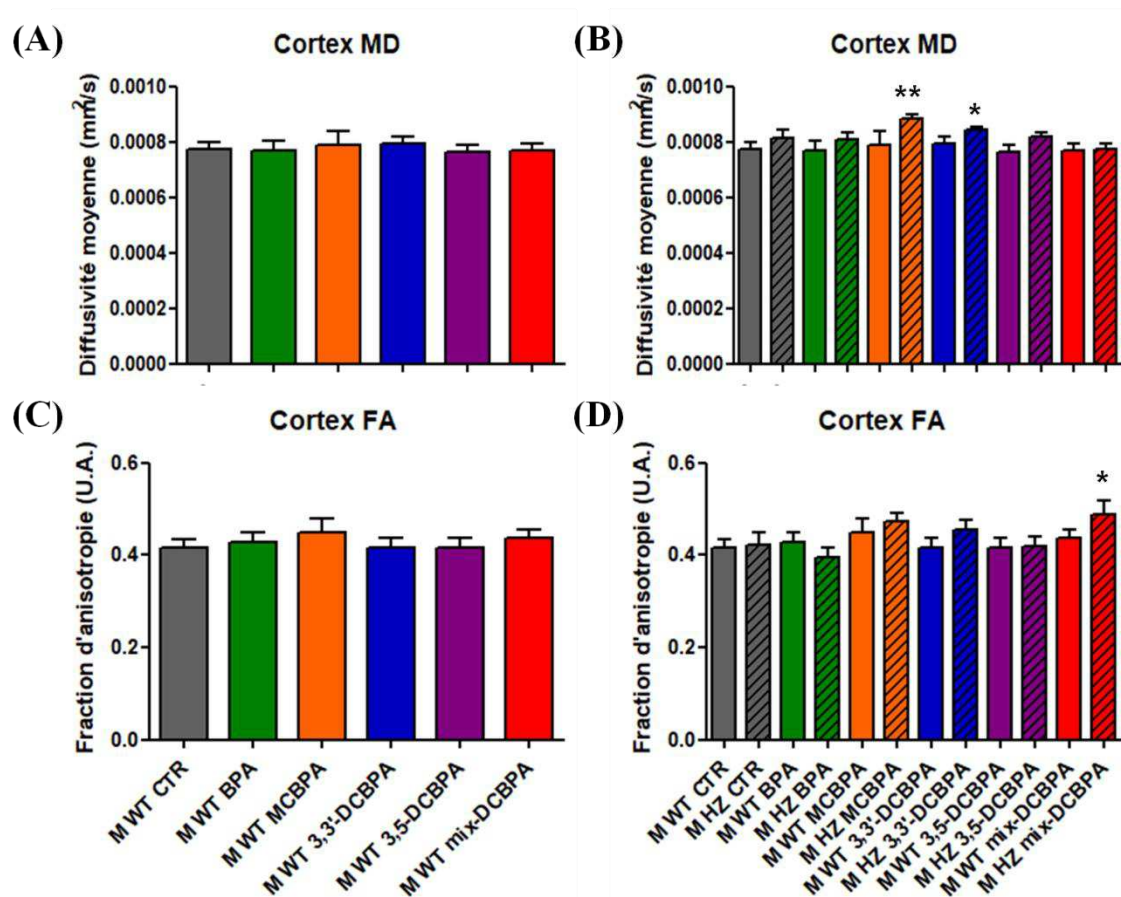


Figure 7.6 : Paramètres des tenseurs de diffusion mesurés au niveau du cortex chez les souris mâles. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM.

(A) Diffusivité moyenne chez les mâles sauvages (WT) pour les traitements BPA et ses dérivés chlorés et (B) comparaison des mâles WT et hétérozygotes (HZ) ;

(C) Fraction d'anisotropie chez les mâles sauvages (WT) pour les traitements BPA et ses dérivés chlorés et (D) comparaison des mâles WT et hétérozygotes (HZ).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

En comparaison au groupe contrôle, aucune différence n'a été observée pour les valeurs de la diffusivité moyenne ou de la fraction d'anisotropie au niveau du cortex cérébral chez les mâles exposés en période périnatale au BPA ou à ses dérivés monochloré et dichlorés (3,3'-DCBPA et/ou 3,5-DCBPA) (**Fig. 7.6A et 7.6C**). De plus, le phénotype hétérozygote induit une augmentation significative de la MD chez les mâles exposés aux traitements MCBPA (+14,2% ; $8,842.10^{-4} \pm 1,560.10^{-5}$) et 3,3-DCBPA (+9,2% ; $8,450.10^{-4} \pm 1,059.10^{-5}$) comparé aux M WT CTR ($7,741.10^{-4} \pm 2,191.10^{-5}$) (**Fig. 7.6B**). Il a été également mesuré une augmentation de la FA dans le groupe M HZ mix-DCBPA (+17,3% ; $0,489 \pm 0,030$) par comparaison aux souris mâles sauvages contrôles ($0,417 \pm 0,017$) (**Fig. 7.6D**).

La **figure 7.7** montre les moyennes de la diffusivité moyenne (**Fig. 7.7A et 7.7B**) et de la fraction d'anisotropie (**Fig. 7.7C et 7.7D**) obtenues dans le cortex cérébral des souris femelles exposées au BPA et à ses dérivés chlorés.

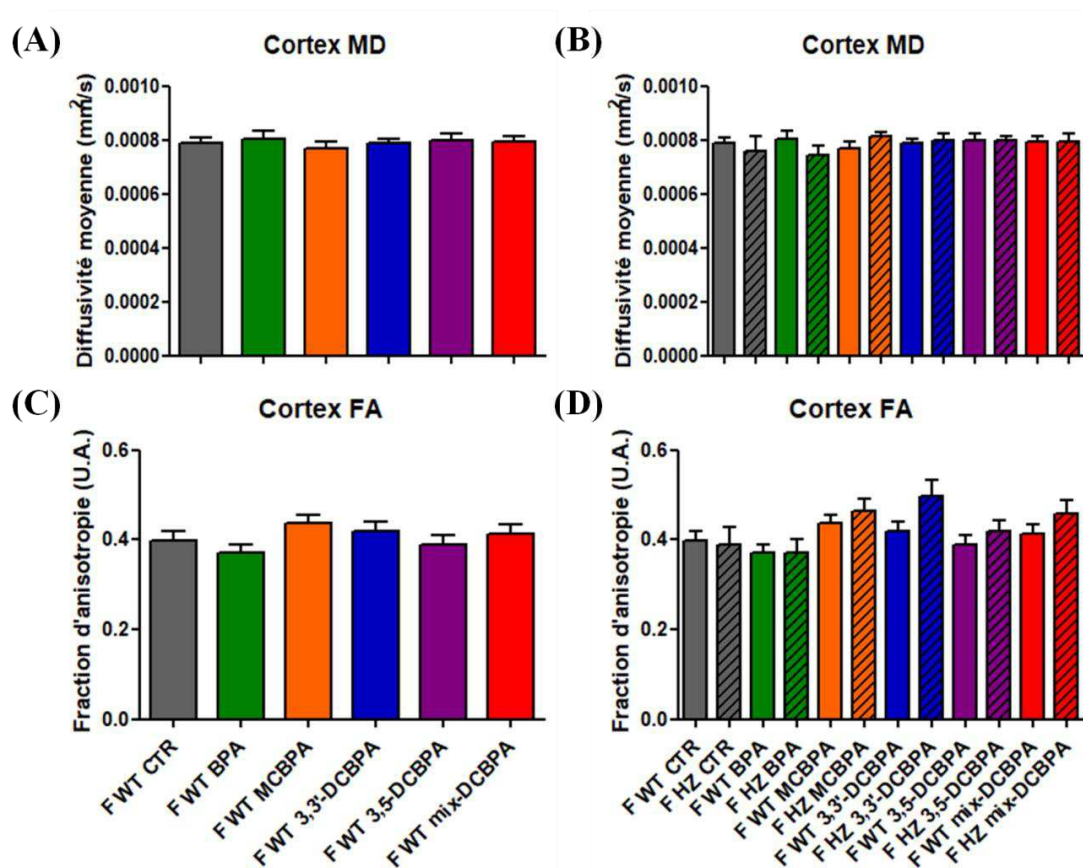


Figure 7.7 : Paramètres des tenseurs de diffusion mesurés au niveau du cortex chez les souris femelles. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM.

(A) Diffusivité moyenne chez les femelles sauvages (WT) pour les traitements BPA et ses dérivés chlorés et (B) comparaison des femelles WT et hétérozygotes (HZ) ;
(C) Fraction d'anisotropie chez les femelles sauvages (WT) pour les traitements BPA et ses dérivés chlorés et (D) comparaison des femelles WT et hétérozygotes (HZ).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

A la différence des souris mâles, l'exposition en période périnatale aux traitements BPA ou à ses dérivés chlorés (MCBPA, 3,3'-DCBPA et/ou 3,5-DCBPA) et le phénotype hétérozygote ne modifient pas les paramètres de la diffusivité moyenne et de la fraction d'anisotropie chez les femelles (Fig. 7.7).

7.2.1.3. Hippocampe

La **figure 7.8** présente les moyennes de la diffusivité moyenne (Fig. 7.8A et 7.8B) et de la fraction d'anisotropie (Fig. 7.8C et 7.8D) quantifiées dans l'hippocampe des souris mâles exposées au BPA et à ses dérivés chlorés.

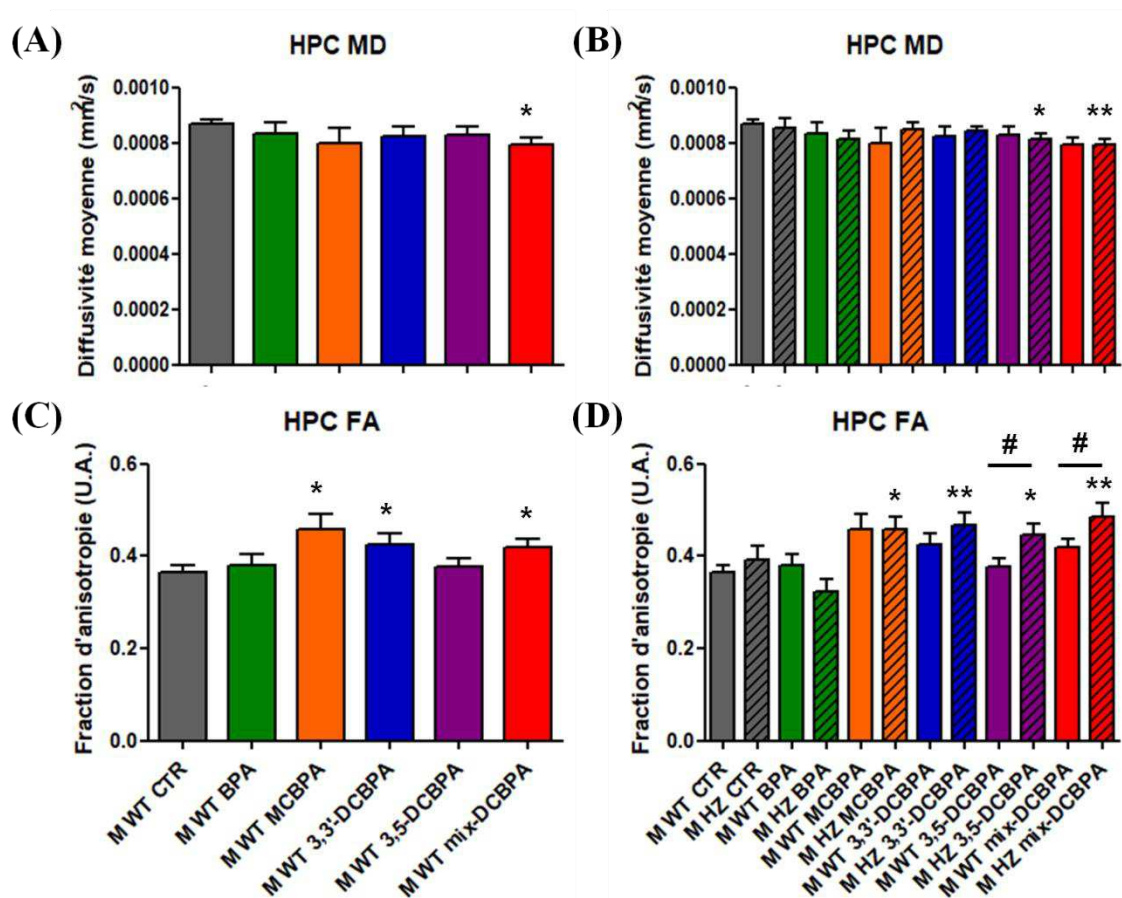


Figure 7.8 : Paramètres des tenseurs de diffusion mesurés au niveau de l'hippocampe chez les souris mâles. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM.

(A) Diffusivité moyenne chez les mâles sauvages (WT) pour les traitements BPA et ses dérivés chlorés et (B) comparaison des mâles WT et hétérozygotes (HZ) ;

(C) Fraction d'anisotropie chez les mâles sauvages (WT) pour les traitements BPA et ses dérivés chlorés et (D) comparaison des mâles WT et hétérozygotes (HZ).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs M WT CTR et # $p < 0,05$ vs M HZ du même traitement.

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Une diminution significative de la MD a été mesurée chez les souris mâles WT exposées à mix-DCBPA (-8,8% ; $7,918.10^{-4} \pm 2,830.10^{-5}$ vs M WT CTR= $8,683.10^{-4} \pm 1,432.10^{-5}$) alors que les traitements BPA, MCBPA, 3,3'-DCBPA et 3,5-DCBPA ne montrent aucun changement (**Fig. 7.8A**). En comparaison des souris mâles sauvages contrôles, une diminution significative de MD est observée chez les souris hétérozygotes dans les groupes M HZ 3,5-DCBPA (6,2% ; $8,141.10^{-4} \pm 2,045.10^{-5}$) et M HZ mix-DCBPA (-8,9% ; $7,910.10^{-4} \pm 2,366.10^{-5}$) (**Fig. 7.8B**).

En comparaison du groupe M WT CTR ($0,365 \pm 0,016$), la FA est significativement augmentée chez les souris mâles sauvages exposées aux traitements MCBPA (+25,3% ; $0,458 \pm 0,034$), 3,3'-DCBPA (+16,4% ; $0,425 \pm 0,023$) et mix-DCBPA (+14,8% ; $0,420 \pm 0,018$) alors qu'elle reste inchangée pour le BPA et 3,5-DCBPA (**Fig. 7.8C**). Une élévation similaire est retrouvée chez les souris mâles hétérozygotes pour les traitements MCBPA (+25,7% ; $0,459 \pm 0,026$), 3,3'-DCBPA (+27,4% ; $0,466 \pm 0,027$), 3,5-DCBPA (+21,7% ; $0,445 \pm 0,025$) et mix-DCBPA (+32,6% ; $0,485 \pm 0,029$) (**Fig. 7.8D**).

La **figure 7.9** représente les moyennes de la diffusivité moyenne (**Fig. 7.9A et 7.9B**) et de la fraction d'anisotropie (**Fig. 7.9C et 7.9D**) quantifiées dans l'hippocampe des souris femelles exposées au BPA et à ses dérivés chlorés.

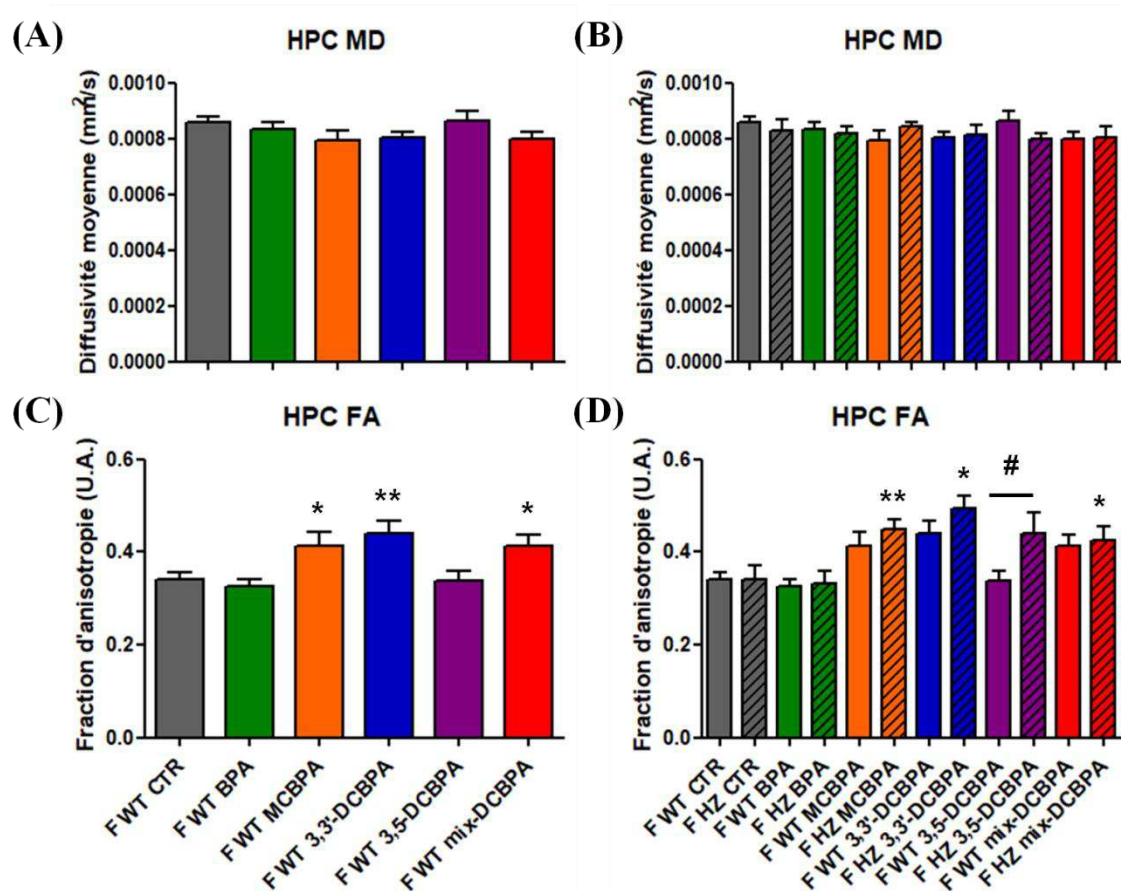


Figure 7.9 : Paramètres des tenseurs de diffusion mesurés au niveau de l'hippocampe chez les souris femelles. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM.

(A) Diffusivité moyenne chez les femelles sauvages (WT) pour les traitements BPA et ses dérivés chlorés et (B) comparaison des femelles WT et hétérozygotes (HZ) ;

(C) Fraction d'anisotropie chez les femelles sauvages (WT) pour les traitements BPA et ses dérivés chlorés et (D) comparaison des femelles WT et hétérozygotes (HZ).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs M WT CTR et # $p < 0,05$ vs M HZ du même traitement.

Par contraste aux résultats obtenus chez les mâles, aucune variation de la MD n'a été observée chez les femelles sauvages et hétérozygotes exposées au BPA ou à ses dérivés chlorés (MCBPA, 3,3'-DCBPA et/ou 3,5-DCBPA) (**Fig. 7.9A et 7.9B**).

En comparaison du groupe des souris sauvages contrôles ($0,342 \pm 0,016$), il a été observé une augmentation significative de la FA chez les souris femelles sauvages pour MCBPA (+20,6% ; $0,412 \pm 0,031$), 3,3'-DCBPA (+28,3% ; $0,4385 \pm 0,028$) et mix-DCBPA (+24,4% ; $0,4252 \pm 0,029$) (**Fig. 7.9C**). Cette hausse de la FA est également mesurée chez les souris hétérozygotes exposées aux traitements MCBPA (+31,7% ; $0,450 \pm 0,021$), 3,3'-DCBPA (+44,5% ; $0,494 \pm 0,026$), 3,5-DCBPA (+29,1% ; $0,441 \pm 0,044$) et mix-DCBPA (+24,4% ; $0,425 \pm 0,029$) (**Fig. 7.9D**).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

7.2.1.4. Conclusion

L'imagerie des tenseurs de diffusion a précédemment servi en toxicologie au niveau cérébral pour la détection de biomarqueurs pour l'exposition aux pesticides et dans l'étude de l'addiction (e.g. alcool, cocaïne) (Ma et al. 2015; Lewis et al. 2017). Dans notre étude, nous avons utilisé cette méthode pour évaluer les effets de l'exposition périnatale au BPA et à ses dérivés chlorés (20 µg/kg/jour) sur la microstructure du cerveau de jeunes souris âgées de 5 semaines.

Les variations significatives de la diffusivité moyenne (MD) et de la fraction d'anisotropie (FA) mesurées par imagerie des tenseurs de diffusion dans le striatum, le cortex cérébral et l'hippocampe sont résumées dans le **tableau 7.2** selon le traitement, le phénotype et le sexe.

Tableau 7.2 : Récapitulatif des effets mesurés par DTI dans le striatum, le cortex et l'hippocampe (HPC) chez les souris mâles (M) et femelles (F), sauvages (WT) ou hétérozygotes (HZ) pour la connexine 43 lors d'une exposition périnatale au BPA et à ses dérivés chlorés

Sexe+ Phénotype/ traitement	BPA	MCBPA	3,3'-DCBPA	3,5-DCBPA	mix-DCBPA
M WT	∅	↑ MD Striatum ↑ FA HPC	↑ FA HPC	∅	↓ MD HPC ↑ FA HPC
M HZ	↑ MD Striatum	↑ MD Striatum ↑ MD Cortex ↑ FA HPC	↑ MD Striatum ↑ MD Cortex ↑ FA HPC	↓ MD HPC ↑ FA HPC	↑ MD Striatum ↑ FA Cortex ↓ MD HPC ↑ FA HPC
F WT	∅	↑ FA HPC	↑ FA HPC	∅	↑ FA HPC
F HZ	∅	↑ FA HPC	↑ FA HPC	↑ FA HPC	↑ FA HPC

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

La comparaison entre les structures cérébrales étudiées met en évidence un effet prépondérant des traitements MCBPA et 3,3'-DCBPA, mix-DCBPA dans l'hippocampe des souris sauvages alors que les variations dans le striatum et le cortex cérébral sont moins marquées. En effet, l'exposition périnatale aux dérivés MCBPA et 3,3'-DCBPA induit une hausse de la fraction d'anisotropie dans l'hippocampe alors que le BPA et le dérivé dichloré 3,5-DCBPA n'induisent pas de modifications. Le mélange de dichlorés (10 µg/kg/jour de 3,3'-DCBPA et 10 µg/kg/jour de 3,5-DCBPA) induit une élévation de la FA dans l'hippocampe des souris sauvages et cela pourrait être lié à un effet de 3,3'-DCBPA à faible dose. Cette hausse de la fraction d'anisotropie au niveau de l'hippocampe pourrait indiquer une modification de la microstructure reflétant des possibles perturbations de la myélinisation dans la substance blanche ou de l'organisation des axones.

L'augmentation de la fraction d'anisotropie par les traitements (MCBPA, 3,3'-DCBPA et mix-DCBPA) dans l'hippocampe des souris sauvages est similaire chez les mâles et les femelles. De plus, la hausse de la fraction d'anisotropie s'accompagne d'une baisse la diffusivité moyenne chez les souris mâles exposées au mélange de dérivés dichlorés. Cela indique que les effets sont plus prononcés chez les souris mâles que les souris femelles exposées au mélange de dichlorés. Nous faisons l'hypothèse d'une sensibilité accrue chez les mâles lors d'une exposition à une faible dose de 10 µg/kg/jour présent dans le mélange de dérivés dichlorés et plus particulièrement à 3,3'-DCBPA.

Le phénotype hétérozygote pour la connexine 43 ne montre pas de variation des paramètres des tenseurs de diffusion mesurés dans l'hippocampe chez les souris contrôles ou lors de l'exposition au BPA et à ses dérivés chlorés. Néanmoins, une hausse de la diffusivité moyenne et de la fraction d'anisotropie est quantifiée dans le striatum et le cortex chez les souris mâles hétérozygotes exposées à MCBPA et 3,3'-DCBPA alors que cette variation n'est pas décelable chez les femelles. Il est possible que la sensibilité liée au phénotype hétérozygote dans l'hippocampe soit masquée par l'effet prépondérant du traitement.

Compte tenu de l'augmentation de la fraction d'anisotrope dans l'hippocampe induite par l'exposition périnatale aux dérivés chlorés du BPA, il a été examiné dans la suite de ce chapitre les effets sur le métabolisme hippocampique par ¹H SRM liés à ces traitements ainsi que l'influence du sexe et du phénotype pour la connexine 43.

7.2.2. Evaluation du métabolisme hippocampique par ^1H SRM

7.2.2.1. Validation qualitative du placement du voxel

Au préalable de l'étude du métabolisme hippocampique lors de l'exposition périnatale au BPA et à ses dérivés chlorés, il a été réalisé des tests préliminaires sur la position et la taille du voxel. Les spectres ^1H ont été acquis à l'aide d'une séquence PRESS avec les paramètres expérimentaux identiques à ceux utilisés pour l'étude du BPA, à l'exception de la durée d'acquisition de 10 min (150 accumulations) au lieu de 20 min (300 accumulations).

Dans un premier temps, le voxel de la taille de $2,5 \times 2,5 \times 2,5 \text{ mm}^3$ a été placé dans l'hippocampe en incluant le cortex cérébral (**Fig. 7.10A**). Un pic de macromolécules d'intensité élevée et de largeur importante est observable et ce dernier altère la qualité spectrale en déformant la ligne de base (**Fig. 7.10C**).

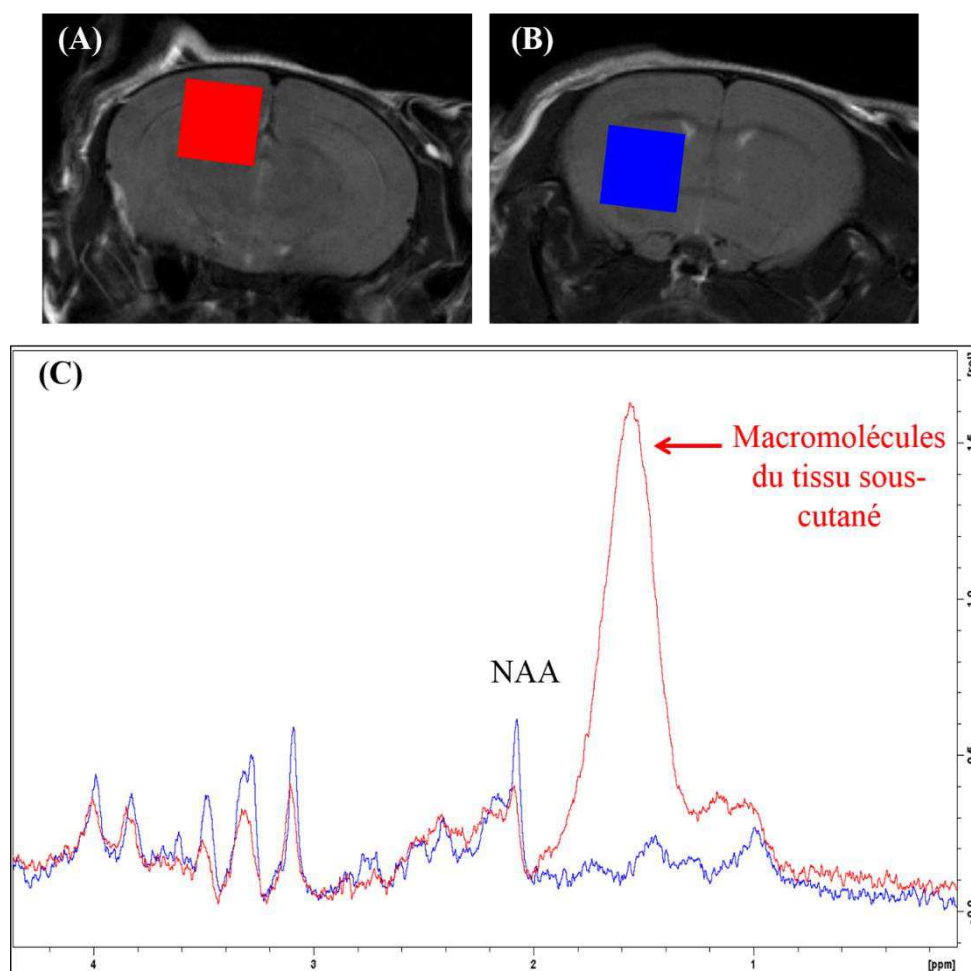


Figure 7.10 : Positionnement des voxels ($2,5 \times 2,5 \times 2,5 \text{ mm}^3$) dans l'hippocampe en (A) (rouge) ou dans le striatum en (B) (bleu) ; (C) Spectres ^1H obtenus dans les voxel placés en (A) (rouge) et en (B) (bleu).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Il a été conjecturé que ce pic de macromolécules est une contamination des lipides sous-cutanés dans le voxel, lesquels sont captés lors des mouvements verticaux de la tête de l'animal lors du cycle respiratoire. Pour valider cette hypothèse, un spectre ^1H a été acquis avec un voxel de $2,5 \times 2,5 \times 2,5 \text{ mm}^3$ placé dans le striatum (**Fig. 7.10B**). Ce voxel étant placé à une distance suffisamment éloignée du tissu sous-cutané, le pic de macromolécules a une intensité inférieure à celle du pic de NAA (**Fig. 7.10C**).

Dans un second temps, afin d'éviter la contamination des lipides sous-cutanés, il a été choisi une taille de voxel plus petite ($2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$). Une comparaison a été réalisée entre deux voxels placés dans l'hippocampe en incluant ou en excluant le cortex cérébral (**Fig. 7.11A et 7.11B**).

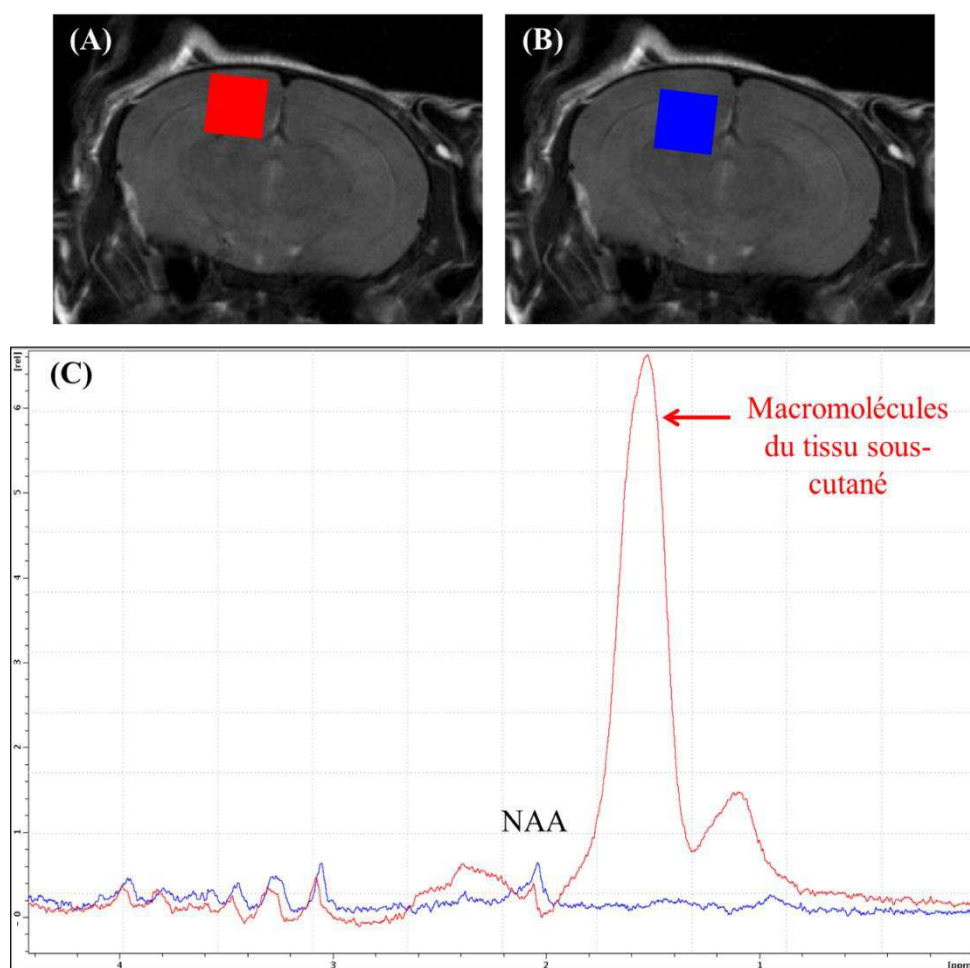


Figure 7.11 : Positionnement des voxels ($2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$) dans l'hippocampe en incluant (A) (rouge) ou en excluant (B) (bleu) le cortex cérébral ; (C) Spectres ^1H obtenus dans les voxels placés en (A) (rouge) et en (B) (bleu).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Il peut être observé que le spectre du voxel incluant le cortex cérébral présente un pic de macromolécules important alors que le pic de macromolécules dans le spectre du voxel excluant le cortex cérébral a une intensité inférieure à celle du NAA (**Fig. 7.11C**).

En conclusion, pour la suite du projet, le voxel a donc été positionné dans l'hippocampe droit avec des repères anatomiques fiables. Le voxel a été placé en dessous du cortex et à la limite du corps calleux ainsi qu'en dehors des ventricules latéraux comme représenté dans la **figure 7.11B**. Lors de l'installation de l'animal sur le lit IRM, une cale en polystyrène a été placée sur la tête de la souris pour limiter les mouvements verticaux liés au cycle respiratoire.

7.2.2.2. Effets du BPA et de ses dérivés chlorés sur le métabolisme de l'hippocampe

Le métabolisme de l'hippocampe a été mesuré par ^1H SRM pour évaluer les conséquences de l'exposition périnatale au BPA et à ses dérivés chlorés en fonction du sexe et du phénotype pour la connexine 43 (sauvage ou hétérozygote).

Pour rappel, les métabolites peuvent être divisés en trois catégories (Cf. 2.1.3.1., p.36) : l'homéostasie cellulaire (en bleu créatine+phosphocréatine, choline, taurine sur la **Fig. 7.12**), les neurotransmetteurs (en rouge NAAG, glutamate et pool glutamate+glutamine sur la **Fig. 7.12**) et les métabolites spécifiques à un compartiment cellulaire (en vert NAA et mI sur la **Fig. 7.12**).

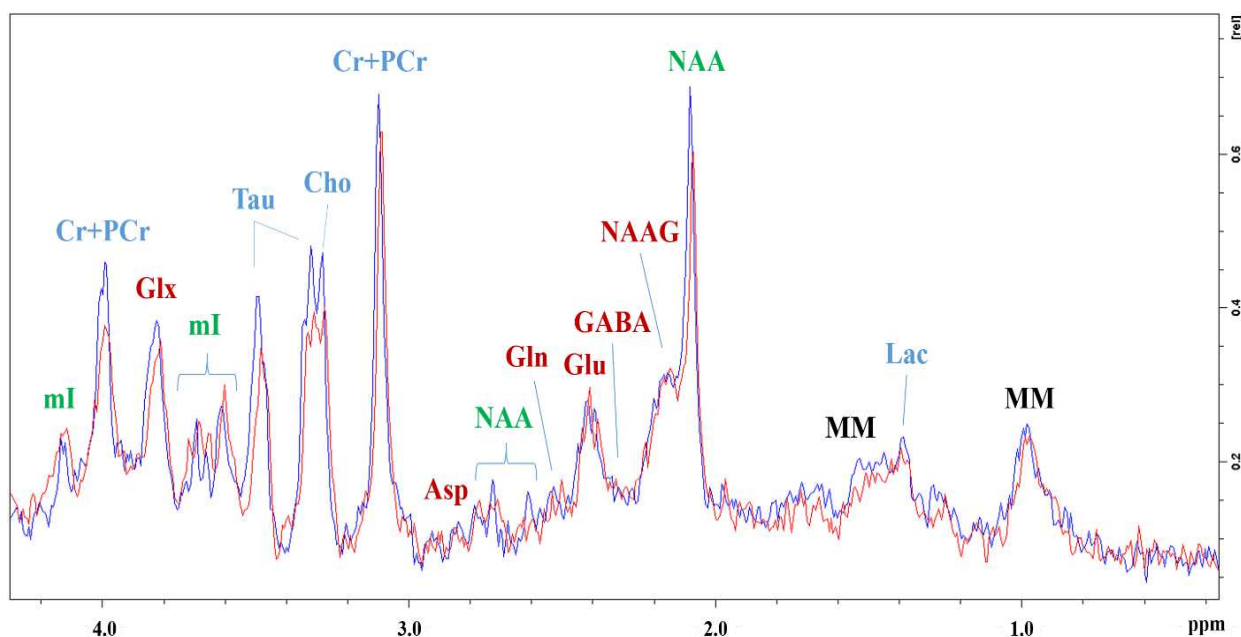


Figure 7.12 : Superposition des spectres ^1H obtenus dans l'hippocampe d'une souris mâle contrôle (bleu) et d'une souris mâle exposée au mélange de BPA dichlorés (rouge). L'attribution des pics est la suivante : macromolécules, MM ; lactate, Lac ; N-acétyl Aspartate, NAA ; N-acétyl aspartyl glutamate, NAAG ; acide γ aminobutyrique, GABA ; glutamate, Glu ; glutamine, Gln ; aspartate, Asp ; créatine, Cr ; phosphocréatine, PCr ; choline, Cho ; taurine, Tau ; myo-Inositol, mI, glutamate + glutamine, Glx.

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

• *Homéostasie cellulaire*

Les métabolites de l'homéostasie cellulaire quantifiés dans cette partie sont : les macromolécules (0,93 ppm), la créatine et la phosphocréatine (Cr+PCr) (3,03 ppm), les composés contenant de la choline (3,20 ppm) et la taurine (3,42 ppm).

Macromolécules : La **figure 7.13** présente les moyennes des macromolécules obtenues dans l'hippocampe des souris mâles et femelles exposées au BPA et à ses dérivés chlorés.

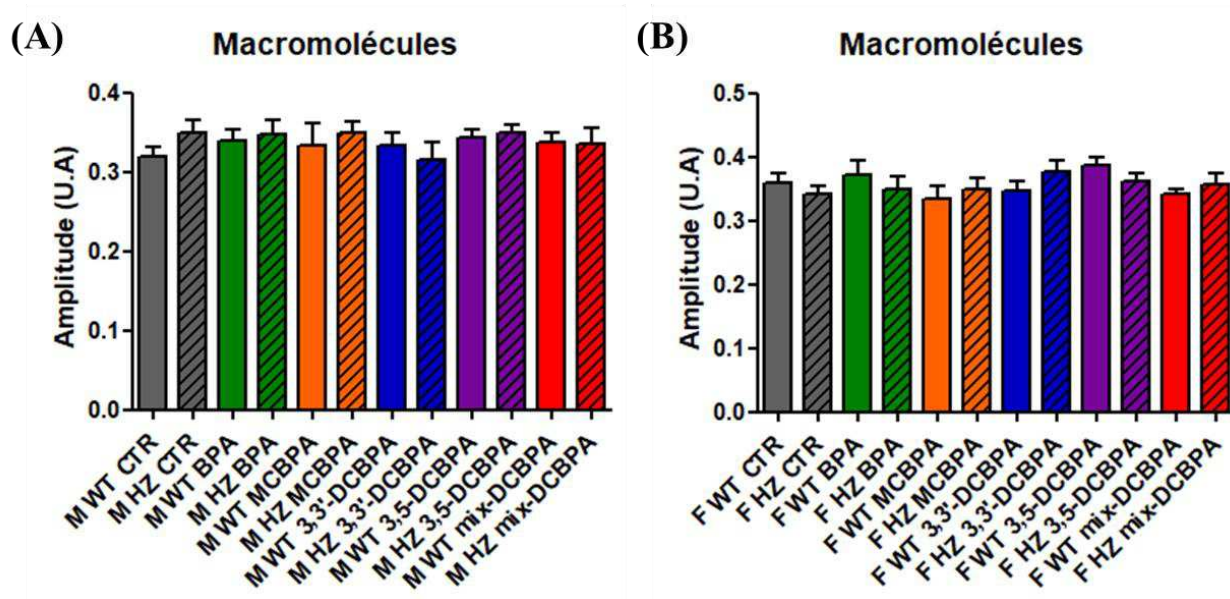


Figure 7.13 : Mesure des macromolécules (0,93 ppm) par ^1H SRM chez les mâles (A) et les femelles (B) exposés pendant la période périnatale au contrôle (CTR), au bisphénol A (BPA) et à ses dérivés chlorés (MCBPA ; 3,5-DCBPA et/ou 3,3'-DCBPA) et en fonction du phénotype (sauvage, WT ; hétérozygote, HZ). Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM.

Aucune variation des macromolécules n'a été observée chez les souris mâles et femelles exposées au BPA ou à ses dérivés chlorés ainsi qu'aucun effet de l'hétérozygotie (**Fig. 7.13**)

Créatine + Phosphocréatine : La **figure 7.14** présente les moyennes de la créatine totale obtenues dans l'hippocampe des souris mâles et femelles exposées au BPA et à ses dérivés chlorés.

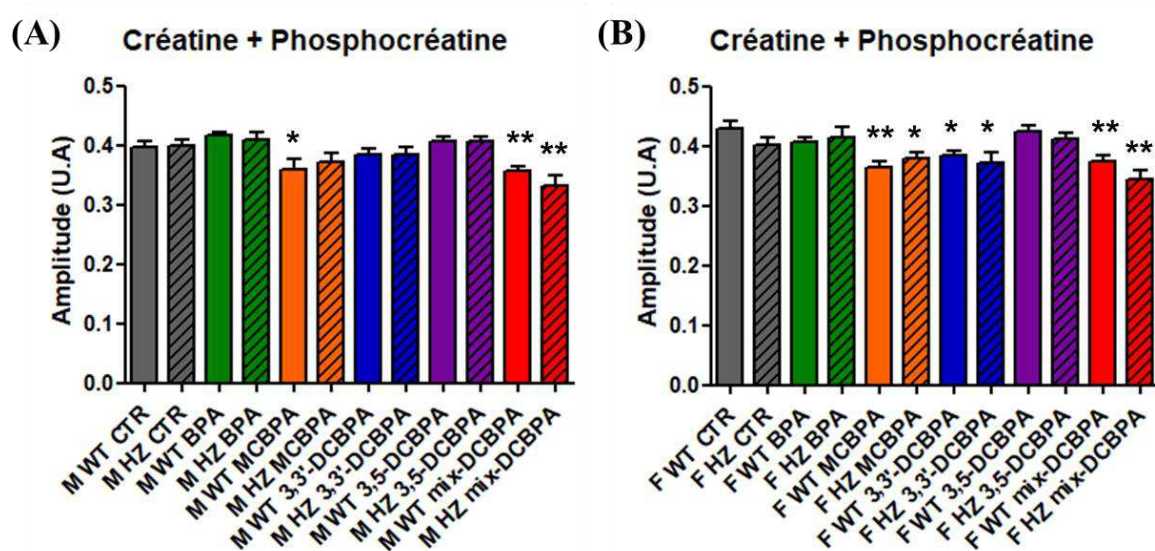


Figure 7.14 : Mesure de la créatine et de la phosphocréatine (3,03 ppm) par ¹H SRM chez les mâles (A) et les femelles (B) exposés pendant la période périnatale au contrôle (CTR), au bisphénol A (BPA) et à ses dérivés chlorés (MCBPA ; 3,5-DCBPA et/ou 3,3'-DCBPA) et en fonction du phénotype (sauvage, WT ; hétérozygote, HZ). Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs M WT CTR.

Aucune variation de la créatine n'est observable chez les souris mâles et femelles (WT et HZ) des traitements BPA et 3,5-DCBPA (**Fig. 7.14A et 7.14B**). En comparaison des souris mâles sauvages contrôles ($0,397 \pm 0,009$), la concentration de créatine diminue significativement chez les mâles sauvages exposés au MCBPA ($-9,8\%$; $0,358 \pm 0,018$) et mix-DCBPA ($-10,3\%$; $0,356 \pm 0,008$). Cette diminution est retrouvée chez les mâles hétérozygotes mix-DCBPA ($-16,5\%$; $0,3316 \pm 0,018$). Il peut être observé une baisse non significative pour les mâles sauvages des traitements 3,3'-DCBPA ($-3,1\%$; $0,385 \pm 0,010$; $p = 0,17$). De même, une diminution non significative est observée chez les souris mâles HZ des traitements MCBPA ($-6,3\%$; $0,372 \pm 0,016$; $p = 0,16$) et 3,3'-DCBPA ($-3,5\%$; $0,383 \pm 0,013$; $p = 0,41$).

Par comparaison aux femelles sauvages contrôles ($0,428 \pm 0,012$), une diminution significative a lieu chez les souris femelles sauvages des traitements MCBPA ($-15,2\%$; $0,363 \pm 0,010$) ; 3,3-DCBPA ($-10,3\%$; $0,384 \pm 0,007$) et mix-DCBPA ($-12,4\%$; $0,375 \pm 0,009$). De manière similaire, une baisse est mesurée chez les souris femelles hétérozygotes exposées aux traitements MCBPA ($-11,2\%$; $0,380 \pm 0,010$) ; 3,3-DCBPA ($-13,5\%$; $0,371 \pm 0,020$) et mix-DCBPA ($-19,4\%$; $0,345 \pm 0,015$).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Choline : La **figure 7.15** présente les moyennes de la choline obtenues dans l'hippocampe des souris mâles et femelles exposées au BPA et à ses dérivés chlorés.

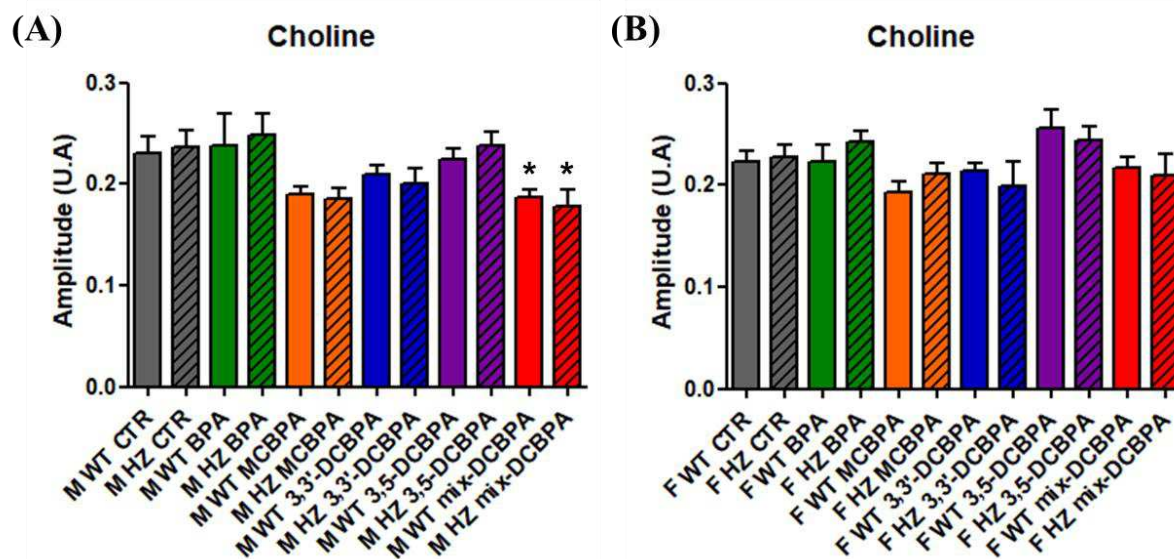


Figure 7.15 : Mesure de la choline (3,20 ppm) par ¹H SRM chez les mâles (A) et les femelles (B) exposés pendant la période périnatale au contrôle (CTR), au bisphénol A (BPA) et à ses dérivés chlorés (MCBPA ; 3,5-DCBPA et/ou 3,3'-DCBPA) et en fonction du phénotype (sauvage, WT ; hétérozygote, HZ). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM. * $p < 0,05$ vs M WT CTR.

Chez les mâles, aucune variation de la choline n'est observable pour les traitements BPA, 3,3'-DCBPA et 3,5-DCBPA (**Fig. 7.15A**). Néanmoins, une diminution significative de la choline est mesurée dans les groupes M WT mix-DCBPA (-19,1% ; $0,0187 \pm 0,008$) et M HZ mix-DCBPA (-23,0% ; $0,0178 \pm 0,017$) comparée aux souris mâles sauvages contrôles ($0,231 \pm 0,016$). Une baisse non significative est observable chez les souris M WT MCBPA (-17,6% ; $0,0190 \pm 0,008$; $p = 0,15$) et M HZ MCBPA (-19,9% ; $0,0185 \pm 0,012$; $p = 0,06$).

Par contre, aucune modification de la choline chez les femelles (WT et HZ) n'a pu être mesurée parmi les traitements comparée aux souris femelles sauvages contrôles ($0,222 \pm 0,011$) (**Fig. 7.15B**).

Taurine : La **figure 7.16** présente les moyennes de la taurine obtenues dans l'hippocampe des souris mâles et femelles exposées au BPA et à ses dérivés chlorés.

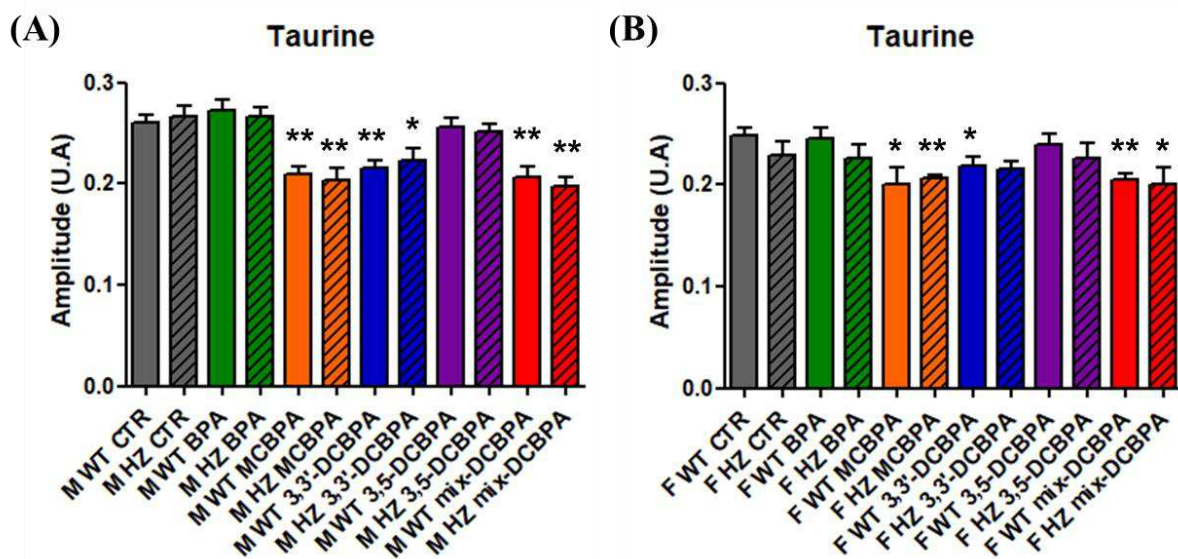


Figure 7.16 : Mesure de la taurine (3,42 ppm) par ¹H SRM chez les mâles (A) et les femelles (B) exposés pendant la période périnatale au contrôle (CTR), au bisphénol A (BPA) et à ses dérivés chlorés (MCBPA ; 3,5-DCBPA et/ou 3,3'-DCBPA) et en fonction du phénotype (sauvage, WT ; hétérozygote, HZ). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs M WT CTR.

Chez les mâles, aucune variation de la taurine n'a été observée pour les traitements BPA et 3,5-DCBPA (**Fig.7.16A**). Par comparaison aux mâles sauvages du groupe contrôle (0,261 ± 0,007), une diminution significative a été mesurée dans les groupes : M WT MCBPA (-19,4% ; 0,210 ± 0,007) et M HZ MCBPA (-22,1% ; 0,203 ± 0,013), M WT 3,3'-DCBPA (-17,6% ; 0,215 ± 0,009) et M HZ 3,3'-DCBPA (-14,6% ; 0,223 ± 0,013), M WT mix-DCBPA (-20,6% ; 0,207 ± 0,010) et M HZ mix-DCBPA (-24,4% ; 0,197 ± 0,009).

Chez les femelles, aucune modification n'est observable pour les traitements BPA et 3,5-DCBPA (**Fig. 7.16B**). De manière similaire aux souris mâles, une baisse a été quantifiée chez les souris F WT MCBPA (-19,5% ; 0,199 ± 0,018) et F HZ MCBPA (-17,0% ; 0,206 ± 0,004), F WT 3,3'-DCBPA (-12,0% ; 0,219 ± 0,009) et F HZ 3,3'-DCBPA (-13,1% ; 0,216 ± 0,008 ; $p = 0,17$), F WT mix-DCBPA (-17,4% ; 0,205 ± 0,006) et F HZ mix-DCBPA (-19,1% ; 0,201 ± 0,017) comparée aux femelles sauvages contrôles (0,248 ± 0,008).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

• Neurotransmetteurs

Les neurotransmetteurs mesurés dans cette partie sont le N-acétyl aspartyl glutamate (NAAG) (2,05 ppm), le glutamate (2,35 ppm) et le pool glutamate+glutamine (Glx) (3,75 ppm)

NAAG : La **figure 7.17** présente les moyennes du NAAG obtenues dans l'hippocampe des souris mâles et femelles exposées au BPA et à ses dérivés chlorés.

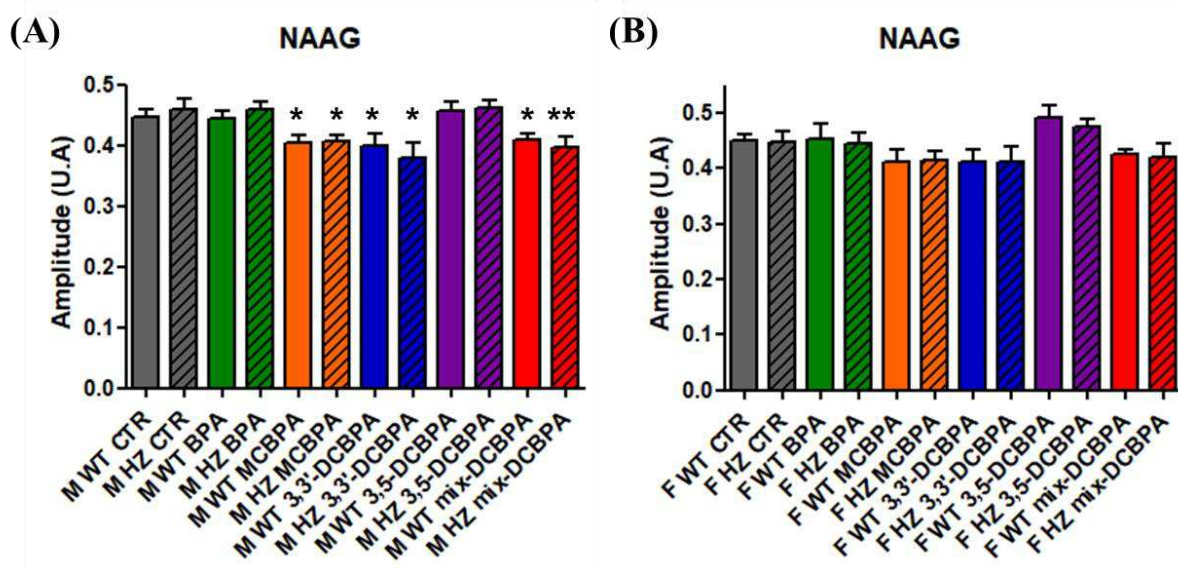


Figure 7.17 : Mesure du N-acétyl aspartyl glutamate (2,05 ppm) par ¹H SRM chez les mâles (A) et les femelles (B) exposés pendant la période périnatale au contrôle (CTR), au bisphénol A (BPA) et à ses dérivés chlorés (MCBPA ; 3,5-DCBPA et/ou 3,3'-DCBPA) et en fonction du phénotype (sauvage, WT ; hétérozygote, HZ). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM. **p*<0,05 ; *p*<0,01 vs M WT CTR.**

Par comparaison aux souris mâles sauvages contrôles (0,448 ± 0,010), aucune variation n'est observable pour les souris mâles WT et HZ exposées aux traitements BPA et 3,5-DCBPA (**Fig. 7.17A**). Une diminution de NAAG a été mesurée dans les groupes : M WT MCBPA (-9,5% ; 0,405 ± 0,013) et M HZ MCBPA (-9,1% ; 0,407 ± 0,011), M WT 3,3'-DCBPA (-10,9% ; 0,399 ± 0,019) et M HZ 3,3'-DCBPA (-15,3% ; 0,379 ± 0,026), M WT mix-DCBPA (-8,5% ; 0,410 ± 0,010) et M HZ mix-DCBPA (-11,4% ; 0,397 ± 0,017).

Contrairement aux souris mâles, aucune différence significative n'a été quantifiée chez les femelles (WT et HZ) exposées au BPA et à ses dérivés chlorés en comparaison avec les femelles sauvages du groupe contrôle (0,4492 ± 0,013) (**Fig. 7.17B**).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Glutamate : La **figure 7.18** présente les moyennes du glutamate obtenues dans l'hippocampe des souris mâles et femelles exposées au BPA et à ses dérivés chlorés.

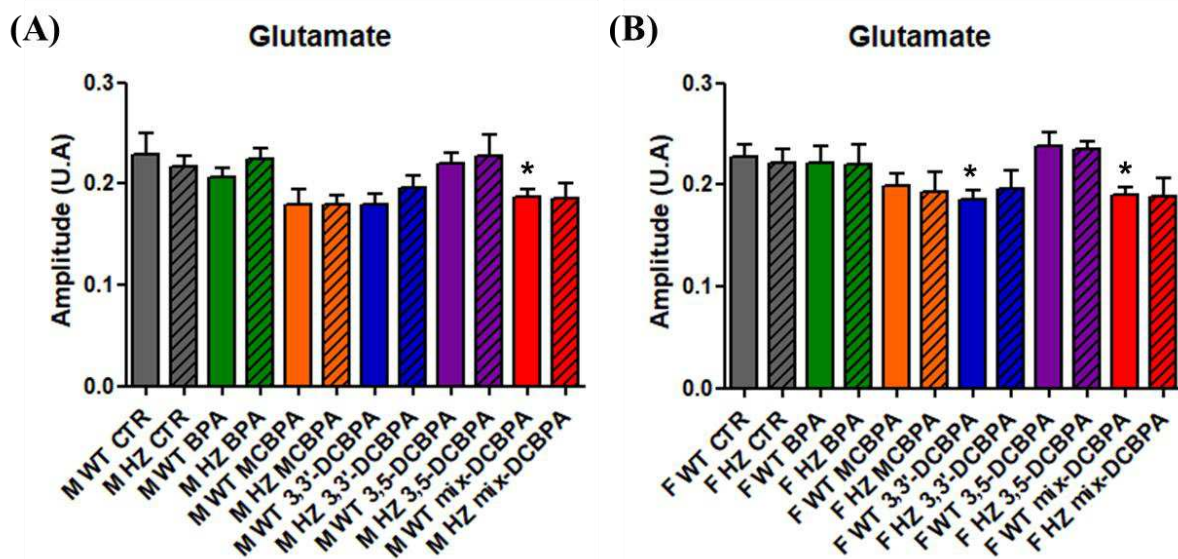


Figure 7.18 : Mesure du glutamate (2,35 ppm) par ¹H SRM chez les mâles (A) et les femelles (B) exposés pendant la période périnatale au contrôle (CTR), au bisphénol A (BPA) et à ses dérivés chlorés (MCBPA ; 3,5-DCBPA et/ou 3,3'-DCBPA) et en fonction du phénotype (sauvage, WT ; hétérozygote, HZ). Les valeurs sont exprimées en moyenne ±ESM. * $p < 0,05$ vs M WT CTR

Chez les mâles, la concentration de glutamate diminue significativement dans le groupe M WT mix-DCBPA (-18,3% ; $0,187 \pm 0,008$) comparé au groupe M WT CTR ($0,229 \pm 0,021$). Une tendance à la diminution est également notable dans les groupes M WT MCBPA (-21,1% ; $0,180 \pm 0,015$; $p = 0,07$), M HZ MCBPA (-21,4% ; $0,180 \pm 0,009$; $p = 0,06$), M WT 3,3'-DCBPA (-21,4% ; $0,180 \pm 0,010$; $p = 0,07$) et M HZ mix-DCBPA (-18,9% ; $0,185 \pm 0,015$; $p = 0,19$) (**Fig. 7.18A**).

En comparaison avec les souris femelles sauvages contrôle ($0,228 \pm 0,012$), une diminution significative du glutamate a été quantifiée pour les groupes F WT 3,3'-DCBPA (-14,3% ; $0,196 \pm 0,018$) et F WT mix-DCBPA (-16,7% ; $0,190 \pm 0,007$) ainsi qu'une baisse non significative dans les groupes F WT MCBPA (-12,9% ; $0,199 \pm 0,012$; $p = 0,14$), F HZ MCBPA (-15,1% ; $0,194 \pm 0,018$; $p = 0,11$) et F HZ mix-DCBPA (-17,4% ; $0,189 \pm 0,019$; $p = 0,07$) (**Fig. 7.18B**).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Glx : La **figure 7.19** présente les moyennes du pool glutamate + glutamine obtenues dans l'hippocampe des souris mâles et femelles exposées au BPA et à ses dérivés chlorés.

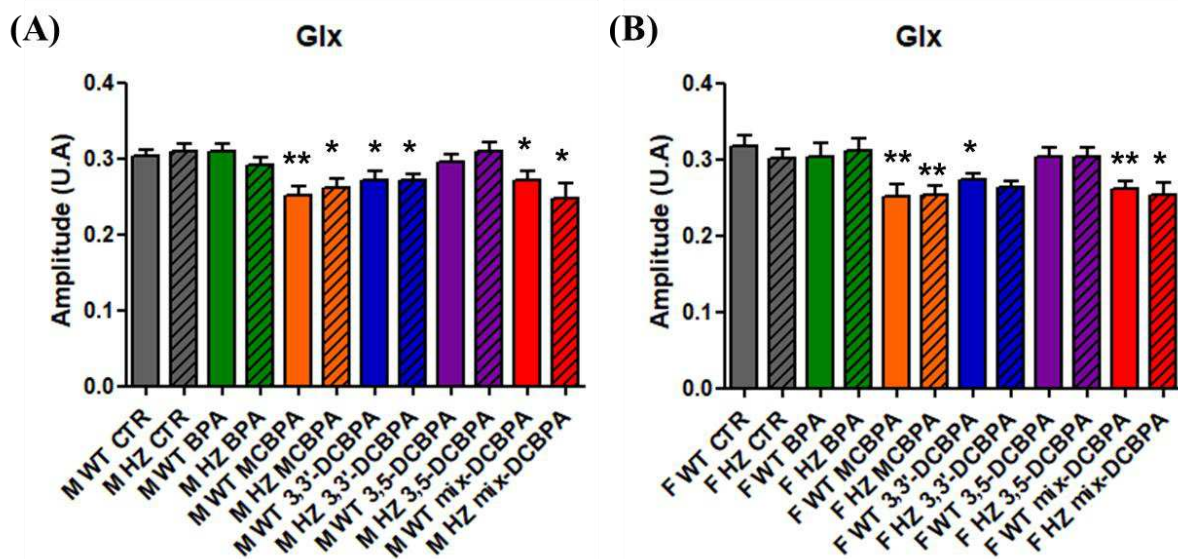


Figure 7.19 : Mesure de glutamate+glutamine (3,75 ppm) par ¹H SRM chez les mâles (A) et les femelles (B) exposés pendant la période périnatale au contrôle (CTR), au bisphénol A (BPA) et à ses dérivés chlorés (MCBPA ; 3,5-DCBPA et/ou 3,3'-DCBPA) et en fonction du phénotype (sauvage, WT ; hétérozygote, HZ). Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs M WT CTR.

Par comparaison aux souris sauvages contrôles ($0,303 \pm 0,009$), une baisse significative a été mesurée pour les groupes M WT MCBPA ($-17,2\%$; $0,251 \pm 0,013$) et M HZ MCBPA ($-14,0\%$; $0,261 \pm 0,013$), M WT 3,3'-DCBPA ($-10,2\%$; $0,272 \pm 0,011$) et M HZ 3,3'-DCBPA ($-10,8\%$; $0,270 \pm 0,009$), M WT mix-DCBPA ($-10,2\%$; $0,272 \pm 0,011$) et M HZ mix-DCBPA ($-18,3\%$; $0,248 \pm 0,021$) (**Fig. 7.19A**).

De manière similaire aux mâles, une diminution a été quantifiée chez les femelles des groupes F WT MCBPA ($-21,0\%$; $0,251 \pm 0,017$) et F HZ MCBPA ($-20,2\%$; $0,253 \pm 0,012$), F WT 3,3'-DCBPA ($-14,1\%$; $0,273 \pm 0,009$) et F HZ 3,3'-DCBPA ($-16,8\%$; $0,264 \pm 0,007$; $p = 0,16$), F WT mix-DCBPA ($-17,5\%$; $0,262 \pm 0,010$) et F HZ mix-DCBPA ($-20,4\%$; $0,253 \pm 0,017$) en comparaison aux souris femelles sauvages contrôles ($0,318 \pm 0,014$) (**Fig. 7.19B**).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

• Compartiments spécifique

Les métabolites spécifiques à un compartiment cellulaire mesurés sont le N-acétyl aspartate (NAA) (2,01 ppm) qui est un marqueur des cellules neuronales et le myo-Inositol (3,61 ppm) qui est un marqueur des cellules gliales.

NAA : La **figure 7.20** présente les moyennes du NAA obtenues dans l'hippocampe des souris mâles et femelles exposées au BPA et à ses dérivés chlorés.

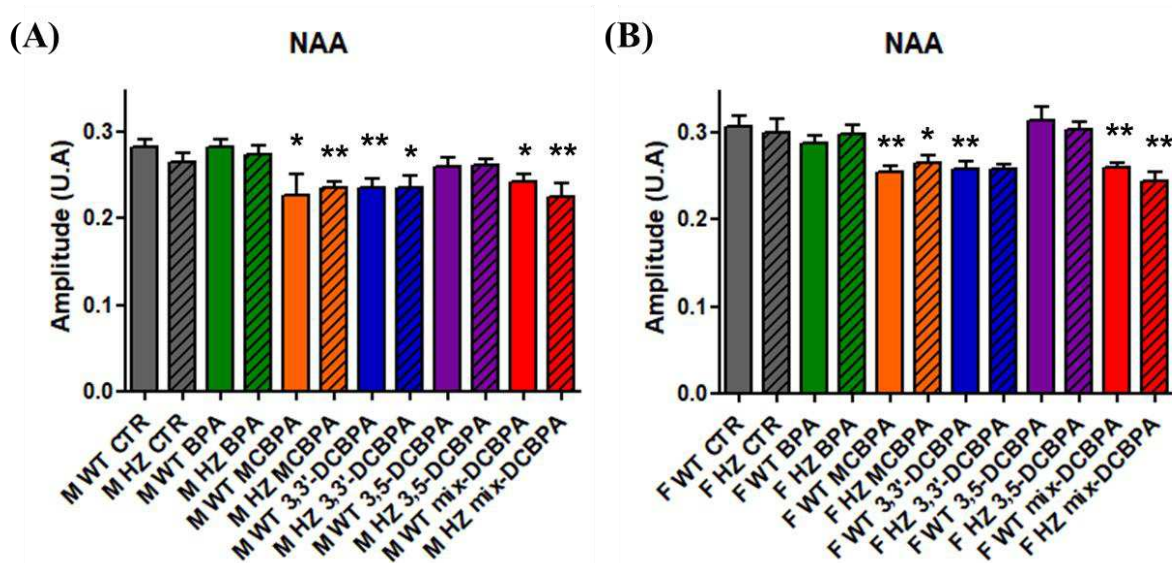


Figure 7.20 : Mesure du N-acétyl aspartate (2,01 ppm) par ¹H SRM chez les mâles (A) et les femelles (B) exposés pendant la période périnatale au contrôle (CTR), au bisphénol A (BPA) et à ses dérivés chlorés (MCBPA ; 3,5-DCBPA et/ou 3,3'-DCBPA) et en fonction du phénotype (sauvage, WT ; hétérozygote, HZ). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM. **p*<0,05 ; *p*<0,01 vs M WT CTR.**

Par comparaison aux souris mâles sauvages contrôles (0,282 ± 0,010), une diminution a été quantifiée dans les groupes M WT MCBPA (-19,4% ; 0,228 ± 0,024) et M HZ MCBPA (-16,9% ; 0,235 ± 0,009), M WT 3,3'-DCBPA (-16,6% ; 0,235 ± 0,010) et M HZ 3,3'-DCBPA (-16,5% ; 0,236 ± 0,015), M WT mix-DCBPA (-14,3% ; 0,242 ± 0,010) et M HZ mix-DCBPA (-20,1% ; 0,226 ± 0,015) (**Fig. 7.20A**).

De manière similaire aux souris mâles, une baisse est observable dans les groupes F WT MCBPA (-17,3% ; 0,255 ± 0,008) et F HZ MCBPA (-13,9% ; 0,265 ± 0,010), F WT 3,3'-DCBPA (-16,0% ; 0,259 ± 0,009) et F HZ 3,3'-DCBPA (-16,0% ; 0,259 ± 0,006 ; *p*=0,07), F WT mix-DCBPA (-15,4% ; 0,260 ± 0,006) et F HZ mix-DCBPA (-20,5% ; 0,245 ± 0,010) par comparaison aux souris F WT CTR (0,308 ± 0,012) (**Fig. 7.20B**).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

myo-Inositol : La **figure 7.21** présente les moyennes du myo-inositol obtenues dans l'hippocampe des souris mâles et femelles exposées au BPA et à ses dérivés chlorés.

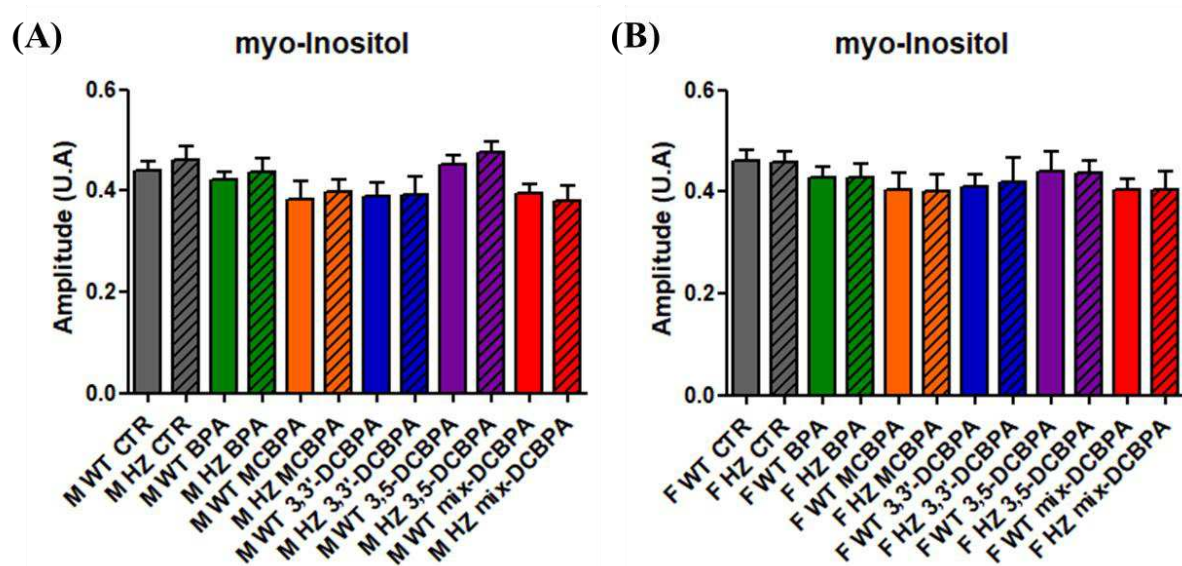


Figure 7.21 : Mesure du myo-Inositol (3,61 ppm) par ¹H SRM chez les mâles (A) et les femelles (B) exposés pendant la période périnatale au contrôle (CTR), au bisphénol A (BPA) et à ses dérivés chlorés (MCBPA ; 3,5-DCBPA et/ou 3,3'-DCBPA) et en fonction du phénotype (sauvage, WT ; hétérozygote, HZ). Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs M WT CTR.

Aucune variation du myo-Inositol n'a été observée chez les mâles et femelles exposés au BPA ou à ses dérivés chlorés ainsi qu'aucun effet de l'hétérozygotie en comparaison aux groupes contrôles (M WT CTR=0,441 $\pm$ 0,016 et F WT CTR=0,460 $\pm$ 0,023) (**Fig. 7.21**).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

7.2.2.3. Conclusion

La ¹H SRM a été précédemment utilisée dans une approche toxicologique pour la détermination de biomarqueurs de l'exposition au chlorure de triméthylétain induisant la neurodégénérescence chez le rat ainsi que dans l'étude des conséquences de l'exposition au plomb pendant l'enfance (Cecil et al. 2010; Baciak et al. 2017).

Dans notre étude, nous avons utilisé cette méthode pour quantifier les variations induites par l'exposition périnatale au BPA et à ses dérivés chlorés au niveau de l'homéostasie cellulaire (créatine+phosphocréatine, choline, taurine), les neurotransmetteurs (NAAG, glutamate et pool glutamate+glutamine) et les métabolites spécifiques à un compartiment (NAA et mI). Les variations significatives des métabolites de l'hippocampe quantifiées par ¹H SRM sont résumées dans le **tableau 7.3** selon le traitement, le phénotype et le sexe.

Tableau 7.3 : Récapitulatif des variations mesurées par ¹H SRM dans l'hippocampe chez les souris mâles (M) et femelles (F), sauvages (WT) ou hétérozygote (HZ) pour la connexine 43 lors d'une exposition périnatale au BPA et à ses dérivés chlorés

Sexe+ Phénotype/ traitement	BPA	MCBPA	3,3'-DCBPA	3,5-DCBPA	mix-DCBPA
M WT	∅	↓Cr+PCr ↓Tau ↓NAAG ↓Glx ↓NAA	↓Cr+PCr ↓Tau ↓NAAG ↓Glx ↓NAA	∅	↓Cr+PCr ↓Cho ↓Tau ↓NAAG ↓Glu ↓Glx ↓NAA
M HZ	∅	↓Cr+PCr ↓Tau ↓Glx ↓NAAG ↓NAA	↓Cr+PCr ↓Tau ↓Glx ↓NAAG ↓NAA	∅	↓Cr+PCr ↓Cho ↓Tau ↓Glx ↓NAAG ↓NAA
F WT	∅	↓Cr+PCr ↓Tau ↓Glx ↓NAA	↓Cr+PCr ↓Tau ↓Glu ↓Glx ↓NAA	∅	↓Cr+PCr ↓Tau ↓Glu ↓Glx ↓NAA
F HZ	∅	↓Cr+PCr ↓Tau ↓Glx ↓NAA	↓Cr+PCr ↓Tau ↓Glx ↓NAA	∅	↓Cr+PCr ↓Tau ↓Glx ↓NAA

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

En comparaison aux souris contrôles mâles et femelles sauvages, l'étude du métabolisme hippocampique a mis en évidence des variations chez les souris sauvages exposées pendant la période périnatale aux traitements MCBPA, 3,3'-DCBPA et mix-DCBPA alors qu'aucune variation n'est observée pour les traitements BPA et 3,5-DCBPA. Comme pour nos résultats obtenus par imagerie des tenseurs de diffusion, nous observons une différence entre les deux dérivés dichlorés. Cela met en évidence que le dérivé 3,3'-DCBPA possède un potentiel neurotoxique plus important que le dérivé 3,5-DCBPA. De plus, les effets observés avec le mélange de dichlorés (10 µg/kg/jour de 3,3'-DCBPA et 10 µg/kg/jour de 3,5-DCBPA) pourrait être lié à un effet de 3,3'-DCBPA à faible dose.

L'exposition périnatale au MCBPA et 3,3'-DCBPA chez les souris mâles et femelles a induit une diminution des métabolites impliqués dans l'homéostasie cellulaire (créatine+phosphocréatine, taurine), du neurotransmetteur excitateur glutamate et de ses précurseurs (glutamine et NAAG). Il a été observé une baisse du NAA qui est le marqueur du compartiment neuronal, cela pourrait indiquer que les perturbations observées ont lieu principalement au niveau des neurones. Néanmoins, les astrocytes pourraient être également impactés compte tenu que la glutamine est synthétisée dans les astrocytes à partir du glutamate.

Une différence est notable dans la baisse de la choline chez les souris mâles exposées au mélange de BPA dichlorés. Comme pour les variations observées par imagerie des tenseurs de diffusion, les effets sont plus prononcés chez les souris mâles que les souris femelles exposées au mélange de dichlorés.

Le métabolisme hippocampique ne semble pas affecté par le phénotype hétérozygote pour la connexine 43 compte tenu de la similarité de leurs profils métaboliques avec les souris contrôles sauvages. Il est néanmoins possible que l'effet des traitements est prépondérant et il ne permet pas de détecter des modifications subtiles induites par le phénotype hétérozygote.

7.2.3. Etude par diffusion spectroscopique des effets du BPA dichlorés et du phénotype hétérozygote pour la connexine 43

Les résultats obtenus par ^1H SRM et par imagerie des tenseurs de diffusion indiquent des effets plus prononcés chez les souris mâles exposées au mélange de dérivés dichlorés au BPA. Nous avons décidé d'explorer les possibles anomalies de l'intégrité intracellulaire induit par le mélange de dérivés dichlorés dans l'hippocampe des souris mâles à l'aide de la méthode de diffusion spectroscopique. Certains métabolites au niveau cérébral sont considérés comme des biomarqueurs spécifiques d'un compartiment cellulaire et la DWS a donc le potentiel d'apporter des informations biologiques pertinentes sur ces compartiments.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, une séquence DWS-PRESS a été développée par Didier Wecker (Bruker, Ettlingen, Allemagne) (**Fig. 7.22**). Une paire de gradients de diffusion unipolaire a été incorporée autour du second pulse RF 180° de la séquence PRESS (Cf. 2.4.2.1., p.56). Les gradients de diffusion sont caractérisés par leur amplitude (G), leur durée (δ) et le délai entre des gradients de diffusion (Δ), cela permet ainsi d'ajuster l'intensité de la valeur de diffusion b . Le signal est enregistré lors du second écho au temps d'écho ($\text{TE}=\text{TE}_1+\text{TE}_2$) et la séquence est répétée au temps de répétition (TR) pour accumuler du signal (**Fig.7.22**).

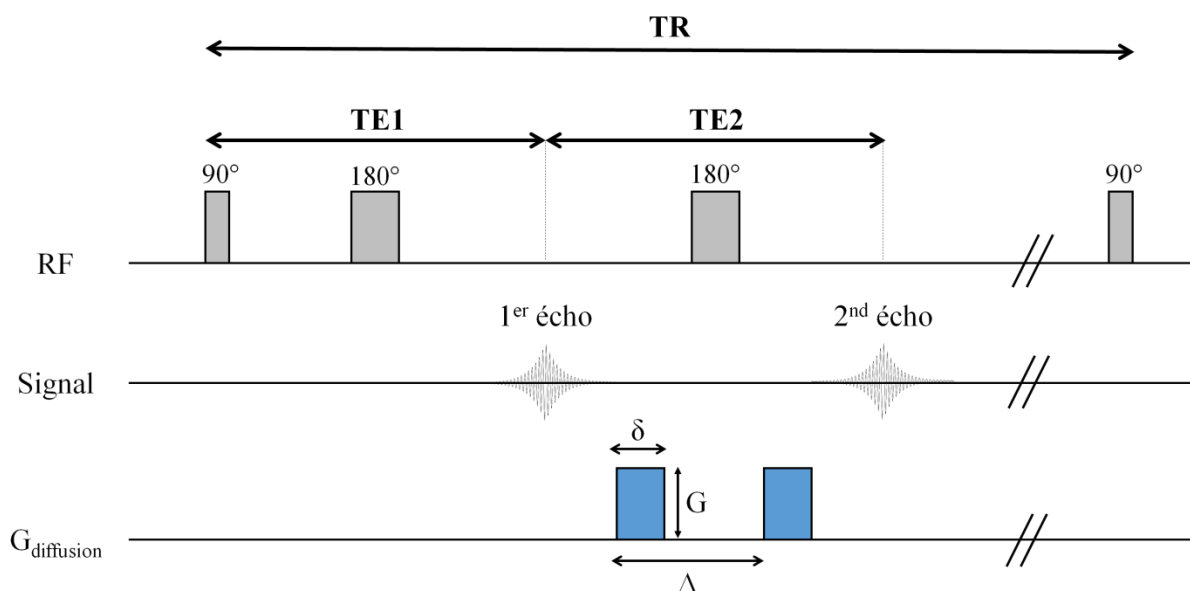


Figure 7.22 : Séquence de diffusion spectroscopique

Dans cette partie, les tests *in vitro* de l'optimisation de cette séquence ainsi que des résultats de la validation *in vivo* chez la souris sont présentés.

7.2.3.1. Optimisation *in vitro*

Les expériences préliminaires de la séquence de diffusion spectroscopique DWS-PRESS ont été effectuées sur un fantôme de gel d'agarose 1% contenant de la choline et du NAA à une concentration de 15 mM. Les tests ont consisté aux variations successives des paramètres de la séquence DWS-PRESS : le temps d'écho (TE) et le temps de répétition (TR), la durée des gradients de diffusion (δ) et le délai entre les gradients de diffusion (Δ). Les valeurs de b sont : 0, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 et 6000 s/mm^2 . Ces tests ont été réalisés dans la direction x compte tenu que le tube de gel d'agarose est un milieu isotrope avec un voxel de $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$.

• Test du TE

Les paramètres δ/Δ ont été fixés à 12 ms/22 ms afin que la puissance des gradients soit à 50% pour la valeur de b à 6000 s/mm^2 . Sur la **figure 7.23**, il est observé une diminution de l'intensité des pics de choline et de NAA en fonction des valeurs de b croissantes. Cela met en évidence que la séquence PRESS a été sensibilisée aux gradients de diffusion incorporés.

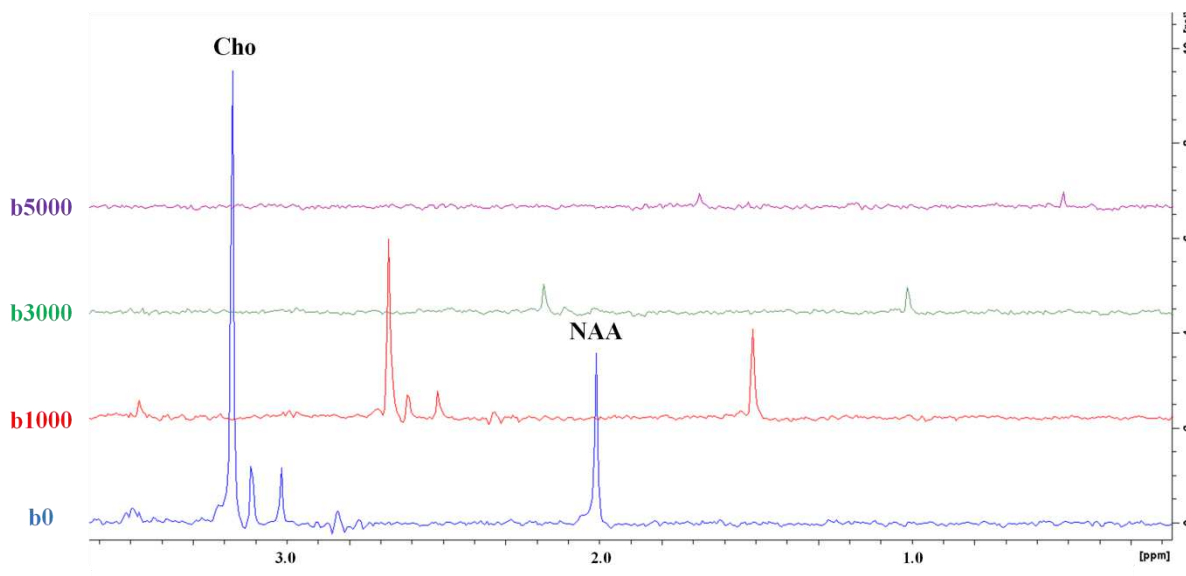


Figure 7.23 : Spectres ^1H *in vitro* d'un fantôme de Choline (Cho) et N-acétyl aspartate (NAA) obtenus à l'aide de la séquence DWS-PRESS pour les valeurs de b à 0, 1000, 3000 et 5000 s/mm^2 (direction x ; TE=75 ms ; TR=2500 ms ; δ/Δ =12 ms/22 ms)

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Pour un TR à 2500ms, les valeurs testées pour le TE sont 75 ms ; 100 ms ; 125 ms ; 150 ms ; 175 ms. Les valeurs des ADC dans la direction x pour le NAA et la choline sont présentées dans la **figure 7.24**.

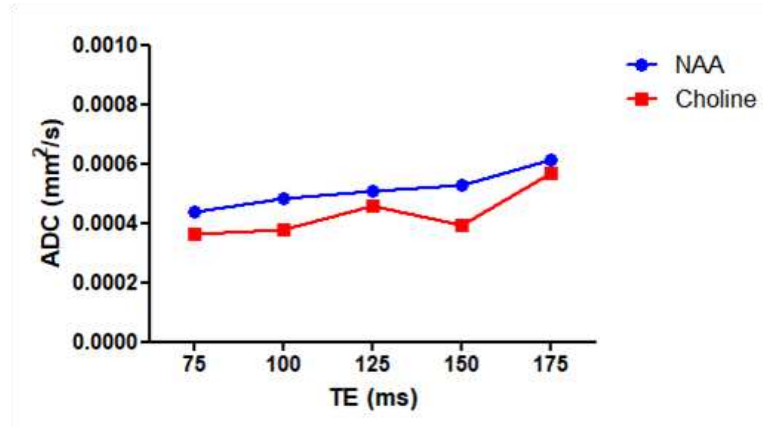


Figure 7.24 : ADC dans la direction x de la choline et du NAA en fonction d'une gamme croissante de temps d'écho (TE)

Dans la gamme de TE étudiée, les valeurs des ADC dans la direction x pour la choline et le NAA ne varient pas. Par conséquent, la gamme de TE de 75 à 175 ms est applicable aux expériences *in vivo*.

- **Test du TR**

Les paramètres δ/Δ ont été fixés à 12 ms/22 ms afin que la puissance des gradients soit à 50% pour la valeur de b à 6000 s/mm². Pour un TE à 75 ms, les valeurs testées pour le TR sont 1500 ms ; 2000 ms ; 2500 ms ; 3000 ms ; 3500 ms. Les valeurs des ADC dans la direction x pour le NAA et la choline sont présentées dans la **figure 7.25**.

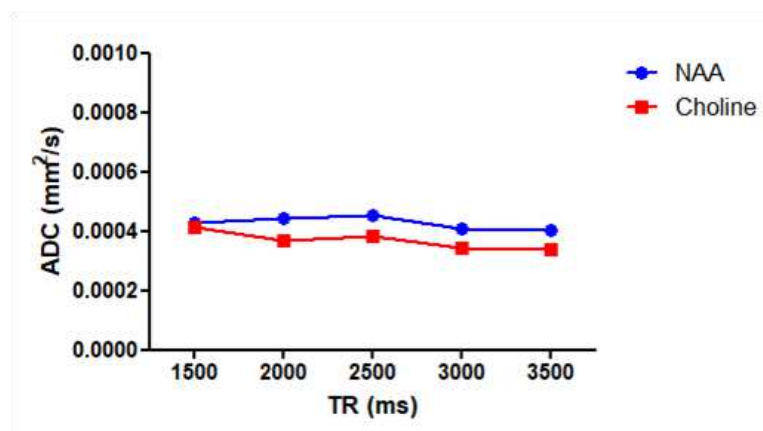


Figure 7.25 : ADC dans la direction x de la choline et du NAA en fonction d'une gamme croissante de temps de répétition (TR)

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Dans la gamme de TR étudiée, les valeurs des ADC dans la direction x pour la choline et le NAA ne montrent aucun changement. Par conséquent, cette gamme de TR de 1500 à 3500 ms est utilisable dans le cadre des expériences *in vivo*.

- **Test de la durée des gradients de diffusion δ**

Les paramètres de TE/TR (75 ms/2500 ms) ont été fixés. Avec un délai Δ de 22 ms, les valeurs testées pour δ sont 8 ms ; 10 ms ; 12 ms ; 14 ms ; 16 ms. Les valeurs des ADC dans la direction x pour le NAA et la choline sont présentées dans la **figure 7.26**.

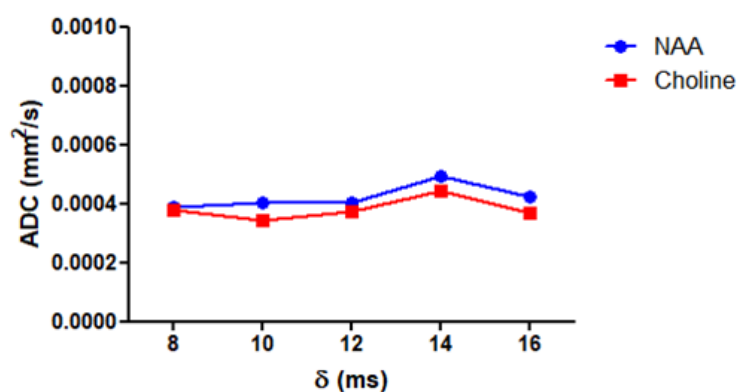


Figure 7.26 : ADC dans la direction x de la choline et du NAA en fonction d'une gamme croissante de durées des gradients de diffusion (δ)

Dans la gamme de δ étudiée, les valeurs des ADC dans la direction x pour la choline et le NAA ne montrent aucune variation. Par conséquent, cette gamme de δ de 8 à 16 ms est adéquate aux expériences *in vivo*.

- **Test du délai entre les gradients de diffusion Δ**

Les paramètres de TE/TR (75 ms/2500 ms) ont été fixés. Avec une durée δ de 12 ms, les valeurs testées pour Δ sont : 18 ms ; 20 ms ; 22 ms ; 24 ms ; 26 ms. Les valeurs des ADC dans la direction x pour le NAA et la choline sont présentées dans la **figure 7.27**.

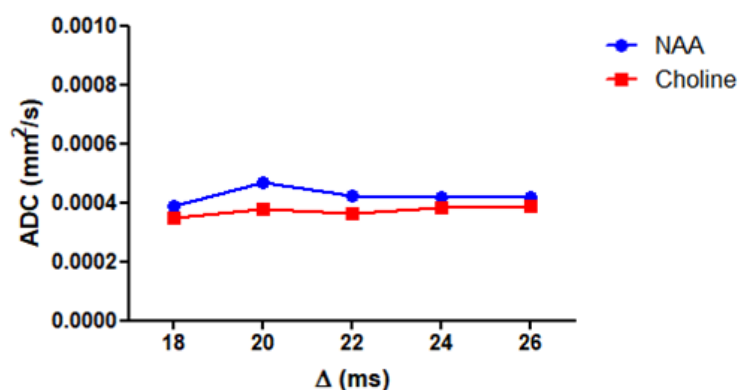


Figure 7.27 : ADC dans la direction x de la choline et du NAA en fonction d'une gamme croissante de délais entre les gradients de diffusion (Δ)

Dans la gamme de Δ étudiée, les valeurs des ADC dans la direction x pour la choline et le NAA sont stables. Par conséquent, cette gamme de Δ de 18 à 26 ms convient aux expériences *in vivo*.

- **Calcul ADC moyen**

Les tests *in vitro* réalisés dans la direction x ont mis en évidence que la séquence DWS-PRESS est pondérée par la paire de gradients de diffusion unipolaires incorporée. Dans les gammes de TE, TR, δ et Δ étudiées, l'ADC calculé dans la direction x est stable. Cela montre que la séquence est robuste pour l'optimisation des expériences *in vivo*.

A partir de ces expériences, les paramètres retenus dans la direction x sont : TE=75 ms ; TR=3000 ms ; $\delta/\Delta=14$ ms/20 ms. Le TE de plus courte durée (75 ms) a été sélectionné afin d'éviter le bruit induit par les courants de Foucault apparaissant à des valeurs de TE plus élevées. Néanmoins, le TE nécessite d'être suffisamment long pour l'application des gradients de diffusion. Le TR de 3000 ms a été choisi pour assurer une relaxation suffisante des protons avec un temps d'acquisition acceptable pour accumuler du signal lors des expériences *in vivo*.

Dans la **figure 7.28**, il est présenté le calcul de l'ADC dans les directions x, y et z a été effectué sur le tube de NAA et choline (15 mM) afin de s'assurer de la validité des paramètres retenus dans les trois directions orthogonales et pour valider le calcul de l'ADC moyen.

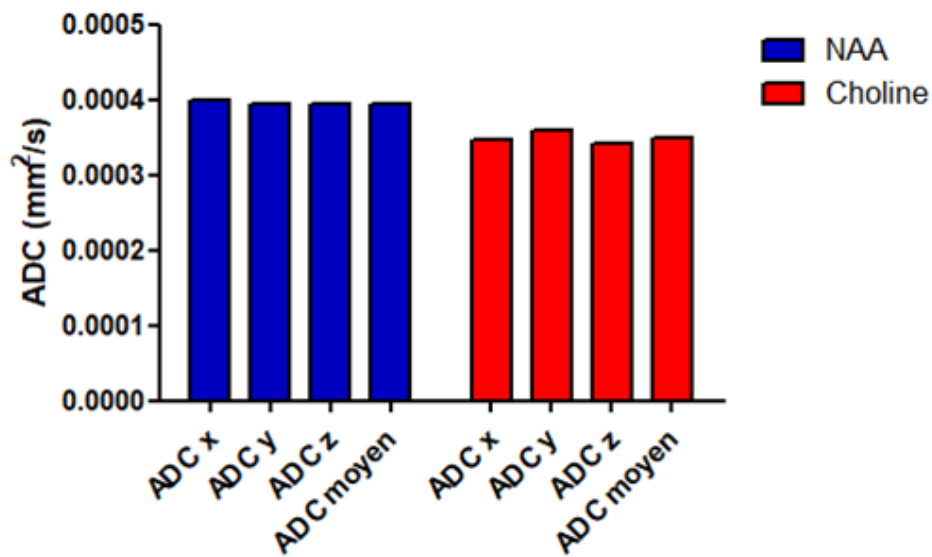


Figure 7.28 : ADC dans les directions x, y et z et ADC moyen du NAA et de la choline obtenues à l'aide de la séquence DWS-PRESS pour les valeurs de b à 0 à 6000 s/mm^2 (direction x ; TE=75 ms ; TR=3000 ms ; $\delta/\Delta=14$ ms/20 ms)

Le fantôme étant un tube de gel d'agarose contenant les métabolites d'intérêts, les valeurs d'ADC de NAA et choline similaires dans les trois directions confirment que c'est un milieu isotrope. Les paramètres retenus vont être utilisés pour les expériences *in vivo*

7.2.3.2. Validation *in vivo* de la diffusion spectroscopique

Après l'optimisation des paramètres *in vitro* (TE/TR ; δ/Δ), la gamme des valeurs de b (0, 1500, 3000, 4500 et 6000 s/mm²) a été testée *in vivo* dans trois directions orthogonales (x, y, z). Les coefficients de diffusion (ADC) du NAA total (tNAA), choline total (tCho) et créatine total (tCr) ont été mesurés dans l'hippocampe de souris sauvages et hétérozygotes pour la connexine 43 qui ont été exposées lors de la période périnatale au mélange de BPA dichloré et en fonction de l'hétérozygotie pour la connexine 43 compte tenu des modifications microstructurale et métaboliques mesurées par l'imagerie des tenseurs de diffusion et ¹H SRM.

Dans la **figure 7.29**, il est présenté les spectres ¹H obtenus par diffusion spectroscopique aux valeurs de b entre 0 et 6000 s/mm² chez une souris mâle témoin.

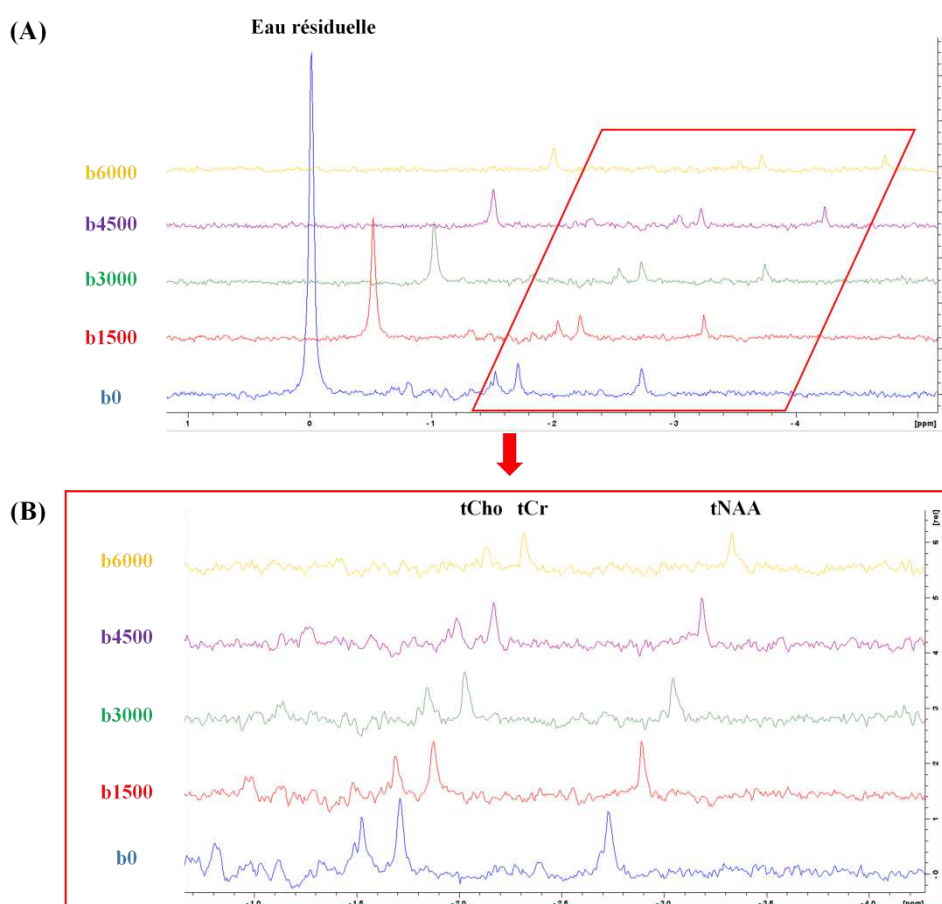


Figure 7.29 : (A) Spectres ¹H *in vivo* de l'hippocampe chez une souris mâle sauvage contrôle obtenus à l'aide de la séquence DWS-PRESS pour les valeurs de b à 0, 1500, 3000, 4500 et 6000 s/mm² (direction x ; TE=75 ms ; TR=3000 ms ; δ/Δ =14 ms/20 ms) ; (B) Agrandissement de (A).

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Sur la **figure 7.29**, il est observé *in vivo* une diminution du signal du pic d'eau résiduelle ainsi que des pics de tCho, tCr et tNAA en fonction des valeurs de b croissantes dans la direction x. Cela met en évidence que la séquence PRESS est sensibilisée aux gradients de diffusion incorporés et qu'elle est applicable chez la souris avec un voxel de 8 mm³.

Les graphes des amplitudes des pics en fonction des valeurs de b ont été tracés pour chaque métabolite dans chaque direction (Fig. 7.30).

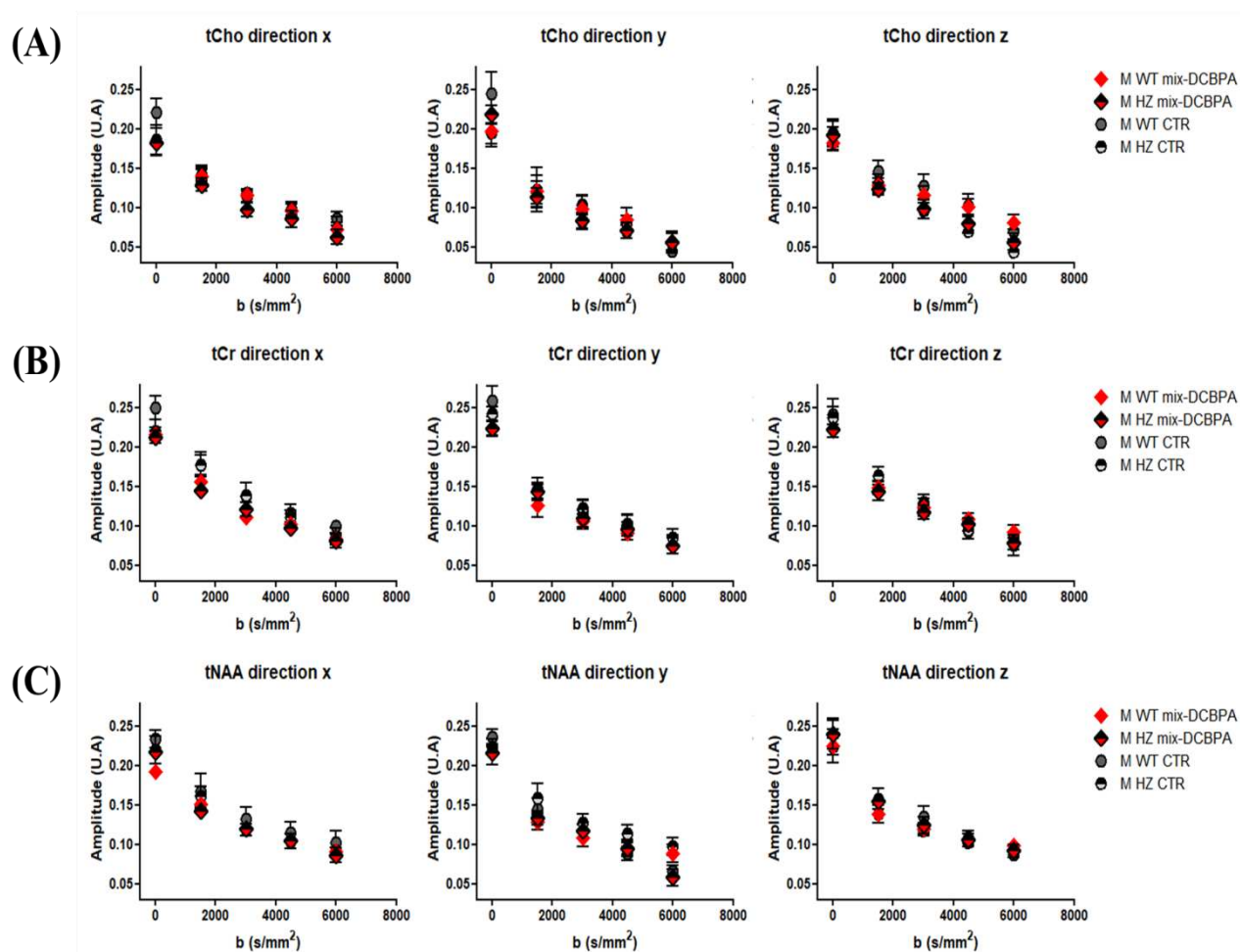


Figure 7.30 : Amplitude de la choline totale (A), la créatine totale (B) et du NAA total (C) en fonction des valeurs de b dans les directions x, y et z chez les souris sauvages (WT) ou hétérozygotes (HZ) exposées pendant la période périnatale aux traitements contrôles (CTR) ou mix-DCBPA (n=6/groupe). Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM.

En accord avec les observations qualitatives (**Fig. 7.29**), une diminution du signal des pics en fonction des valeurs de b (0, 1500, 3000, 4500 et 6000 s/mm²) a été mesurée pour le tCho, tCr et tNAA dans les directions x, y et z.

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

La valeur du coefficient de diffusion (ADC) est déterminée par régression linéaire en traçant le logarithme de l'atténuation du signal S/S_0 en fonction des valeurs de b (Cf. 2.4.2.2., p.59). La **figure 7.31** présente les ADC obtenus dans chaque direction ainsi que l'ADC moyen.

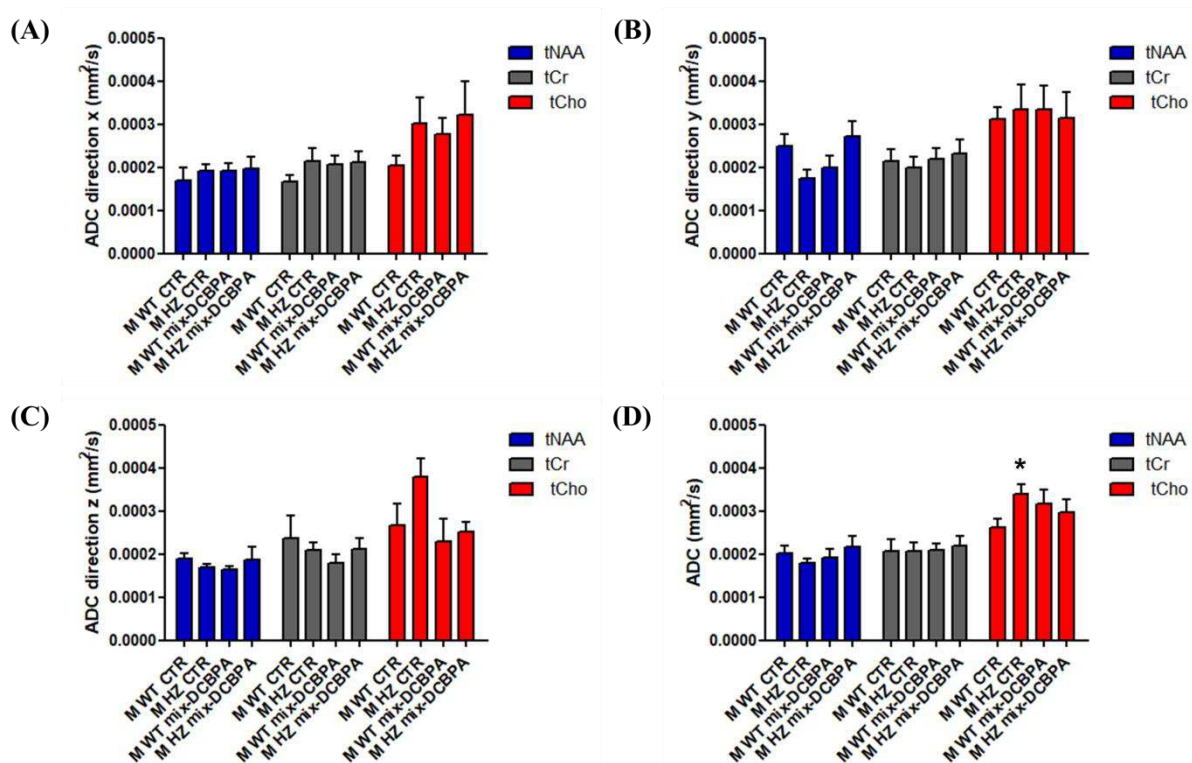


Figure 7.31 : Coefficient de diffusion apparent (ADC) du NAA total, de la choline totale et de la créatine totale dans les directions x (A), y (B), z (C) et l'ADC moyen (D) chez les souris sauvages (WT) ou hétérozygotes (HZ) exposées pendant la période périnatale aux traitements contrôles (CTR) ou mix-DCBPA. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ESM et $*p < 0,05$.

En comparaison aux souris sauvages contrôles, aucune variation de l'ADC moyen n'est observée pour le NAA total et la créatine totale. Il est néanmoins observé une hausse significative de l'ADC moyen de la choline total pour les souris mâles hétérozygote contrôle ($+29,8\%$; $3,389 \cdot 10^{-4} \pm 2,280 \cdot 10^{-5}$ vs M WT CTR = $2,611 \cdot 10^{-4} \pm 2,166 \cdot 10^{-5}$) ainsi qu'une hausse dans les groupes M WT mix-DCBPA ($+21,5\%$; $3,172 \cdot 10^{-4} \pm 3,284 \cdot 10^{-5}$) et M HZ mix-DCBPA ($+13,4\%$; $2,960 \cdot 10^{-4} \pm 2,999 \cdot 10^{-5}$). Cela semble être lié à l'augmentation non significative de la choline dans les directions x et z.

7.2.3.3. Conclusion

Les tests *in vitro* ont montré que la séquence DWS-PRESS est pondérée par la paire de gradients de diffusion unipolaires incorporée et qu'elle est stable dans les gammes de TE (75 – 175 ms), TR (1500 – 3500 ms), la durée de diffusion δ (8 – 16 ms) et du délai entre les gradients de diffusion Δ (18 – 26 ms) compatibles aux expériences *in vivo*. Nous avons décidé de mesurer les variations de la diffusion des métabolites induit par le mélange de dérivés dichlorés dans l'hippocampe des souris mâles compte tenu des modifications mesurées précédemment par imagerie des tenseurs de diffusion et par ^1H SRM.

Nous n'avons pas observé de variation de l'ADC moyen du NAA et la créatine totale parmi nos groupes. Par contre, une hausse significative de la diffusion de la choline totale a été mesurée chez les souris contrôles hétérozygotes pour la connexine 43 en comparaison des souris sauvages. Les composés contenant de la choline sont deux à trois fois plus concentrés dans les astrocytes (Ronen and Valette 2015). Cela pourrait être une indication que des perturbations sont induites principalement au niveau des astrocytes des souris hétérozygotes pour la connexine 43.

Nous avons également quantifié une élévation de la choline non significative chez les souris sauvages et hétérozygotes pour la connexine 43 exposées au mélange de BPA dichlorés (10 $\mu\text{g/kg/jour}$ de 3,3'-DCBPA et 10 $\mu\text{g/kg/jour}$ de 3,5-DCBPA). Nous faisons l'hypothèse que cette hausse de la diffusion pourrait être à l'origine de la baisse de choline quantifiée par ^1H SRM dans ces groupes. En effet, compte tenu de la hausse de la diffusion de la choline, cela pourrait engendrer une baisse locale dans l'hippocampe.

Néanmoins, cette variation de la diffusion de la choline totale n'est pas significative dans les groupes mix-DCBPA. Cela pourrait être lié à la qualité spectrale diminuée lorsque les valeurs de b augmentent. En effet, le pic de choline est au niveau du bruit pour la valeur de $b=6000$ s/mm^2 . Comme les gradients de diffusion incorporés dans la DWS-PRESS sont d'intensités importantes, les données obtenues présentent un faible ratio signal sur bruit et ils sont sensibles aux courants de Foucault ainsi qu'aux artéfacts de mouvement. Cela a pour conséquence un élargissement des pics lorsque les valeurs de b augmentent.

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Il apparaît donc nécessaire de poursuivre le travail d'optimisation de la séquence DWS-PRESS pour quantifier les pics de faibles amplitudes. Des perspectives possibles à ce travail sont : (i) l'augmentation du nombre d'accumulations (400 au lieu de 200) pour moins de valeur de b afin de maintenir un temps d'acquisition adéquat pour les expériences *in vivo* ; (ii) l'ajout de deux paires de gradients de diffusion dans la séquence permettrait de diminuer leurs durées d'application et ainsi d'atténuer les courants de Foucault.

7.3. Discussion et perspectives

Le but de notre étude était de caractériser les effets cérébraux du BPA et de ses dérivés chlorés chez des souris exposées pendant la période périnatale à faible dose (20 µg/kg/jour). Pour cela, des méthodes complémentaires de résonance magnétique ont été utilisées sur les mêmes souris pour évaluer : (i) la microstructure du striatum, du cortex et de l'hippocampe par imagerie des tenseurs de diffusion et (ii) le profil métabolique hippocampique par la ¹H SRM non invasive.

Dans ces travaux de thèse, il a été montré qu'une exposition périnatale au BPA non conjugué à une faible dose (20 µg/kg/jour ; inférieure à la dose journalière tolérable réglementaire de 50 µg/kg/jour) ne modifie pas la microarchitecture hippocampique chez la descendance âgée de 5 semaines. L'absence de perturbations par le BPA au niveau de la microstructure cérébrale dans notre étude est en désaccord avec la littérature. En effet, il a été rapporté que l'exposition prénatale au BPA (400 µg/kg/jour) modifiait la morphologie neuronale (longueur et branchement du nombre de dendrites) au niveau de l'hippocampe chez les jeunes souris âgées de 3 semaines (Kimura et al. 2016). Néanmoins, des disparités existent dans la littérature sur l'impact du BPA sur la morphologie neuronale. En effet, une augmentation des épines dendritiques au niveau du cortex cérébral et de l'hippocampe a été rapportée lors d'une exposition périnatale chez des rongeurs au BPA (≤50 µg/kg/jour) (Kumar and Thakur 2014; Kelly, Opanashuk, and Majewska 2014). Il pourrait être intéressant d'effectuer l'analyse de texture des images pondérées en T2 et une analyse histologique des souris exposées au BPA afin d'obtenir une information sur les éventuelles modifications au niveau macroscopique et de les comparer à nos observations microstructurales par imagerie des tenseurs de diffusion.

A la même faible dose que le composé parent BPA, nous avons observé que l'exposition périnatale aux dérivés monochlorés et dichlorés du BPA induit des altérations microstructurales significatives au niveau de l'hippocampe chez les souris. Il a été mis en évidence que l'augmentation de la fraction d'anisotropie par les traitements MCBPA, 3,3'-DCBPA et mix-DCBPA dans l'hippocampe des souris sauvages est similaire chez les mâles et les femelles. De plus, la hausse de la fraction d'anisotropie s'accompagne d'une baisse de la diffusivité moyenne chez les souris mâles exposées au mélange de dérivés dichlorés alors qu'elle n'est pas notable chez les souris femelles. Cela pourrait indiquer que les effets sont plus prononcés chez les souris mâles que les souris femelles exposées au mélange de dichlorés.

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

L'élévation de la fraction d'anisotropie peut être le résultat d'une restriction ou d'une facilitation des diffusivités radiale et/ou axiale. D'une part, la diffusivité radiale (correspondant à la somme des valeurs propres 2 et 3) est perpendiculaire aux axones et elle reflète la myélinisation dans la substance blanche. D'autre part, la diffusivité axiale (correspondant à la valeur propre 1) est parallèle aux axones et elle décrit l'organisation axonale (Alexander et al. 2007). En perspective de ce travail, il serait intéressant d'effectuer les mesures de FA radiale et FA axiale afin de caractériser plus précisément les modifications induites par les dérivés monochlorés et dichlorés du BPA.

L'étude du métabolisme hippocampique chez les souris exposées pendant la période périnatale met en évidence l'impact des traitements MCBPA, 3,3'-DCBPA et mix-DCBPA alors qu'aucune variation n'est observée pour les traitements BPA et 3,5-DCBPA. Dans la littérature, une dichotomie apparaît sur la variation de la concentration de glutamate lors d'une exposition périnatale au BPA. Une diminution du glutamate et du GABA a été rapportée dans le cadre d'une étude de métabolomique réalisée sur des extraits de cerveaux entiers de souris exposées lors de la période périnatale au BPA (25 µg/kg/ jour) (Cabaton et al. 2013). Par opposition, une augmentation du glutamate a été observée chez des souris exposées à une plus forte dose (70 µg/kg/jour) (N. Kunz et al. 2011). L'étude de Franssen et al. (2016) a mis en évidence que des effets opposés pouvaient être observés dans la régulation des gènes impliqués dans la neurotransmission GABAergique selon la dose d'exposition : surexpression à 25 ng/kg/jour et sous-expression à 5 mg/kg/jour.

Les données ¹H SRM obtenues chez les souris mâles et femelles exposées au MCBPA, 3,3'-DCBPA et mix-DCBPA mettent en évidence de manière inédite une diminution des métabolites impliqués dans l'homéostasie cellulaire (créatine, phosphocréatine et taurine) ainsi qu'une baisse du glutamate (neurotransmetteur excitateur) et de ses précurseurs (NAAG et glutamine). Compte tenu de la baisse de NAA (marqueur du compartiment neuronale) et de l'absence de variation pour le myo-Inositol (biomarqueur des cellules gliales), les effets des dérivés chlorés sembleraient impacter préférentiellement le compartiment neuronal. De plus, il a été quantifié une baisse de la choline chez les souris mâles exposées au mélange de BPA dichlorés qui est absente chez les souris femelles. En accord avec les variations observées par imagerie des tenseurs de diffusion, les effets sont plus prononcés chez les souris mâles que les souris femelles exposées au mélange de dichlorés.

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Les dérivés chlorés ne semblent pas avoir le même impact sur le développement de l'hippocampe que le BPA non conjugué. Il a été précédemment rapporté dans la littérature que des dérivés du BPA (3-hydroxybisphénol A et bisphénol A 3,4-quinone) pouvaient ne pas induire les mêmes effets que le BPA. Dans l'étude de Ishido et al. (2011), le BPA augmente l'activité motrice (hyperactivité) alors que les dérivés du BPA ne montrent pas d'effet. Actuellement, les effets des dérivés chlorés au niveau du système nerveux central sont inconnus. Par conséquent, il est probable que les mécanismes d'action des dérivés chlorés diffèrent avec le BPA. En effet, le BPA semble exercer ses effets en altérant l'expression, la phosphorylation et la translocation au noyau du récepteur ER α au sein de l'hippocampe (X.-B. Xu et al. 2014). Or, les dérivés monochloré et 3,3'-dichlorés du BPA montrent également une affinité plus élevée au récepteur œstrogéniques ER α que le BPA non chloré (Takemura et al. 2005). Les perturbations induites par le BPA monochloré et de 3,3'-DCBPA (seul ou en mélange) que nous avons observées au niveau hippocampique pourraient être exercées par leurs activités œstrogéniques accrues.

D'autre part, les résultats de ces travaux de thèse mettent en évidence des perturbations au niveau de l'hippocampe pour le dérivé 3,3'-DCBPA alors que ces modifications sont absentes avec le traitement 3,5-DCBPA. Il a été précédemment étudié *in sillico* que l'amarrage moléculaire du BPA a lieu par des liaisons hydrogènes entre ses groupes méthyles et les acides aminés du récepteur ER α (Sengupta et al. 2013). Il pourrait être conjecturé que le dérivé 3,5-DCBPA avec deux fonctions chlore sur le même phénol posséderait une activité de xénoœstrogène moindre en comparaison au dérivé 3,3'-DCBPA qui possède une fonction chlore sur chaque phénol. Il serait intéressant d'explorer l'hypothèse d'une affinité altérée pour le récepteur œstrogéniques ER α en présence de deux groupements chlore sur le même phénol du dérivé 3,5-DCBPA.

La connexine 43 entre dans la constitution des jonctions communicantes et elle est majoritairement exprimée au niveau des astrocytes (principal type cellulaire du cerveau). L'hétérozygotie pour la connexine 43 semble accentuer l'impact des traitements MCBPA et 3,3'-MCBPA dans le striatum et le cortex cérébral chez les mâles alors que cette influence n'est pas décelable chez les femelles. Par contre, le métabolisme hippocampique ne semble pas affecté par le phénotype hétérozygote pour la connexine 43. Cette absence de différence dans le métabolisme hippocampique entre les souris sauvages et hétérozygotes exposées aux dérivés chlorés du BPA pourrait être liée à l'effet prépondérant des traitements ou à une

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

compensation par d'autres sous-types de connexines. En effet, il a été précédemment rapporté que d'autres sous-types de connexines (Cx26 et Cx46) peuvent compenser l'absence de connexine 43 dans le cerveau des souris KO (Dermietzel et al. 2000).

Comme des perturbations plus prononcées de la microstructure et du métabolisme ont été observées dans l'hippocampe chez les souris mâles (sauvages et hétérozygotes pour la connexine 43) exposées au mélange de BPA dichlorés, une étude par diffusion spectroscopique a été réalisée pour explorer les anomalies de l'intégrité intracellulaire. Nous n'avons pas observé de variation de la diffusion du NAA et de la créatine totale par le traitement de BPA dichlorés ou par le phénotype hétérozygote. Néanmoins, une élévation significative de la diffusion de la choline totale a été mesurée chez les souris contrôles hétérozygotes pour la connexine 43 en comparaison des souris sauvages. Les composés contenant de la choline sont deux à trois fois plus concentrés dans les astrocytes (Ronen and Valette 2015). Cela pourrait être une indication que des perturbations de la choline ont lieu principalement au niveau des astrocytes des souris hétérozygotes pour la connexine 43. Dans la littérature, il a été précédemment rapporté une hausse de l'acétylcholine (neurotransmetteur excitateur synthétisé à partir de la choline) dans le cerveau de souris transgéniques dont les connexines 43 ont été inactivées dans les astrocytes (Frisch et al. 2003).

Pour conclure, nous avons mis en évidence pour la première fois que les dérivés monochlorés et dichlorés (3,3'-DCBPA) du BPA administré à faible dose (20 µg/kg/jour ; inférieure à la dose journalière tolérable de 50 µg/kg/jour) induisent des altérations microstructurales et métaboliques au niveau de l'hippocampe chez les jeunes souris mâles et femelles exposées pendant la gestation et la lactation. Les mécanismes moléculaires sous-jacents ces phénomènes n'ont pas encore été élucidés. D'autres études sont requises pour corroborer les altérations induites par les dérivés chlorés au niveau hippocampique telles que des analyses de texture des images ou une étude histologique. Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons mis en évidence que la connexine 43 pouvait accentuer les effets des dérivés chlorés (MCBPA et 3,3'-DCBPA) au niveau de la microstructure dans le striatum et le cortex cérébral chez les mâles alors que cette influence n'est pas décelable chez les femelles. En complément à notre étude, un suivi longitudinal pourrait fournir des informations sur la persistance ou l'accentuation à long terme de l'impact de l'exposition aux dérivés chlorés du BPA.

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

Ces perturbations précoces quantifiées chez la souris devraient être pris en compte dans l'évaluation des risques de l'exposition aux dérivés chlorés du BPA chez l'Homme étant donné leurs présences via l'eau du robinet.

Bibliographie 3^{ème} Partie

- Alexander A. L., Lee J. E., Lazar M., Field A. S. (2007) Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 4, 316–329.
- Alonso-Magdalena P., Quesada I., Nadal A. (2015) Prenatal Exposure to BPA and Offspring Outcomes: The Diabetogenic Behavior of BPA. *Dose-Response* 13.
- Alonso-Magdalena P., Vieira E., Soriano S., Menes L., Burks D., Quesada I., Nadal A. (2010) Bisphenol A Exposure during Pregnancy Disrupts Glucose Homeostasis in Mothers and Adult Male Offspring. *Environ. Health Perspect.* 118, 1243–1250.
- Andra S. S., Charisiadis P., Arora M., Vliet-Ostapchouk J. V. van, Makris K. C. (2015) Biomonitoring of human exposures to chlorinated derivatives and structural analogs of bisphenol A. *Environ. Int.* 85, 352–379.
- Andra S. S., Kalyvas H., Andrianou X. D., Charisiadis P., Christophi C. A., Makris K. C. (2015) Preliminary evidence of the association between monochlorinated bisphenol A exposure and type II diabetes mellitus: A pilot study. *J. Environ. Sci. Heal. Part 50*, 243–259.
- Andra S. S., Makris K. C. (2015) Association between urinary levels of bisphenol A and its monochlorinated derivative and obesity. *J. Environ. Sci. Heal. Part 50*, 1169–1179.
- Andrianou X. D., Gängler S., Piciu A., Charisiadis P., Zira C., Aristidou K., Piciu D., Hauser R., Makris K. C. (2016) Human Exposures to Bisphenol A, Bisphenol F and Chlorinated Bisphenol A Derivatives and Thyroid Function. *Plos One* 11, e0155237.
- Angle B. M., Do R. P., Ponzi D., Stahlhut R. W., Drury B. E., Nagel S. C., Welshons W. V., et al. (2013) Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA): evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 42, 256–268.
- ANSES (2011) *Effets sanitaires du Bisphénol A*. Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l’Alimentation, de l’Environnement et du Travail.
- ANSES (2013) *Substances reprotoxiques et perturbateurs endocriniens*. Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l’Alimentation, de l’Environnement et du Travail.
- Araya J., Rodrigo R., Videla L. A., Thielemann L., Orellana M., Pettinelli P., Poniachik J. (2004) Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Sci.* 106, 635–643.
- Baciak L., Gasparova Z., Liptaj T., Juranek I. (2017) In vivo magnetic resonance approach to trimethyltin induced neurodegeneration in rats. *Brain Res.* 1673, 111–116.
- Barker D. J. P. (1998) In utero programming of chronic disease. *Clin. Sci.* 95, 115.
- Batista T. M., Alonso-Magdalena P., Vieira E., Amaral M. E. C., Cederroth C. R., Nef S., Quesada I., Carneiro E. M., Nadal A. (2012) Short-term treatment with bisphenol-A leads to metabolic abnormalities in adult male mice. *Plos One* 7, e33814.
- Begriche K., Igoudjil A., Pessayre D., Fromenty B. (2006) Mitochondrial dysfunction in NASH: Causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 6, 1–28.
- Bohte A. E., Werven J. R. van, Bipat S., Stoker J. (2011) The diagnostic accuracy of US, CT, MRI and 1H-MRS for the evaluation of hepatic steatosis compared with liver biopsy: a meta-analysis. *Eur. Radiol.* 21, 87–97.
- Cabaton N. J., Canlet C., Wadia P. R., Tremblay-Franco M., Gautier R., Molina J., Sonnenschein C., et al. (2013) Effects of Low Doses of Bisphenol A on the Metabolome of Perinatally Exposed CD-1 Mice. *Environ. Health Perspect.*

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

- Carwile J. L., Michels K. B. (2011) Urinary bisphenol A and obesity: NHANES 2003–2006. *Environ. Res.* 111, 825–830.
- Caserta D., Segni N. Di, Mallozzi M., Giovanale V., Mantovani A., Marci R., Moscarini M. (2014) Bisphenol a and the female reproductive tract: an overview of recent laboratory evidence and epidemiological studies. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12, 37.
- Cecil K. M., Dietrich K. N., Altaye M., Egelhoff J. C., Lindquist D. M., Brubaker C. J., Lanphear B. P. (2010) Proton Magnetic Resonance Spectroscopy in Adults with Childhood Lead Exposure. *Environ. Health Perspect.* 119, 403–408.
- Chen M., Fan Z., Zhao F., Gao F., Mu D., Zhou Y., Shen H., Hu J. (2016) Occurrence and Maternal Transfer of Chlorinated Bisphenol A and Nonylphenol in Pregnant Women and Their Matching Embryos. *Environ. Sci. Technol.* 50, 970–977.
- Chen M., Xu B., Ji W., Qiao S., Hu N., Hu Y., Wu W., *et al.* (2012) Bisphenol A Alters n-6 Fatty Acid Composition and Decreases Antioxidant Enzyme Levels in Rat Testes: A LC-QTOF-Based Metabolomics Study. *Plos One* 7, e44754.
- Chepied A. (2015) *Etude de l'implication de la Connexine 43 dans le processus d'invasion des glioblastomes humains.* Université de Poitiers.
- Chevalier N., Fénichel P. (2015) Endocrine disruptors: new players in the pathophysiology of type 2 diabetes? *Diabetes Metab.* 41, 107–115.
- Clayton E. M. R., Todd M., Dowd J. B., Aiello A. E. (2010) The Impact of Bisphenol A and Triclosan on Immune Parameters in the U.S. Population, NHANES 2003–2006. *Environ. Health Perspect.* 119, 390–396.
- Colin A., Bach C., Rosin C., Munoz J.-F., Dauchy X. (2014) Is Drinking Water a Major Route of Human Exposure to Alkylphenol and Bisphenol Contaminants in France? *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 86–99.
- Corbel T., Perdu E., Gayrard V., Puel S., Lacroix M. Z., Viguie C., Toutain P.-L., Zalko D., Picard-Hagen N. (2015) Conjugation and Deconjugation Reactions within the Fetoplacental Compartment in a Sheep Model: A Key Factor Determining Bisphenol A Fetal Exposure. *Drug Metab. Dispos.* 43, 467–476.
- Corbin I. R., Furth E. E., Pickup S., Siegelman E. S., Delikatny E. J. (2009) In vivo assessment of hepatic triglycerides in murine non-alcoholic fatty liver disease using magnetic resonance spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta Bba - Mol. Cell Biol. Lipids* 1791, 757–763.
- Corrales J., Kristofco L. A., Steele W. B., Yates B. S., Breed C. S., Williams E. S., Brooks B. W. (2015) Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. *Dose-Response* 13.
- Dermietzel R., Gao Y., Scemes E., Vieira D., Urban M., Kremer M., Bennett M. V., Spray D. C. (2000) Connexin43 null mice reveal that astrocytes express multiple connexins. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 32, 45–56.
- Dodson R. E., Nishioka M., Standley L. J., Perovich L. J., Brody J. G., Rudel R. A. (2012) Endocrine Disruptors and Asthma-Associated Chemicals in Consumer Products. *Environ. Health Perspect.* 120, 935–943.
- Doerge D. R., Twaddle N. C., Vanlandingham M., Brown R. P., Fisher J. W. (2011) Distribution of bisphenol A into tissues of adult, neonatal, and fetal Sprague–Dawley rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 255, 261–270.
- Dupuis A., Migeot V., Cariot A., Albouy-Llaty M., Legube B., Rabouan S. (2012) Quantification of bisphenol A, 353-nonylphenol and their chlorinated derivatives in drinking water treatment plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 4193–4205.
- EFSA (2015) Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Opinion on BPA. *Efsa J.* 13, 3978.

- Elsworth J. D., Jentsch J. D., Groman S. M., Roth R. H., Redmond E. D., Leranth C. (2015) Low circulating levels of bisphenol-A induce cognitive deficits and loss of asymmetric spine synapses in dorsolateral prefrontal cortex and hippocampus of adult male monkeys: BPA Alters Spine Synapses and Cognition. *J. Comp. Neurol.* 523, 1248–1257.
- Elsworth J. D., Jentsch J. D., VandeVoort C. A., Roth R. H., Jr D. E. R., Leranth C. (2013) Prenatal exposure to bisphenol A impacts midbrain dopamine neurons and hippocampal spine synapses in non-human primates. *NeuroToxicology* 35, 113–120.
- Fan Z., Hu J., An W., Yang M. (2013) Detection and Occurrence of Chlorinated Byproducts of Bisphenol A, Nonylphenol, and Estrogens in Drinking Water of China: Comparison to the Parent Compounds. *Environ. Sci. Technol.* 47, 10841–10850.
- Fang C., Ning B., Waqar A. B., Niimi M., Li S., Satoh K., Shiomi M., Ye T., Dong S., Fan J. (2014) Bisphenol A exposure enhances atherosclerosis in WHHL rabbits. *Plos One* 9, e110977.
- Fernandez M. F., Arrebola J. P., Taoufik J., Navalón A., Ballesteros O., Pulgar R., Vilchez J. L., Olea N. (2007) Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 24, 259–264.
- Fiorini C., Tilloy-Ellul A., Chevalier S., Charuel C., Pointis G. (2004) Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod. Toxicol.* 18, 413–421.
- Franssen D., Gérard A., Hennuy B., Donneau A.-F., Bourguignon J.-P., Parent A.-S. (2016) Delayed Neuroendocrine Sexual Maturation in Female Rats After a Very Low Dose of Bisphenol A Through Altered GABAergic Neurotransmission and Opposing Effects of a High Dose. *Endocrinology* 157, 1740–1750.
- Frisch C., Theis M., Souza Silva M. A. De, Dere E., Sohl G., Teubner B., Namestkova K., Willecke K., Huston J. P. (2003) Mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43 exhibit increased exploratory behaviour, impaired motor capacities, and changes in brain acetylcholine levels. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2313–2318.
- Fukazawa H., Hoshino K., Shiozawa T., Matsushita H., Terao Y. (2001) Identification and quantification of chlorinated bisphenol A in wastewater from wastepaper recycling plants. *Chemosphere* 44, 973–979.
- Galyon K. D., Farshidi F., Han G., Ross M. G., Desai M., Jellyman J. K. (2016) Maternal bisphenol A exposure alters rat offspring hepatic and skeletal muscle insulin signaling protein abundance. *Am. J. Obstet. Gynecol.*
- Gao H., Yang B.-J., Li N., Feng L.-M., Shi X.-Y., Zhao W.-H., Liu S.-J. (2015) Bisphenol A and Hormone-Associated Cancers: Current Progress and Perspectives. *Medicine (Baltimore)* 94, e211.
- García-Arevalo M., Alonso-Magdalena P., Rebelo Dos Santos J., Quesada I., Carneiro E. M., Nadal A. (2014) Exposure to Bisphenol-A during Pregnancy Partially Mimics the Effects of a High-Fat Diet Altering Glucose Homeostasis and Gene Expression in Adult Male Mice. *Plos One* 9, e100214.
- Gentilcore D., Porreca I., Rizzo F., Ganbaatar E., Carchia E., Mallardo M., Felice M. De, Ambrosino C. (2013) Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression. *Toxicology* 304, 21–31.
- Grasselli E., Cortese K., Voci A., Vergani L., Fabbri R., Barmo C., Gallo G., Canesi L. (2013) Direct effects of Bisphenol A on lipid homeostasis in rat hepatoma cells. *Chemosphere* 91, 1123–1129.

- Herlidou S., Rolland Y., Bansard J. Y., Rumeur E. Le, Certaines J. D. de (1999) Comparison of automated and visual texture analysis in MRI: Characterization of normal and diseased skeletal muscle. *Magn. Reson. Imaging* 17, 1393–1397.
- Hu J.-Y., Aizawa T., Ookubo S. (2002) Products of aqueous chlorination of bisphenol A and their estrogenic activity. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1980–1987.
- Huc L., Lemarié A., Guéraud F., Héliès-Toussaint C. (2012) Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro* 26, 709–717.
- Ishido M., Masuo Y., Terasaki M., Morita M. (2011) Rat hyperactivity by bisphenol A, but not by its derivatives, 3-hydroxybisphenol A or bisphenol A 3,4-quinone. *Toxicol. Lett.* 206, 300–305.
- Itoh K., Yaoi T., Fushiki S. (2012) Bisphenol A, an endocrine-disrupting chemical, and brain development: Bisphenol A and brain development. *Neuropathology* 32, 447–457.
- Jiang Y., Xia W., Zhu Y., Li X., Wang D., Liu J., Chang H., *et al.* (2014) Mitochondrial dysfunction in early life resulted from perinatal bisphenol A exposure contributes to hepatic steatosis in rat offspring. *Toxicol. Lett.* 228, 85–92.
- Jiménez-Díaz I., Zafra-Gómez A., Ballesteros O., Navea N., Navalón A., Fernández M. F., Olea N., Vílchez J. L. (2010) Determination of Bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 878, 3363–3369.
- Jochmanová I., Lazúrová Z., Rudnay M., Bačová I., Mareková M., Lazúrová I. (2015) Environmental estrogen bisphenol A and autoimmunity. *Lupus* 24, 392–399.
- Kang J.-H., Kondo F., Katayama Y. (2006) Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 226, 79–89.
- Kelly E. A., Opanashuk L. A., Majewska A. K. (2014) The effects of postnatal exposure to low-dose bisphenol-A on activity-dependent plasticity in the mouse sensory cortex. *Front. Neuroanat.* 8.
- Kim M. E., Park H. R., Gong E. J., Choi S. Y., Kim H. S., Lee J. (2011) Exposure to bisphenol A appears to impair hippocampal neurogenesis and spatial learning and memory. *Food Chem. Toxicol.* 49, 3383–3389.
- Kimura E., Matsuyoshi C., Miyazaki W., Benner S., Hosokawa M., Yokoyama K., Kakeyama M., Tohyama C. (2016) Prenatal exposure to bisphenol A impacts neuronal morphology in the hippocampal CA1 region in developing and aged mice. *Arch. Toxicol.* 90, 691–700.
- Krüger T., Long M., Bonefeld-Jørgensen E. C. (2008) Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicology* 246, 112–123.
- Kubo K., Arai O., Ogata R., Omura M., Hori T., Aou S. (2001) Exposure to bisphenol A during the fetal and suckling periods disrupts sexual differentiation of the locus coeruleus and of behavior in the rat. *Neurosci. Lett.* 304, 73–76.
- Kuiper G. G. J. M., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Häggblad J., Nilsson S., Gustafsson J.-Å. (1997) Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors α and β . *Endocrinology* 138, 863–870.
- Kumar D., Thakur M. K. (2014) Perinatal Exposure to Bisphenol-A Impairs Spatial Memory through Upregulation of Neurexin1 and Neuroligin3 Expression in Male Mouse Brain. *Plos One* 9, e110482.
- Kumar D., Thakur M. K. (2017) Anxiety like behavior due to perinatal exposure to Bisphenol-A is associated with decrease in excitatory to inhibitory synaptic density of male mouse brain. *Toxicology* 378, 107–113.

- Kunz N., Camm E. J., Somm E., Lodygensky G., Darbre S., Aubert M. L., Hüppi P. S., Sizonenko S. V., Gruetter R. (2011) Developmental and metabolic brain alterations in rats exposed to bisphenol A during gestation and lactation. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 37–43.
- Kunz N., Cudalbu C., Mlynarik V., Hüppi P. S., Sizonenko S. V., Gruetter R. (2010) Diffusion-weighted spectroscopy: A novel approach to determine macromolecule resonances in short-echo time ¹H-MRS. *Magn. Reson. Med.* 64, 939–946.
- Küppers E., Beyer C. (1999) Expression of estrogen receptor-alpha and beta mRNA in the developing and adult mouse striatum. *Neurosci. Lett.* 276, 95–98.
- Kuruto-Niwa R., Terao Y., Nozawa R. (2002) Identification of estrogenic activity of chlorinated bisphenol A using a GFP expression system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 12, 27–35.
- Laird D. W. (2006) Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J.* 394, 527–543.
- Lee H. J. (2003) Antiandrogenic Effects of Bisphenol A and Nonylphenol on the Function of Androgen Receptor. *Toxicol. Sci.* 75, 40–46.
- Lee I.-K., Rhee S.-K. (2007) Inhibitory effect of bisphenol A on gap junctional intercellular communication in an epithelial cell line of rat mammary tissue. *Arch. Pharm. Res.* 30, 337–343.
- Lewis M. M., Sterling N. W., Du G., Lee E.-Y., Shyu G., Goldenberg M., Allen T., *et al.* (2017) Lateralized Basal Ganglia Vulnerability to Pesticide Exposure in Asymptomatic Agricultural Workers. *Toxicol. Sci.* 159, 170–178.
- Li M. W. M., Mruk D. D., Lee W. M., Cheng C. Y. (2009) Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: Is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 2302–2314.
- Liao C., Kannan K. (2012) Determination of Free and Conjugated Forms of Bisphenol A in Human Urine and Serum by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 46, 5003–5009.
- Liu Z.-H., Ding J.-J., Yang Q.-Q., Song H.-Z., Chen X.-T., Xu Y., Xiao G.-R., Wang H.-L. (2016) Early developmental bisphenol-A exposure sex-independently impairs spatial memory by remodeling hippocampal dendritic architecture and synaptic transmission in rats. *Sci. Reports* 6.
- Luo G., Wei R., Niu R., Wang C., Wang J. (2013) Pubertal exposure to Bisphenol A increases anxiety-like behavior and decreases acetylcholinesterase activity of hippocampus in adult male mice. *Food Chem. Toxicol.* 60, 177–180.
- Luton D., Ducarme G., Vuillard E., Polak M. (2007) Intérêt d’une prise en charge spécifique des patientes enceintes présentant un trouble de la fonction thyroïdienne. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* 35, 60–65.
- Ma L., Steinberg J. L., Keyser-Marcus L., Ramesh D., Narayana P. A., Merchant R. E., Moeller F. G., Cifu D. X. (2015) Altered white matter in cocaine-dependent subjects with traumatic brain injury: A diffusion tensor imaging study. *Drug Alcohol Depend.* 151, 128–134.
- Marmugi A., Ducheix S., Lasserre F., Polizzi A., Paris A., Priymenko N., Bertrand-Michel J., *et al.* (2012) Low doses of bisphenol a induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology* 55, 395–407.
- Marmugi A., Lasserre F., Beuzelin D., Ducheix S., Huc L., Polizzi A., Chetivaux M., *et al.* (2014) Adverse effects of long-term exposure to bisphenol A during adulthood leading to hyperglycaemia and hypercholesterolemia in mice. *Toxicology* 325, 133–143.

- Migeot V., Dupuis A., Cariot A., Albouy-Llaty M., Pierre F., Rabouan S. (2013) Bisphenol A and Its Chlorinated Derivatives in Human Colostrum. *Environ. Sci. Technol.* 47, 13791–13797.
- Miyawaki J., Sakayama K., Kato H., Yamamoto H., Masuno H. (2007) Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *J. Atheroscler. Thromb.* 14, 245–252.
- Moghaddam H. S., Samarghandian S., Farkhondeh T. (2015) Effect of bisphenol A on blood glucose, lipid profile and oxidative stress indices in adult male mice. *Toxicol. Mech. Methods* 25, 507–513.
- Moriyama K., Tagami T., Akamizu T., Usui T., Saijo M., Kanamoto N., Hataya Y., Shimatsu A., Kuzuya H., Nakao K. (2002) Thyroid Hormone Action Is Disrupted by Bisphenol A as an Antagonist. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 5185–5190.
- Muhamad M. S., Salim M. R., Lau W. J., Yusop Z. (2016) A review on bisphenol A occurrences, health effects and treatment process via membrane technology for drinking water. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 11549–11567.
- Mustieles V., Pérez-Lobato R., Olea N., Fernández M. F. (2015) Bisphenol A: Human exposure and neurobehavior. *NeuroToxicology* 49, 174–184.
- Nakamura K., Itoh K., Sugimoto T., Fushiki S. (2007) Prenatal exposure to bisphenol A affects adult murine neocortical structure. *Neurosci. Lett.* 420, 100–105.
- Nakamura K., Itoh K., Yoshimoto K., Sugimoto T., Fushiki S. (2010) Prenatal and lactational exposure to low-doses of bisphenol A alters brain monoamine concentration in adult mice. *Neurosci. Lett.* 484, 66–70.
- Negri-Cesi P. (2015) Bisphenol A Interaction With Brain Development and Functions. *Dose-Response* 13.
- Nishikawa M., Iwano H., Yanagisawa R., Koike N., Inoue H., Yokota H. (2010) Placental Transfer of Conjugated Bisphenol A and Subsequent Reactivation in the Rat Fetus. *Environ. Health Perspect.* 118, 1196–1203.
- Obata T., Kubota S. (2000) Formation of hydroxy radicals by environmental estrogen-like chemicals in rat striatum. *Neurosci. Lett.* 296, 41–44.
- Ogi H., Itoh K., Ikegaya H., Fushiki S. (2015) Alterations of neurotransmitter norepinephrine and gamma-aminobutyric acid correlate with murine behavioral perturbations related to bisphenol A exposure. *Brain Dev.* 37, 739–746.
- Oh S. (2015) Bisphenol A and 4- tert -Octylphenol Inhibit Cx46 Hemichannel Currents. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 19, 73.
- Orellana J. A., Giaume C., Saez J. C. (2011) Role of Connexin Hemichannels in Neurodegeneration, in *Neurodegener. Dis. - Process. Prev. Prot. Monit.*, (Chang R. C.-C., ed). InTech.
- Pannasch U., Derangeon M., Chever O., Rouach N. (2012) Astroglial gap junctions shape neuronal network activity. *Commun. Integr. Biol.* 5, 248–254.
- Peretz J., Vrooman L., Ricke W. A., Hunt P. A., Ehrlich S., Hauser R., Padmanabhan V., *et al.* (2014) Bisphenol A and Reproductive Health: Update of Experimental and Human Evidence, 2007–2013. *Environ. Health Perspect.*
- Polo M., Llompart M., Garcia-Jares C., Gomez-Noya G., Bollain M.-H., Cela R. (2006) Development of a solid-phase microextraction method for the analysis of phenolic flame retardants in water samples. *J. Chromatogr. A* 1124, 11–21.
- Ramamonjisoa N., Ratiney H., Mutel E., Guillou H., Mithieux G., Pilleul F., Rajas F., Beuf O., Cavassila S. (2013) In vivo hepatic lipid quantification using MRS at 7 Tesla in a mouse model of glycogen storage disease type 1a. *J. Lipid Res.* 54, 2010–2022.

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

- Riu A., Maire A. le, Grimaldi M., Audebert M., Hillenweck A., Bourguet W., Balaguer P., Zalko D. (2011) Characterization of Novel Ligands of ER, Er, and PPAR: The Case of Halogenated Bisphenol A and Their Conjugated Metabolites. *Toxicol. Sci.* 122, 372–382.
- Rogers J. A., Metz L., Yong V. W. (2013) Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol. Immunol.* 53, 421–430.
- Ronen I., Valette J. (2015) Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Spectroscopy, in *eMagRes*, (Harris R. K., Wasylishen R. L., eds), pp. 733–750. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Rudel R. A., Brody J. G., Spengler J. D., Vallarino J., Geno P. W., Sun G., Yau A. (2001) Identification of selected hormonally active agents and animal mammary carcinogens in commercial and residential air and dust samples. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 1995 51, 499–513.
- Saal F. S. vom, Nagel S. C., Coe B. L., Angle B. M., Taylor J. A. (2012) The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 354, 74–84.
- Sakamoto H., Yokota H., Kibe R., Sayama Y., Yuasa A. (2002) Excretion of bisphenol A-glucuronide into the small intestine and deconjugation in the cecum of the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1573, 171–176.
- Salian S., Doshi T., Vanage G. (2009) Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology* 265, 56–67.
- Seiwa C., Nakahara J., Komiyama T., Katsu Y., Iguchi T., Asou H. (2004) Bisphenol A Exerts Thyroid-Hormone-Like Effects on Mouse Oligodendrocyte Precursor Cells. *Neuroendocrinology* 80, 21–30.
- Sengupta S., Obiorah I., Maximov P., Curpan R., Jordan V. (2013) Molecular mechanism of action of bisphenol and bisphenol A mediated by oestrogen receptor alpha in growth and apoptosis of breast cancer cells: ER α mediated action of bisphenol and bisphenol A. *Br. J. Pharmacol.* 169, 167–178.
- Shankar A., Teppala S. (2011) Relationship between Urinary Bisphenol A Levels and Diabetes Mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 3822–3826.
- Shibata N., Matsumoto J., Nakada K., Yuasa A., Yokota H. (2002) Male-specific suppression of hepatic microsomal UDP-glucuronosyl transferase activities toward sex hormones in the adult male rat administered bisphenol A. *Biochem. J.* 368, 783–788.
- Shimpi P. C., More V. R., Paranjpe M., Donepudi A. C., Goodrich J. M., Dolinoy D. C., Rubin B., Slitt A. L. (2017) Hepatic Lipid Accumulation and Nrf2 Expression following Perinatal and Peripubertal Exposure to Bisphenol A in a Mouse Model of Nonalcoholic Liver Disease. *Environ. Health Perspect.* 125.
- Staples C. A., Dorn P. B., Klecka G. M., O'Block S. T., Harris L. R. (1998) A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 36, 2149–2173.
- Stehberg J., Moraga-Amaro R., Salazar C., Becerra A., Echeverria C., Orellana J. A., Bultynck G., et al. (2012) Release of gliotransmitters through astroglial connexin 43 hemichannels is necessary for fear memory consolidation in the basolateral amygdala. *Faseb J.* 26, 3649–3657.
- Strakovsky R. S., Wang H., Engeseth N. J., Flaws J. A., Helferich W. G., Pan Y.-X., Lezmi S. (2015) Developmental bisphenol A (BPA) exposure leads to sex-specific modification

- of hepatic gene expression and epigenome at birth that may exacerbate high-fat diet-induced hepatic steatosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 284, 101–112.
- Sun Y., Nakashima M. N., Takahashi M., Kuroda N., Nakashima K. (2002) Determination of bisphenol A in rat brain by microdialysis and column switching high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.* 16, 319–326.
- Szczypiński P. M., Strzelecki M., Materka A., Klepaczko A. (2009) MaZda—A software package for image texture analysis. *Comput. Methods Programs Biomed.* 94, 66–76.
- Takayanagi S., Tokunaga T., Liu X., Okada H., Matsushima A., Shimohigashi Y. (2006) Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) with high constitutive activity. *Toxicol. Lett.* 167, 95–105.
- Takemura H., Ma J., Sayama K., Terao Y., Zhu B. T., Shimo K. (2005) In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A. *Toxicology* 207, 215–221.
- Tandra S., Yeh M. M., Brunt E. M., Vuppalanchi R., Cummings O. W., Ünalp-Arida A., Wilson L. A., Chalasani N. (2011) Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 55, 654–659.
- Taylor J. A., Welshons W. V., Saal F. S. vom (2008) No effect of route of exposure (oral; subcutaneous injection) on plasma bisphenol A throughout 24h after administration in neonatal female mice. *Reprod. Toxicol.* 25, 169–176.
- Thomas P., Dong J. (2006) Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102, 175–179.
- Tiwari S. K., Agarwal S., Chauhan L. K. S., Mishra V. N., Chaturvedi R. K. (2015) Bisphenol-A Impairs Myelination Potential During Development in the Hippocampus of the Rat Brain. *Mol. Neurobiol.* 51, 1395–1416.
- Vandenberg L. N., Maffini M. V., Sonnenschein C., Rubin B. S., Soto A. M. (2009) Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption. *Endocr. Rev.* 30, 75–95.
- Vibert J.-F. (2011) *Neurophysiologie: de la physiologie à l'exploration fonctionnelle*. Elsevier Masson, Paris.
- Videla L. A., Rodrigo R., Araya J., Poniachik J. (2004) Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1499–1507.
- Viñas R., Goldblum R. M., Watson C. S. (2013) Rapid estrogenic signaling activities of the modified (chlorinated, sulfonated, and glucuronidated) endocrine disruptor bisphenol A. *Endocr. Disruptors* 1, e25411.
- Wang D., Li Y. (2015) 1H Magnetic Resonance Spectroscopy Predicts Hepatocellular Carcinoma in a Subset of Patients With Liver Cirrhosis: A Randomized Trial. *Medicine (Baltimore)* 94, e1066.
- Wang N., Zhou Y., Fu C., Wang H., Huang P., Wang B., Su M., *et al.* (2015) Influence of Bisphenol A on Thyroid Volume and Structure Independent of Iodine in School Children. *Plos One* 10, e0141248.
- Wang T., Li M., Chen B., Xu M., Xu Y., Huang Y., Lu J., *et al.* (2012) Urinary Bisphenol A (BPA) Concentration Associates with Obesity and Insulin Resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E223–E227.
- Wang T., Lu J., Xu M., Xu Y., Li M., Liu Y., Tian X., *et al.* (2013) Urinary Bisphenol A Concentration and Thyroid Function in Chinese Adults: *Epidemiology* 24, 295–302.

- Watson C., Bulayeva N., Wozniak A., Finnerty C. (2005) Signaling from the membrane via membrane estrogen receptor- α : Estrogens, xenoestrogens, and phytoestrogens. *Steroids* 70, 364–371.
- Wetherill Y. B., Akingbemi B. T., Kanno J., McLachlan J. A., Nadal A., Sonnenschein C., Watson C. S., Zoeller R. T., Belcher S. M. (2007) In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod. Toxicol.* 24, 178–198.
- Willhite C. C., Ball G. L., McLellan C. J. (2008) Derivation of a Bisphenol a Oral Reference Dose (RfD) and Drinking-Water Equivalent Concentration*. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part B* 11, 69–146.
- Williams E., Hamilton J. A., Jain M. K., Allerhand A., Cordes E. H., Ochs S. (1973) Natural Abundance Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of the Canine Sciatic Nerve. *Science* 181, 869–871.
- Wu Z., Matsui O., Kitao A., Kozaka K., Koda W., Kobayashi S., Ryu Y., Minami T., Sanada J., Gabata T. (2015) Hepatitis C Related Chronic Liver Cirrhosis: Feasibility of Texture Analysis of MR Images for Classification of Fibrosis Stage and Necroinflammatory Activity Grade. *Plos One* 10, e0118297.
- Xu X., Liu Y., Sadamatsu M., Tsutsumi S., Akaike M., Ushijima H., Kato N. (2007) Perinatal bisphenol A affects the behavior and SRC-1 expression of male pups but does not influence on the thyroid hormone receptors and its responsive gene. *Neurosci. Res.* 58, 149–155.
- Xu X.-B., He Y., Song C., Ke X., Fan S.-J., Peng W.-J., Tan R., *et al.* (2014) Bisphenol a regulates the estrogen receptor alpha signaling in developing hippocampus of male rats through estrogen receptor: BISPHENOL A AND ESTROGEN RECEPTOR ALPHA. *Hippocampus* 24, 1570–1580.
- Yamamoto T., Yasuhara A. (2002) Chlorination of bisphenol A in aqueous media: formation of chlorinated bisphenol A congeners and degradation to chlorinated phenolic compounds. *Chemosphere* 46, 1215–1223.
- Ye X., Kuklenyik Z., Needham L. L., Calafat A. M. (2005) Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction–high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 638–644.
- Yokoo T., Wolfson T., Iwaisako K., Peterson M. R., Mani H., Goodman Z., Changchien C., *et al.* (2015) Evaluation of Liver Fibrosis Using Texture Analysis on Combined-Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Images at 3.0T. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–12.
- Yu H., Buch K., Li B., O'Brien M., Soto J., Jara H., Anderson S. W. (2015) Utility of texture analysis for quantifying hepatic fibrosis on proton density MRI: Hepatic Fibrosis on Proton Density MRI. *J. Magn. Reson. Imaging* 42, 1259–1265.
- Zalko D., Soto A. M., Dolo L., Dorio C., Rathahao E., Debrauwer L., Faure R., Cravedi J.-P. (2003) Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ. Health Perspect.* 111, 309–319.
- Zhang L., Zhao X., Ouyang H., Wang S., Zhou C. (2016) Diagnostic value of 3.0T 1H MRS with choline-containing compounds ratio (Δ CCC) in primary malignant hepatic tumors. *Cancer Imaging* 16.
- Zhou R., Chen F., Feng X., Zhou L., Li Y., Chen L. (2015a) Perinatal exposure to low-dose of bisphenol A causes anxiety-like alteration in adrenal axis regulation and behaviors of rat offspring: A potential role for metabotropic glutamate 2/3 receptors. *J. Psychiatr. Res.* 64, 121–129.

3^{ème} partie : Etude des effets du bisphénol A et de ses dérivés chlorés au niveau hépatique et cérébral

- Zhou Y., Chen M., Zhao F., Mu D., Zhang Z., Hu J. (2015b) Ubiquitous Occurrence of Chlorinated Byproducts of Bisphenol A and Nonylphenol in Bleached Food Contacting Papers and Their Implications for Human Exposure. *Environ. Sci. Technol.* 49, 7218–7226.
- Zoeller R. T., Bansal R., Parris C. (2005) Bisphenol-A, an Environmental Contaminant that Acts as a Thyroid Hormone Receptor Antagonist *in Vitro* , Increases Serum Thyroxine, and Alters RC3/Neurogranin Expression in the Developing Rat Brain. *Endocrinology* 146, 607–612.

Annexe 1 :

Les paramètres de texture

L'analyse de texture est un ensemble de techniques mathématiques permettant de quantifier les différents niveaux de gris dans une image en termes d'intensité et de distribution.

La méthode de l'histogramme du premier ordre est appliquée au sein de chaque pixel d'une région d'intérêt afin de déterminer la fréquence d'apparition de chaque niveau sur l'échelle des gris.

- **La moyenne** donne la valeur moyenne des niveaux de gris appartenant à tous les pixels de la région d'intérêt.

$$MOY = \frac{1}{N} \sum_{i,j} g(i,j)$$

Avec $g(i, j)$ représente la valeur du niveau de gris du pixel (i,j) et N est un facteur de normalisation qui correspond au nombre total de pixels.

- **La variance** correspond au moment d'ordre 2 et elle mesure la répartition des niveaux de gris autour de la moyenne.

$$VAR = \frac{1}{N} \sum_{i,j} (g(i,j) - MOY)^2$$

- **Le skewness** correspond à un moment d'ordre 3 centré autour de la moyenne et il mesure la déviation de la distribution des niveaux de gris par rapport à une distribution symétrique.

$$SKEW = \frac{1}{N} \sum_{i,j} (g(i,j) - MOY)^3$$

- **Le kurtosis** correspond au moment d'ordre 4 centré autour de la moyenne et il caractérise la forme du sommet de l'histogramme.

$$KURT = \frac{1}{N} \sum_{i,j} (g(i,j) - MOY)^4$$

- **Les percentiles p_i** correspondent à la fréquence cumulée d'apparition d'un niveau de gris. La proportion des pixels en pourcentage ayant une valeur de niveaux de gris inférieure à la valeur correspondant à p_i .

La méthode de matrice de cooccurrence permet de caractériser la fréquence d'apparition d'un motif formé de deux pixels séparés par une certaine distance **d** dans une direction particulière **θ** par rapport à l'horizontale.

- **La moyenne**

$$MOY = \sum_i \sum_j p(i, j)$$

Avec $p(i, j)$ représente les éléments de la matrice de cooccurrence c'est-à-dire la probabilité de passer d'un pixel de niveau de gris i à un pixel d'un niveau de gris j .

- **La variance** caractérise la distribution des niveaux de gris autour de la valeur moyenne.

$$VAR = \sum_i \sum_j (i - MOY)^2 p(i, j)$$

- **L'énergie** mesure l'homogénéité de l'image. Si la valeur d'énergie est faible, la région d'intérêt est peu homogène car elle présente de transitions de niveaux de gris.

$$E = \sum_{i,j} (p(i, j))^2$$

- **Le contraste** mesure les variations locales des niveaux de gris. Si les variations sont importantes (région d'intérêt peu homogène), la valeur du contraste est élevé.

$$CONT = \sum_i \sum_j (i - j)^2 p(i, j)$$

- **La corrélation**

$$COR = \sum_i \sum_j (i - \mu_x)(j - \mu_y)p(i, j)$$

Avec μ_x et μ_y représentant les moyennes respectives des lignes et des colonnes de la matrice.

- **L'entropie** mesure la complexité de l'image. Elle permet de mesurer le degré de granulation de l'image. Si la valeur de l'entropie est élevée, la granulation est grossière.

$$MOY = - \sum_i \sum_j p(i, j) \log p(i, j)$$

- **L'homogénéité** a un comportement inverse du contraste. Si la région d'intérêt est homogène, la valeur de ce paramètre est élevée.

$$HOM = \sum_{i,j} \frac{1}{1 + (i - j)^2} p(i, j)$$

Annexe 2 :

Communications scientifiques

Les résultats présentés dans ce manuscrit de thèse ont fait l'objet de communications orales et affichées lors de congrès nationaux et internationaux. Des articles de recherche originaux sont en cours de publication ou en préparation.

Communications orales

El Hamrani D., Chepied A., Defamie N., Mème W., Mesnil M., Mème S. **Perinatal exposure to dichloro-bisphenol A alters lipid composition of mouse liver.** 33rd ESMRMB Congress, Vienna, Austria; 29 september-1st october **2016**.

El Hamrani D., Chepied A., Mème W., Mesnil M., Defamie N., Mème S. **Perinatal exposure to dichloro-bisphenol A alters hepatic lipid composition in mouse: a study by MRI and ¹H MRS.** Studium conference: "Being Smart in Coordination Chemistry: Medical Applications; Orléans, France; 26-28 september **2016**.

Communications affichées

El Hamrani D., Chepied A., Defamie N., Mème W., Mesnil M., Mème S. **Une exposition périnatale aux dérivés dichlorés du Bisphénol A altère le métabolisme et la microarchitecture hippocampique: étude par IRM et ¹H SRM chez la souris.** 3^{ème} congrès de la SFRMBM, Bordeaux, France; 13-15 mars **2017**.

El Hamrani D., Chepied A., Defamie N., Mème W., Mesnil M., Mème S. **Effet des injections répétées de gadodiamide sur le métabolisme cérébelleux chez le rat mesuré *in vivo* par ¹H SRM.** 3^{ème} congrès de la SFRMBM, Bordeaux, France; 13-15 mars **2017**.

El Hamrani D., Chepied A., Defamie N., Mème W., Mesnil M., Mème S. **Une exposition périnatale au Bisphénol A dichloré altère la composition lipidique hépatique chez la souris.** Colloque Biotechnocentre 2016, Seillac, France ; 13-14 octobre **2016**.

El Hamrani D., Chepied A., Defamie N., Mème W., Mesnil M., Mème S. **Perinatal exposure to dichloro-bisphenol A induces metabolic and micro-architectural modifications in mouse hippocampus.** 33rd ESMRMB Congress, Vienna, Austria; 29 september-1st october **2016**.

El Hamrani D., Chepied A., Defamie N., Mème W., Mesnil M., Mème S. **Perinatal exposure to Bisphenol A induces sex-specific modifications in lipid profile of mouse liver.** 2nd International Workshop on Endocrine Disruptors effects on wildlife and human health, Paris, France; 21-22 january **2016**.

Articles accepté ou en préparation

« **Gestational and lactational exposure to dichlorinated bisphenol A induces early alterations of hepatic lipid composition in mice** » accepté dans Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine (9 Février 2018)

<https://doi.org/10.1007/s10334-018-0679-7>

« **Perinatal exposure to chlorinated derivatives of BPA induces metabolic and micro-architectural modifications in mouse hippocampus** » (en préparation)

« **Linear gadolinium-based contrast agents are associated with long-term brain gadolinium retention in healthy rats** » (en préparation)



Gestational and lactational exposure to dichlorinated bisphenol A induces early alterations of hepatic lipid composition in mice

Dounia El Hamrani¹ · Amandine Chepied² · William Mème¹ · Marc Mesnil² · Norah Defamie² · Sandra Mème¹

Received: 16 September 2017 / Revised: 9 February 2018 / Accepted: 9 February 2018
© ESMRMB 2018

Abstract

Objective Using non-invasive magnetic resonance (MR) techniques and a histological approach, we assessed the outcomes of perinatal exposure at a low dose of 3,3'-DCBPA (2-chloro-4-[1-(3-chloro-4-hydroxyphenyl)-1-methylethyl]phenol) and/or 3,5-DCBPA (2,6-dichloro-4-[1-(4-hydroxyphenyl)-1-methylethyl]phenol) on mice livers.

Materials and methods Fertilized female Swiss mice were injected intraperitoneally during gestation and lactation with either vehicle control, 20 µg/kg/day of BPA, 3,5-DCBPA, 3,3'-DCBPA or a mixture (mix-DCBPA). Complementary methods were used to evaluate, in male and female pups, (1) liver structure by texture analysis of images obtained through MR imaging (MRI) and histology, (2) hepatic lipid composition through *in vivo* ¹H MR spectroscopy (¹H MRS).

Results Principal component analysis of texture parameters showed no structural modification of the liver with BPA and DCBPA treatments. Accordingly, no hepatic microvesicular steatosis was observed through hematoxylin–eosin staining. Compared to control, MRS revealed no difference in lipid composition for BPA, 3,5-DCBPA or 3,3'-DCBPA groups. However, MRS detected a significant increase in the mix-DCBPA groups for the saturated component of fatty acids (FA), total unsaturated FA bond index and polyunsaturated FA bond index.

Conclusion Prior to any structural changes, polyunsaturated fatty acids significantly increased in young male and female mice exposed perinatally at a low dose to a mixture of dichlorinated BPA.

Keywords Bisphenol A · Dichlorinated BPA · Perinatal exposure · Liver · Lipid composition · MRI · MRS

Dounia El Hamrani and Amandine Chepied contributed equally to this work.

✉ Dounia El Hamrani
dounia.elhamrani@cnrs-orleans.fr

Amandine Chepied
amandine.chepied@univ-poitiers.fr

William Mème
william.meme@cnrs-orleans.fr

Marc Mesnil
marc.mesnil@univ-poitiers.fr

Norah Defamie
norah.defamie@univ-poitiers.fr

Sandra Mème
sandra.meme@cnrs-orleans.fr

¹ Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Rue Charles Sadron, CS 80054, 45071 Orléans Cedex 2, France

² Laboratoire Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, University of Poitiers, ERL-CNRS 7368, 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073 Poitiers Cedex 09, France

Introduction

Bisphenol A [2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane] (BPA) is an endocrine disrupting chemical extensively used as a raw material in the production of epoxy resin and polycarbonate plastics. BPA is also found in paper (e.g. thermal paper and carbonless copy paper), plastic household products, coatings and linings for food and drink containers, and packaging [1]. Its production is estimated at 3 million tons per year with a related emission into the atmosphere of 100 tons [2]. BPA is ubiquitously found in the environment and its concentration ranges from 0.317 ng/L up to 1.275 µg/L in water treatment plants across the world [3]. Humans are exposed by oral, inhalation and transdermal routes [4]. BPA possesses xenoestrogen properties, even if its affinity to estrogen receptors (ER α and ER β) is 1000 to 10,000-fold weaker than 17 β -estradiol [5, 6].

The disinfection of drinkable tap water with sodium hypochlorite can generate mono-, di-, tri- and tetra-chlorinated BPA byproducts [7, 8]. The concentration of chlorinated

BPA ranges from traces ($< 0.2 \mu\text{g/L}$) to $2 \mu\text{g/L}$ in wastewater from the final effluents of paper manufacturing plants [9]. In drinking water treatment plants, their concentrations reached up to 26.7 ng/L [10]. These derivatives have also been detected in food which was in contact with BPA-contaminated paper [11, 12].

In addition, chlorinated BPAs have been detected in several human tissues and liquids: adipose tissue [13], placenta [14], breast milk [15, 16] and urine [17, 18]. In these samples, dichlorinated BPA (DCBPA) was present in higher amounts than the other chlorinated BPAs [12]. It has also been reported that mono- and dichlorinated BPA are detected more frequently than BPA in human embryos and have been linked to high maternal transfer [19]. Furthermore, chlorinated BPA shows a higher affinity to estrogen receptors than BPA [5, 6].

More recently, it has been hypothesized that early BPA exposure might contribute as a non-traditional risk factor to the increasing prevalence of metabolic syndrome which includes obesity, type 2 diabetes mellitus (T2DM) and cardiovascular diseases (reviewed in [20–22]). More specifically, exposure to BPA perinatally or during adulthood at a dose inferior or equal to the tolerable daily intake (TDI; $50 \mu\text{g/kg/day}$) can promote hepatic steatosis in rodents with increased hepatic triglycerides and upregulation of lipogenic genes [23, 24]. Hepatic steatosis is caused by an imbalance in the metabolism of fatty acids leading to an abnormal lipid accumulation in hepatocytes, either as a single large droplet or multiple small droplets accompanied by oxidative stress, lipid peroxidation and mitochondria dysfunction [25]. Perinatal exposure ($40 \mu\text{g/kg/day}$) with a normal diet can lead to hepatic micro-vesicular steatosis in offspring of rats, along with mitochondrial dysfunction and an increase in reactive oxygen species [23].

Overall, these findings led us to hypothesize that an exposure to BPA and its chlorinated byproducts in early life might affect the susceptibility of the liver in adulthood. Despite the extensive literature concerning the metabolic effects of BPA, the effects on the liver following gestational and lactational exposure to chlorinated BPA remain unknown. Due to the importance of the liver in controlling body energy homeostasis and the link with hepatic steatosis, our study focused on assessing the early impact of perinatal exposure to BPA, 3,3'-DCBPA (2-chloro-4-[1-(3-chloro-4-hydroxyphenyl)-1-methylethyl]phenol) and/or 3,5-DCBPA (2,6-dichloro-4-[1-(4-hydroxyphenyl)-1-methylethyl]phenol) on mouse offspring at a low dose (inferior to the tolerable daily intake of $50 \mu\text{g/kg/day}$).

The originality of our study was to investigate the impact of xenobiotics on the liver using magnetic resonance (MR) tools. MR techniques are classically performed on the liver in clinical and preclinical studies to diagnose and/or monitor progression of disease. Indeed, texture analysis of images

obtained through magnetic resonance imaging (MRI) can be useful in quantifying hepatic fibrosis [26, 27] and in grading necroinflammatory activity in patients with chronic hepatitis C [28]. Texture analysis actually contains several mathematical techniques of image analysis that allow the characterization of a region of interest (ROI) by studying its constitutive pixels in terms of intensity and spatial distribution. In addition, ^1H in vivo magnetic resonance spectroscopy (MRS) is currently the only non-invasive technique to provide quantitative or semi-quantitative information about hepatic metabolism. Therefore, metabolic hallmarks have been determined by ^1H MRS in several liver pathologies, such as hepatocellular carcinoma secondary to liver cirrhosis [29], primary malignant hepatic tumors [30] and hepatic steatosis [31]. These MR approaches allowed us to use complementary methods on the same mice to evaluate the precocious outcomes of perinatal exposure to BPA and a mixture of dichlorinated BPA (mix-DCBPA) on (1) liver structure by texture analysis of MR images and histology and (2) hepatic lipid composition by non-invasive in vivo ^1H MRS.

Materials and methods

Animals and treatments

All animal experimental procedures were performed in accordance with the recommendations of the European Union (2010/63/EU) for care and use of laboratory animals and conformed to the ethical guidelines of the French Ministry of Agriculture and Forests (Animal Health and Protection Veterinary Service). The protocol was approved by the local ethics committee “COMETHEA no. 84” (no. 02.160).

Fertilized female Swiss mice (Jackson labs) were injected daily intraperitoneally from embryonic day 1 (E1) until 6 weeks (pregnancy and breeding) with either sunflower oil as vehicle control (CTR) ($n = 5$), $20 \mu\text{g/kg/day}$ of BPA ($n = 5$), $20 \mu\text{g/kg/day}$ of 3,5-Dichlorobisphenol A (3,5-DCBPA) ($n = 5$), $20 \mu\text{g/kg/day}$ of 3,3'-Dichlorobisphenol A (3,3'-DCBPA) ($n = 4$) or a mixture with $10 \mu\text{g/kg/day}$ of each (mix-DCBPA) ($n = 5$) (Fig. 1). Male (M) and female (F) pups were separated into 10 experimental groups as follows: M CTR ($n = 13$); F CTR ($n = 16$); M BPA ($n = 19$); F BPA ($n = 16$); M 3,5-DCBPA ($n = 16$); F 3,5-DCBPA ($n = 14$); M 3,3'-DCBPA ($n = 15$); F 3,3'-DCBPA ($n = 12$); M mix-DCBPA ($n = 19$) and F mix-DCBPA ($n = 17$). The animal holding room was maintained under a 12 h light/dark cycle at $24.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Body weight

Pups had access to a normal diet and water ad libitum. The composition of the diet was as follows: 22% crude protein,

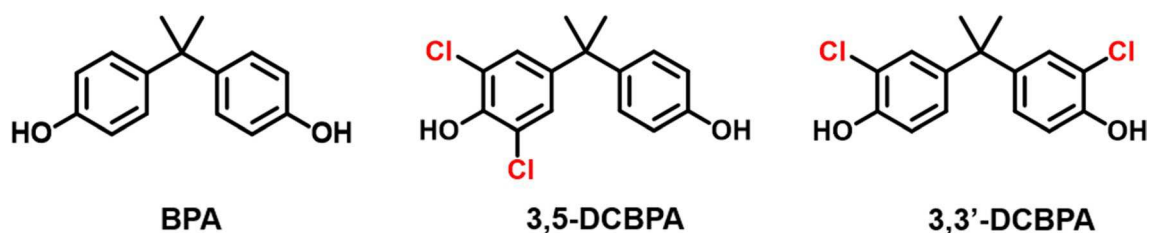


Fig. 1 Chemical structure of bisphenol A [2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane] (BPA) and its dichlorinated derivatives 3,3'-DCBPA [2-chloro-4-[1-(3-chloro-4-hydroxyphenyl)-1-methylethyl]phenol] and 3,5-DCBPA [2,6-Dichloro-4-[1-(4-hydroxyphenyl)-1-methylethyl]phenol]

4.50% crude fat, 60.75% carbohydrates, 6.40% crude ash, 4.50% crude fiber, 0.95% calcium, 0.60% phosphate, 0.30% sodium. Body weight was measured every 2 days from post-natal day (PND) 28 to PND56.

Magnetic resonance experimental conditions

At 7 weeks (after breeding), magnetic resonance acquisitions were performed on a 7 T Pharmascan 70/16 superconducting magnet (Bruker, Wissembourg, France) with a shielded gradient set (230 mT m⁻¹ maximum gradient amplitude and 90 mm inner diameter) and a transmit-receive quadrature coil with an inner diameter of 38 mm.

Animals were anesthetized by inhalation of 2% isoflurane then maintained during MR experiments at 1.5% (0.5 L min⁻¹ mixed in air and oxygen with 1:1 ratio). The physiological body temperature was maintained inside the magnet by circulating warm water. A pressure sensor was used to monitor the respiration cycle and obtain the respiration frequency for the reconstruction of Ig-FLASH (intra-gate fast low angle shot) sequence.

Proton-density-weighted Ig-FLASH parameters were echo time (TE)/repetition time (TR), 4/174 ms; flip angle, 20°; in plane resolution, 117 × 117 μm²/pixel and respiration frequency for reconstruction, 40 bpm. PRESS (point resolved spectroscopy) sequence (voxel 4 × 4 × 3 mm³; TE/TR, 16/3260 ms; 21 min 47 s) with VAPOR module (variable pulse power and optimized relaxation delays) for water suppression was achieved to assess total lipid composition. TR was set to be greater than 3 s to avoid T1 relaxation effects and to have all resonances fully relaxed [32]). A 48 mm³ voxel was placed in the right liver lobe to avoid large blood vessels, biliary structures and surrounding fat [32, 33]. Proton-density-weighted Ig-FLASH images were used to place the voxel. Localized first and second order shim terms were adjusted within the voxel.

Texture analysis of liver images obtained by MRI

Texture analysis of liver images obtained by MRI was performed as previously described [34]. In summary, acquired axial MR images of the mouse abdomen were normalized

with the same intensity (3×10^6 A.U) in Paravision 5.1. Three axial MR images per animal were selected. These were then transferred to an external computer for data processing. One ROI (1×10^5 pixels; ~ 1 cm²), corresponding to the liver, was drawn manually for each image (Fig. 2) and corresponding ROIs were analyzed with Mazda software [35] (Mazda 4.6, MRI analysis software, ©1998–2007 by P. M. Szczypinski). Two texture analysis methods were used: gray level histogram (order 1) and co-occurrence matrix (order 2). These methods consisted of selecting patterns on the images which were formed by two pixels in a particular direction at 0° from the horizontal axis. For each ROI, several parameters were calculated (summarized in Table 1) in order to obtain an individual texture profile. An average texture profile was calculated for each animal.

Spectral analysis and quantification

Spectra were analyzed on TopSpin 3.2 (Bruker, Ettlingen, Germany). Following Fourier transformation, line-broadening of 2 Hz was applied. The water residue at 0 ppm was set at δ 4.8 ppm. Manual phasing (zero and first order

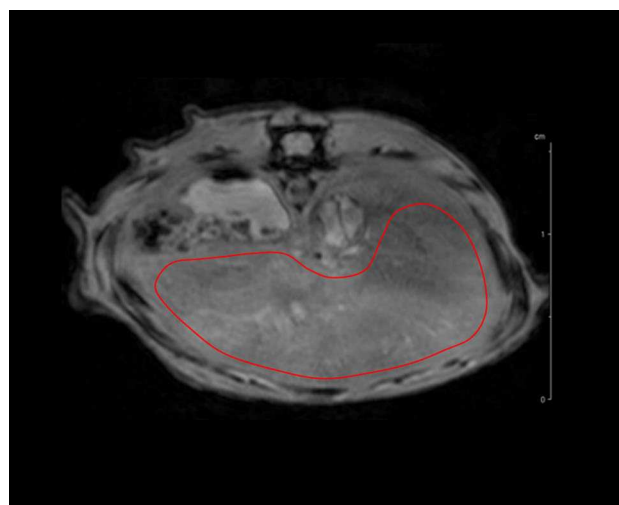


Fig. 2 Axial image proton-density-weighted of control mouse abdomen with a representative region of interest for texture analysis

Table 1 Summary of the texture analysis method and corresponding parameters

Texture analysis method	Texture parameters
Gray level histogram	Mean
	Variance
	Skewness
	Kurtosis
	Perc. 01%
	Perc. 10%
	Perc. 50%
	Perc. 90%
	Perc. 99%
Co-occurrence matrix ($d = 1, \theta = 0^\circ$) With d = distance between the pixel centers in the pattern, and θ = orientation of the pattern	Energy
	Contrast
	Correlation
	Variance
	Homogeneity
	Entropy
	Gray level distribution

phase) and cubic-spline corrections of the baseline were performed. Quantification of the area under peaks was performed in arbitrary units (AU) using the ERETIC digital method (electronic reference to access in vivo concentrations) implemented in TopSpin 3.2. ERETIC digital is a previously calibrated synthetic signal which is added to the spectra in post-processing. Calibration was conducted with the spectrum of a gel phantom of known composition (1% agarose, 5 mM choline in isotonic saline solution) and under the same experimental conditions as those under which liver spectra were acquired. The reference value that was obtained following the calibration was then validated in vitro with a phantom containing choline and D-glucose (1% agarose, 5 mM in isotonic saline solution). Indices of fatty acid composition were calculated based on the literature [32, 36, 37] (see Table 2 and Fig. 6).

Histological analysis

Following MR experiments, mice were killed at 10 weeks using paraformaldehyde (4%) intracardiac perfusion ($n = 3$

or 4/condition). The fixed right lobe of the liver (corresponding to the lobe used for MRS) was cut using a cryostat station (Leica CM 3050) and slices were put in anti-freeze solution (40 mM phosphate-buffered saline, 0.8 mM sodium acid, 4 M glycerol, 5 M glycol ethylene). Before use, slices were rinsed three times with phosphate-buffered saline. Hematoxylin was added for 30 s and rinsed with water. Slices were treated 10 times with acidic alcohol (70% ethanol, 0.25% HCl) and twice with water. Eosin Yellow solution was added for 15 s then ethanol 95% and ethanol 100% were used to dehydrate the slices. Xylene was then added and slices were mounted on glass with Mowiol. Slices were observed with a microscope (at a magnification of 6.3. Hematoxylin–eosin (HE) staining was used to evaluate microvesicular steatosis based on [38]. The presence of microvesicular steatosis is defined by “the presence of non-zonal, contiguous patches of foamy hepatocytes with centrally placed nuclei” assessed under low magnification (4× to 10×).

Statistical methods

Principal component analysis (PCA) (non-parametric model Spearman) was used to compare texture profiles (XLSTAT version 2016.03.31175 ©Addinsoft 1995–2016) of control and exposed groups. Analysis of variance (ANOVA; non-parametric test) was performed on PRESS data for global comparison of interaction of sex and treatment (Kruskall–Wallis with post hoc Dunn) (GraphPad Prism 5.1).

Results

Body weight

Male and female pups were weighed every 2 days from PND28 to PND56. At PND28, female and male mix-DCBPA pups (20.9 ± 1.0 g for M mix-DCBPA and 15.8 ± 1.3 g for F mix-DCBPA) showed no difference in body weight compared to control animals (21.5 ± 1.0 g for M CTR and 17.5 ± 0.8 g for F CTR). Similarly, no difference was observed in pups treated with BPA, 3,5-DCBPA or 3,3'-DCBPA groups. From PND28 to PND56, male and

Table 2 Hepatic fatty acids (FA) index

Index	Calculation	Definition
SC	$\frac{3}{2} \times \frac{L_2}{L_1}$	Saturated component of hepatic FA
TUFI	$\frac{3}{4} \times \frac{L_3}{L_1}$	Total unsaturated FA index: directly proportional to the number of unsaturated FA chains
TUBI	$\frac{3}{2} \times \frac{L_6}{L_1}$	Total unsaturated FA bond index (average of double bonds for the unsaturated FA)
PUBI	$\frac{3}{2} \times \frac{L_5}{L_1}$	Polyunsaturated FA bond index (average of double bonds for the polyunsaturated FA)

female pups treated with BPA or its dichlorinated derivatives achieved a similar weight gain to control groups (Fig. 3a, b).

Texture analysis of liver images obtained through MRI

Hepatic structure was investigated through texture analysis of liver MR images obtained using MRI and principal component analysis was performed. Figure 4 shows the PCA graph obtained for M CTR, M BPA and M mix-DCBPA. Texture profiles of treated males (M BPA, M 3,5-DCBPA, M 3,3'-DCBPA and M mix-DCBPA) did not reveal distinct groups compared to controls. Similar results of textural properties were observed for treated females, indicating no treatment effects at the structural level.

Histological analysis

In addition to the texture analysis of liver MR images, HE staining was performed to ascertain tissue morphology. In

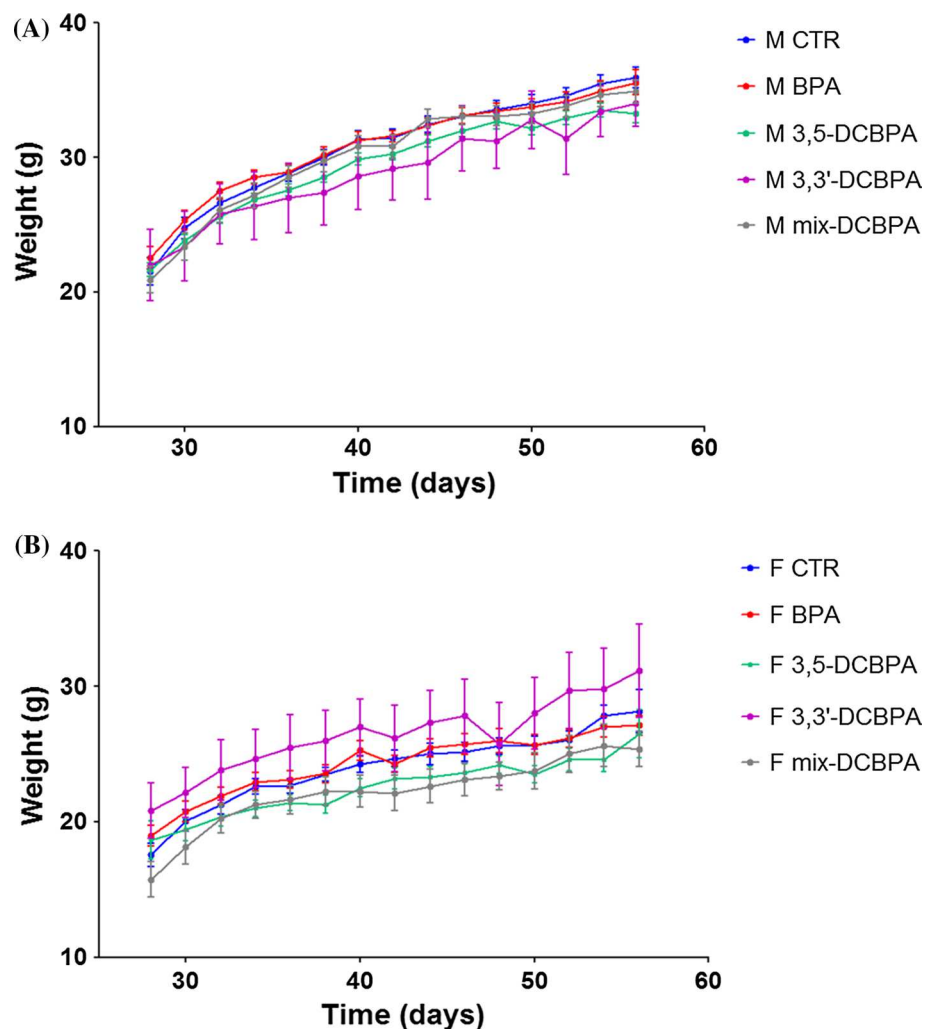
Fig. 5a, representative images of right lobe liver are displayed according to sex and treatments. Figure 5b is a zoom of F mix-DCBPA; it shows hepatic lobules, centro-lobular veins and hepatic cells. In line with the texture analysis of hepatic MR images, hematoxylin–eosin staining showed the absence of microvesicular steatosis in hepatic tissues.

Index of fatty acid composition measured using ^1H MRS

The hepatic fatty acid content was assessed in vivo using ^1H MRS and the parameters calculated are summarized in Table 2. Figure 6 shows the superposition of mouse liver ^1H spectra of male control and male mix-DCBPA.

No variation in the saturated component of hepatic fatty acids (SC) was measured in male or female offspring treated perinatally with BPA, 3,5-DCBPA or 3,3'-DCBPA compared to the control groups. However, SC increased significantly in M mix-DCBPA (+ 20.5%; 11.08 ± 0.84

Fig. 3 Changes in body weight of males (a) and females (b) treated perinatally with control (CTR), 20 $\mu\text{g/kg/day}$ of BPA and dichlorinated derivatives of BPA (3,5-DCBPA and/or 3,3'-DCBPA) from weaning (3 weeks) to MR experiments (7 weeks)



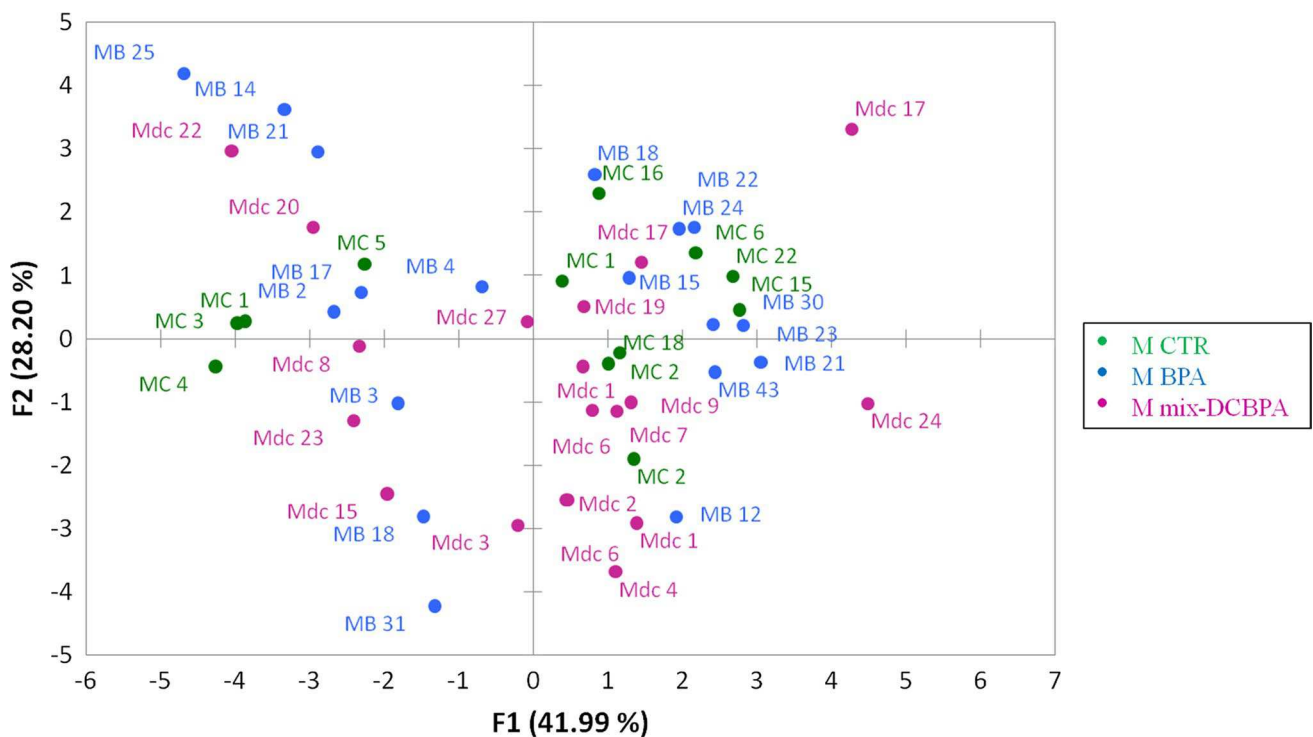


Fig. 4 Principal component analysis of texture parameters obtained from hepatic MR images in 7 week-old males mice perinatally treated with 20 $\mu\text{g/kg/day}$ of control (CTR), BPA and a mixture of dichlorinated BPA (mix-DCBPA)

vs M CTR = 9.19 ± 0.56) and F mix-DCBPA (+ 33.3%; 10.93 ± 1.03 vs F CTR = 8.20 ± 0.65) (Fig. 7a).

Total unsaturated fatty acids index (TUF) tended to increase in M 3,5-DCBPA (+ 24.6%; 0.78 ± 0.07) and M mix-DCBPA (+ 16.1%; 0.72 ± 0.06) compared to M CTR (0.62 ± 0.09), but not in case of BPA or 3,3'-DCBPA treatments. In females, TUF increased significantly only in the F mix-DCBPA group (+ 37.7%; 0.72 ± 0.07 vs F CTR = 0.53 ± 0.05) (Fig. 7b).

An increase in L5 and L6 peaks can be observed in Fig. 6 in line with the variation measured for total unsaturated bond index (TUBI) and polyunsaturated bond index (PUBI). In comparison to controls, M mix-DCBPA showed a significant rise in TUBI (+ 47.2%; 1.42 ± 0.15 vs M CTR = 0.97 ± 0.21) and PUBI (+ 105.9%; 0.73 ± 0.10 vs M CTR = 0.35 ± 0.06). Similarly, F mix-DCBPA displayed an increase in TUBI (+ 28.8%; 1.14 ± 0.15 vs F CTR = 0.88 ± 0.10) and PUBI (+ 76.8%; 0.47 ± 0.07 vs F CTR = 0.27 ± 0.04) (Fig. 7c, d).

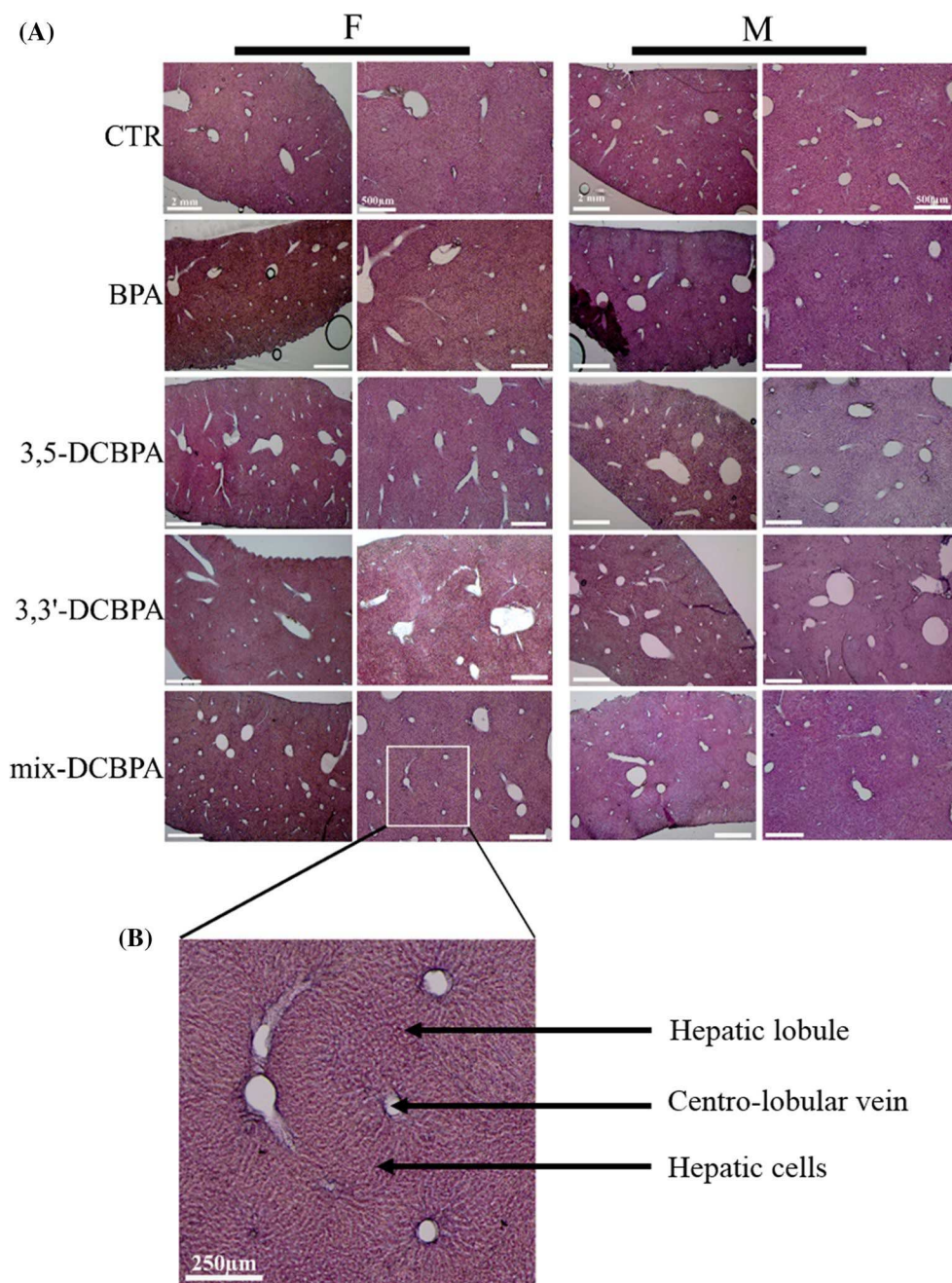
Discussion

The aim of our study was to characterize the hepatic effects of BPA and its dichlorinated derivatives in offspring using both non-invasive MR techniques (MRI and ^1H MRS) and a histological approach.

“Fetal origin of adult disease” is a theory which states that deleterious exposure during intrauterine development can induce pathophysiological disturbances in adulthood, leading to an increased incidence of disease in adult life [22, 39]. In rodents, it was previously demonstrated that BPA could reach the placenta (0.55% of administered BPA; 3.14 ng/g), fetus (4% of administered BPA; 3.7 ng/g), and amniotic fluid (0.34% of administered BPA; 4.85 ng/mL) [40]. Therefore, we focused on perinatal exposure of the liver to BPA and its dichlorinated derivatives. Indeed, the liver is highly involved in the detoxification of BPA into its estrogenic-inactive form BPA-glucuronide by the enzyme UDP glucuronosyltransferase (UGT) [41]. Plasma BPA levels were shown to be similar following oral or subcutaneous exposure in fetuses and neonates given their low endogenous expression of UGT [4, 42]. Based on this observation, pups in our study were exposed through their mothers who were intraperitoneally injected during gestation and lactation.

After breeding, female and male pups perinatally treated with the mixture of dichlorinated BPA exhibit similar body weights to control mice fed a normal caloric diet. Prior to the MR experiments (PND58), the weight gain in the male and female mix-DCBPA groups was similar to that of the control group. Perinatal exposure to BPA and dichlorinated BPA treatments did not disrupt the weight gain of pups. Data from *in vivo* studies have reported contrasting results concerning

Fig. 5 **a** Representative hematoxylin–eosin staining of right lobe liver sections in male (M) and female (F) 10 week-old perinatally treated with control (CTR), 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ of BPA and dichlorinated derivatives of BPA (3,5-DCBPA and/or 3,3'-DCBPA) then observed using photomicroscopy (scale 2 mm and 500 μm); **b** shows insert in F mix-DCBPA

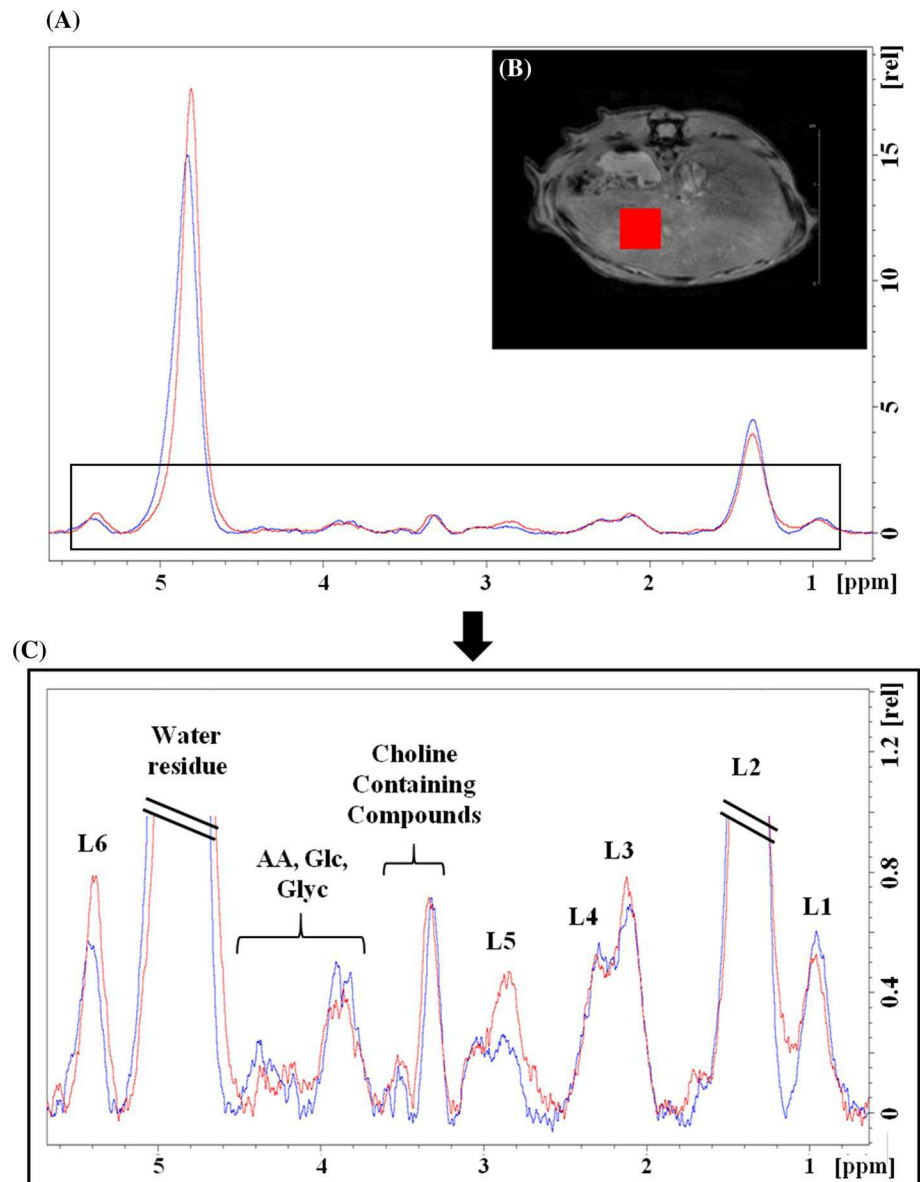


body weight in rodents perinatally exposed to BPA. In line with our study, other research has reported no variation of body weight from weaning to 8 weeks in male and female animals treated perinatally with BPA (dose ranging from 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ to 50 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$) [43–45]. In contrast, xenoestrogen effects of BPA have been shown to involve a rise in body weight of the offspring (reviewed in [46]).

Our focus in this paper was primarily to perform a comparison between dichlorinated derivatives of BPA and the parent compound BPA at an early time point after perinatal exposure. Texture analysis of MR images and hematoxylin–eosin staining did not reveal any structural modification

in offspring treated with BPA or dichlorinated BPA. The BPA-exposed mice were expected to be our positive control group, but it appears, surprisingly, that BPA did not induce structural changes in young adult mice exposed at a low dose and fed with a normal diet. In accordance with the literature, mild hepatic fatty infiltration was present in male offspring of rats exposed to BPA (40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ from G0 to PND21) at the age of 15 weeks, but not at 3 weeks. This effect was even worse at 26 weeks with extensive fatty accumulation and fat vacuoles [23]. It would be of great interest to investigate long-term hepatic structural outcomes following perinatal exposure to dichlorinated BPA.

Fig. 6 **a** Superposition of male control (blue) and male mix-DCBPA (red) mouse liver ^1H spectra; **b** shows the voxel position in liver and **c** shows insert in **a**. The peak assignments are as follows: L1, methyl $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n$ (0.9 ppm); L2, methylene $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n$ (1.3 ppm); L3, Allylic $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$ (2.0 ppm); L4, α methylene to carbonyl $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ (2.25 ppm); L5, Diallylic $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$ (2.80 ppm); L6, Methine $\text{CH}=\text{CH}$ (5.4 ppm); CCC choline containing compounds (3.2 ppm), AA amino acids, *Glc* glucose, *Glyc* glycogen



We also aimed to identify whether dichlorinated derivatives of BPA could induce alterations of lipid metabolism, given there is no animal study exploring the impact on the liver. Perinatal exposure of offspring to mix-DCBPA increased unsaturated FA to a greater extent than saturated FA. This result can be explained by the rise of the medium FA-chain length and the concomitant increase of the fraction of polyunsaturated FA (PUFA). These disturbances were measured in both male and female pups, but it clearly appeared more pronounced in male offspring. Previous animal studies of perinatal exposure to BPA have reported that hepatic effects can be sex-specific and more pronounced in males [47, 48]. This is probably linked to a reduced hepatic detoxification function of UGT in the livers of male rats [49]. The polyunsaturated bond index (PUBI) is a possible infraclinic biomarker of dichlorinated BPA exposure. In the

literature, the rise in the $\Omega 6/\Omega 3$ PUFA ratio is a well-known biomarker of hepatic steatosis caused by the depletion of $\Omega 3$ PUFA, which is induced by decreased fatty acid desaturation, enhanced oxidative stress and/or diet imbalance [50, 51]. In perspective to this work, a further extensive study should be undertaken to explore more specifically the dose and the time dependency, but also the impact of a western diet (high fat and/or high fructose) on hepatic lipid metabolism.

Our ^1H MRS protocol parameters have been based on [32]. Indeed, they performed a PRESS sequence at 7 T to explore lipid composition in the liver. Nevertheless, T2 times of water- and lipid- signals in the hepatic tissue are very short at 7 T. It should be taken into consideration for further research to apply a STEAM sequence with a substantially shorter echo time ($\text{TE} < 5$ ms), which could boost the

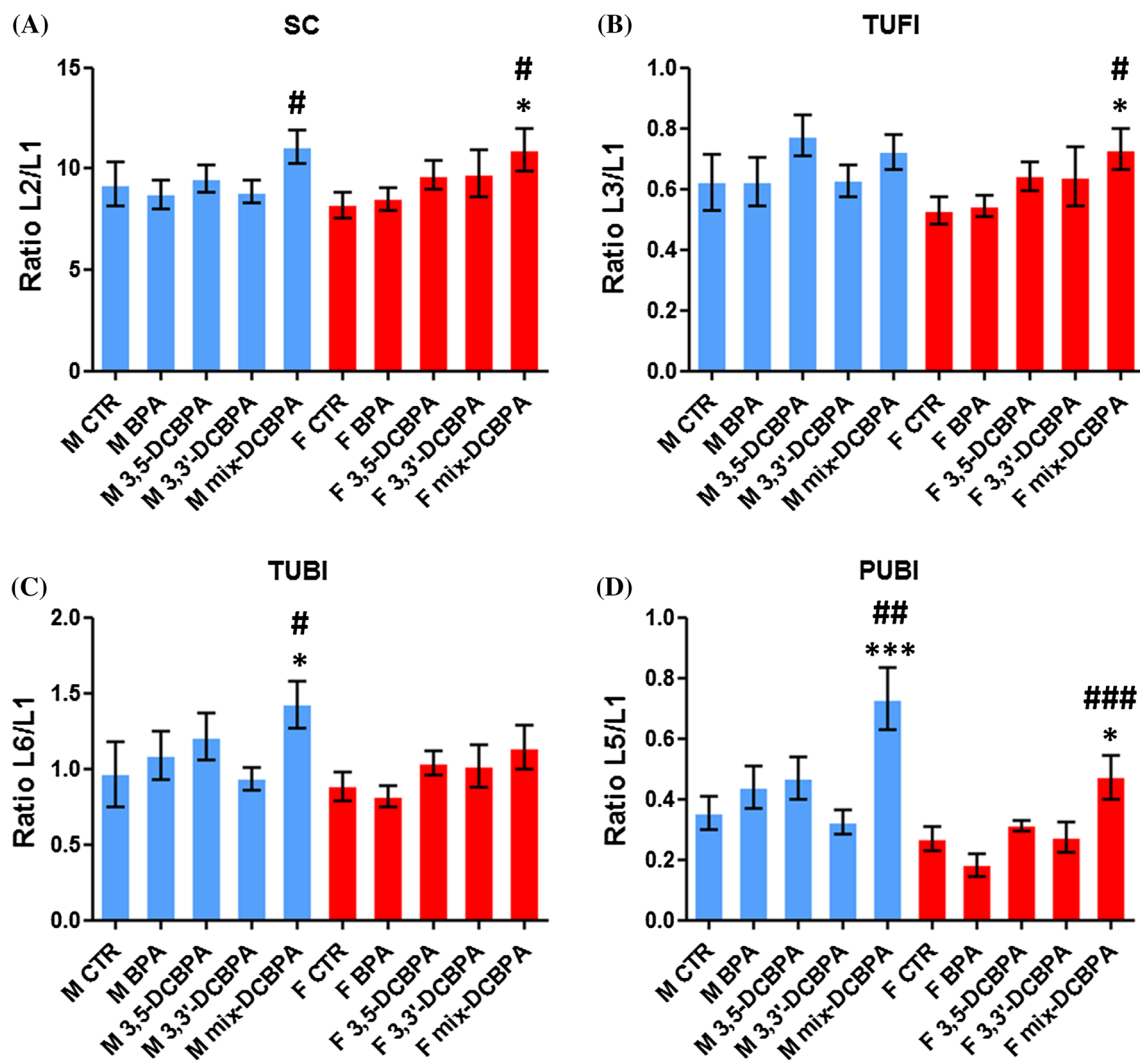


Fig. 7 Index of fatty acid (FA) composition obtained by ^1H MRS in 7 week-old male and female mice perinatally treated with control (CTR), 20 $\mu\text{g/kg/day}$ of BPA and dichlorinated derivatives of BPA (3,5-DCBPA and/or 3,3'-DCBPA): **a** saturated component of FA

(SC); **b** total unsaturated FA index (TUF I); **c** total unsaturated FA bond index (TUB I); **d** polyunsaturated FA bond index (PUB I) (Values are mean $\pm$ SEM). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs CTR. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs BPA

signal-to-noise ratio of the MRS signal and allow for shorter MRS acquisition [52]. Furthermore, assessing the quantity of lipid in the liver using in vivo ^1H MRS is a technique sensitive only to molecules with a high degree of rotational molecular motion. Indeed, lipid resonance observed in spectra arise from the triglycerides in intracellular fat droplets, but lipids in the membrane bilayer are not detectable [53]. In addition to ^1H MRS, gas chromatography might bring insight into qualitative hepatic composition, such as the degree of unsaturation and chain length.

To date, no data are available for dichlorinated BPA and PUFA. However, there are several reports addressing non-conjugated BPA and lipids. For instance, adult rats exposed to BPA (50 mg/kg/day) exhibited an increase in $\Omega 6$ PUFA in testis with an imbalance of antioxidant enzymes (SOD,

GSH and CAT), indicating that oxidative stress occurred [54]. BPA has been shown to elevate fatty acid synthesis. This effect induces a lipid accumulation by interfering with the lipid oxidation pathway in rat hepatic cells [55] or increases gene expression involved in fatty acid synthesis in adult mouse liver [24].

We did not observed any structural or metabolic modifications with separated dichlorinated BPA (3,3'-DCBPA and 3,5-DCBPA). Since the metabolic fate of the two forms of dichlorinated BPA remains unknown at the present time, they might have a different pattern of detoxification pathways and pharmacokinetics. Estrogenic activity of 3,3'-DCBPA would appear to occur at lower concentrations of non-conjugate BPA and trigger non-monotonic effects [5, 56, 57]. 3,3'-DCBPA showed a higher affinity than BPA to

the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) which is involved in energy balance regulation such as lipid accumulation, gluconeogenesis, variation of lipid chain length and degree of saturation [58].

The mixture of dichlorinated derivatives of BPA (3,5-DCBPA and 3',3'-DCBPA) administrated at a low dose (20 $\mu\text{g/kg/day}$; lower than the tolerable daily intake of BPA; 50 $\mu\text{g/kg/day}$) induced alterations of the hepatic lipid composition in young male and female mice prior to any hepatic structural changes. Molecular mechanisms underlying this phenomenon have not been elucidated yet. Further studies are required to corroborate PUFA as a novel early biomarker of perinatal exposure to a mixture of dichlorinated BPA such as RT-qPCR experiments for genes involved in lipogenesis and lipotoxicity. It would be interesting to assess the impact of exposure to different mixtures of chlorinated derivatives of BPA, and also to other xenobiotics, to mimic environmental exposure. Indeed, humans are exposed daily to several pollutants through different routes (oral, inhalation and transdermal). In addition to our study, a longitudinal follow-up will provide information on the role of dichlorinated BPA in metabolic diseases of western societies.

Conclusion

To date, no studies of the effects of dichlorinated BPA on the liver have been published. Using non-invasive MR techniques (MRI and ^1H MRS) and a histological approach, we assessed the precocious outcomes of a perinatal exposure at a low dose of 3,3'-DCBPA and/or 3,5-DCBPA on mice liver. BPA and dichlorinated BPA did not alter hepatic structure in the exposed progeny. A significant increase in polyunsaturated fatty acids was measured by ^1H MRS in animals perinatally treated with the mixture of dichlorinated BPA. This early alteration of lipid metabolism might be an infra-clinic hallmark of the perinatal exposure to the dichlorinated derivatives of BPA. Interestingly, ^1H MRS is a non-invasive technique that could be used for human biomonitoring studies to xenobiotics. Given the rapid rise of metabolic diseases in western societies over the past decades, it might be interesting to identify environmental factors such as exposure to chlorinated BPA derivatives during development.

Acknowledgements We gratefully acknowledge Laurence Turi for her technical support in animal care and Alba Casas Mora who drew the molecules in Fig. 1. The authors declare that there are no conflicts of interest.

Author contributions DE participated in the study design, contributed to data acquisition, analysis, interpretation, and drafted the manuscript. AC was involved in study design, data acquisition, analysis and revising the manuscript. WM supervised the data acquisition, analysis, interpretation and revising the manuscript. MM was involved in interpretation and revising the manuscript. ND was involved in study design, data

collection, funding application and revising the manuscript. SM supervised the data acquisition, analysis, interpretation and was involved in funding application and revising the manuscript.

Funding This work was supported by the Region Centre-Val de Loire (France) (Grant number: no. 201400093609 to SM) and Ligue contre le cancer (France) (to ND).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical statement All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the French Ministry of Agriculture and Forests (Animal Health and Protection Veterinary Service). The protocol has been approved by the local ethics committee "COMETHEA no. 84" (no. 02.160).

References

1. Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR (1998) A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 36(10):2149–2173
2. Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM (2009) Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev* 30(1):75–95
3. Muhamad MS, Salim MR, Lau WJ, Yusop Z (2016) A review on bisphenol A occurrences, health effects and treatment process via membrane technology for drinking water. *Environ Sci Pollut Res* 23(12):11549–11567
4. Kang J-H, Kondo F, Katayama Y (2006) Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 226(2–3):79–89
5. Kuruto-Niwa R, Terao Y, Nozawa R (2002) Identification of estrogenic activity of chlorinated bisphenol A using a GFP expression system. *Environ Toxicol Pharmacol* 12(1):27–35
6. Takemura H, Ma J, Sayama K, Terao Y, Zhu BT, Shimoi K (2005) In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A. *Toxicology* 207(2):215–221
7. Hu J-Y, Aizawa T, Ookubo S (2002) Products of aqueous chlorination of bisphenol A and their estrogenic activity. *Environ Sci Technol* 36(9):1980–1987
8. Yamamoto T, Yasuhara A (2002) Chlorination of bisphenol A in aqueous media: formation of chlorinated bisphenol A congeners and degradation to chlorinated phenolic compounds. *Chemosphere* 46(8):1215–1223
9. Fukazawa H, Hoshino K, Shiozawa T, Matsushita H, Terao Y (2001) Identification and quantification of chlorinated bisphenol A in wastewater from wastepaper recycling plants. *Chemosphere* 44(5):973–979
10. Fan Z, Hu J, An W, Yang M (2013) Detection and occurrence of chlorinated byproducts of bisphenol A, nonylphenol, and estrogens in drinking water of China: comparison to the parent compounds. *Environ Sci Technol* 47(19):10841–10850
11. Zhou Y, Chen M, Zhao F, Mu D, Zhang Z, Hu J (2015) Ubiquitous occurrence of chlorinated byproducts of bisphenol A and nonylphenol in bleached food contacting papers and their implications for human exposure. *Environ Sci Technol* 49(12):7218–7226

12. Andra SS, Charisiadis P, Arora M, van Vliet-Ostaptchouk JV, Makris KC (2015) Biomonitoring of human exposures to chlorinated derivatives and structural analogs of bisphenol A. *Environ Int* 85:352–379
13. Fernandez MF et al (2007) Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol Elmsford N* 24(2):259–264
14. Jiménez-Díaz I et al (2010) Determination of Bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 878(32):3363–3369
15. Cariot A, Dupuis A, Albouy-Llaty M, Legube B, Rabouan S, Migeot V (2012) Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human breast milk using UPLC–MS/MS method. *Talanta* 100:175–182
16. Migeot V, Dupuis A, Cariot A, Albouy-Llaty M, Pierre F, Rabouan S (2013) Bisphenol A and its chlorinated derivatives in human colostrum. *Environ Sci Technol* 47(23):13791–13797
17. Liao C, Kannan K (2012) Determination of free and conjugated forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Environ Sci Technol* 46(9):5003–5009
18. Venisse N et al (2014) Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human urine using UPLC–MS/MS method. *Talanta* 125:284–292
19. Chen M et al (2016) Occurrence and maternal transfer of chlorinated bisphenol A and nonylphenol in pregnant women and their matching embryos. *Environ Sci Technol* 50(2):970–977
20. vom Saal FS, Nagel SC, Coe BL, Angle BM, Taylor JA (2012) The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Mol Cell Endocrinol* 354(1–2):74–84
21. Chevalier N, Fénelon P (2015) Endocrine disruptors: new players in the pathophysiology of type 2 diabetes? *Diabetes Metab* 41(2):107–115
22. Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal A (2015) Prenatal exposure to BPA and offspring outcomes: the diabetogenic behavior of BPA. *Dose-Resp* 13(2):1559325815590395
23. Jiang Y et al (2014) Mitochondrial dysfunction in early life resulted from perinatal bisphenol A exposure contributes to hepatic steatosis in rat offspring. *Toxicol Lett* 228(2):85–92
24. Marmugi A et al (2012) Low doses of bisphenol a induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology* 55(2):395–407
25. Begrich K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B (2006) Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 6(1):1–28
26. Yu H et al (2015) Utility of texture analysis for quantifying hepatic fibrosis on proton density MRI: hepatic fibrosis on proton density MRI. *J Magn Reson Imaging* 42(5):1259–1265
27. Yokoo T et al (2015) Evaluation of liver fibrosis using texture analysis on combined-contrast-enhanced magnetic resonance images at 3.0 T. *Biomed Res Int* 2015:1–12
28. Wu Z et al (2015) Hepatitis C related chronic liver cirrhosis: feasibility of texture analysis of mr images for classification of fibrosis stage and necroinflammatory activity grade. *PLoS One* 10(3):e0118297
29. Wang D, Li Y (2015) 1H magnetic resonance spectroscopy predicts hepatocellular carcinoma in a subset of patients with liver cirrhosis: a randomized trial. *Medicine (Baltimore)* 94(27):e1066
30. Zhang L, Zhao X, Ouyang H, Wang S, Zhou C (2016) Diagnostic value of 3.0T 1H MRS with choline-containing compounds ratio (ΔCCC) in primary malignant hepatic tumors. *Cancer Imaging* 16(1):25
31. Bohte AE, van Werven JR, Bipat S, Stoker J (2011) The diagnostic accuracy of US, CT, MRI and 1H-MRS for the evaluation of hepatic steatosis compared with liver biopsy: a meta-analysis. *Eur Radiol* 21(1):87–97
32. Ramamonjisoa N et al (2013) In vivo hepatic lipid quantification using MRS at 7 Tesla in a mouse model of glycogen storage disease type 1a. *J Lipid Res* 54(7):2010–2022
33. Cobbold JFL et al (2010) Hepatic lipid profiling in chronic hepatitis C: an in vitro and in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. *J Hepatol* 52(1):16–24
34. Herlidou S, Rolland Y, Bansard JY, Le Rumeur E, de Certaines JD (1999) Comparison of automated and visual texture analysis in MRI: characterization of normal and diseased skeletal muscle. *Magn Reson Imaging* 17(9):1393–1397
35. Szczypiński PM, Strzelecki M, Materka A, Klepaczek A (2009) MaZda—a software package for image texture analysis. *Comput Methods Progr Biomed* 94(1):66–76
36. Corbin IR, Furth EE, Pickup S, Siegelman ES, Delikatny EJ (2009) In vivo assessment of hepatic triglycerides in murine non-alcoholic fatty liver disease using magnetic resonance spectroscopy. *Biochim Biophys Acta Bba Mol Cell Biol Lipids* 1791(8):757–763
37. van Werven JR, Marsman HA, Nederveen AJ, ten Kate FJ, van Gulik TM, Stoker J (2012) Hepatic lipid composition analysis using 3.0-T MR spectroscopy in a steatotic rat model. *Magn Reson Imaging* 30(1):112–121
38. Tandra S et al (2011) Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 55(3):654–659
39. Barker DJP (1998) In utero programming of chronic disease. *Clin Sci* 95(2):115
40. Zalko D et al (2003) Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect* 111(3):309–319
41. Pritchett JJ, Kuester RK, Sipes IG (2002) Metabolism of bisphenol A in primary cultured hepatocytes from mice, rats, and humans. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* 30(11):1180–1185
42. Taylor JA, Welshons WV, Vom Saal FS (2008) No effect of route of exposure (oral; subcutaneous injection) on plasma bisphenol A throughout 24 h after administration in neonatal female mice. *Reprod Toxicol* 25(2):169–176
43. Patel BB, Di Iorio M, Chalifour LE (2014) Metabolic response to chronic bisphenol A exposure in C57bl/6n mice. *Toxicol Rep* 1:522–532
44. Angle BM et al (2013) Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA): evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation. *Reprod Toxicol Elmsford N* 42:256–268
45. Alonso-Magdalena P et al (2010) Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ Health Perspect* 118(9):1243–1250
46. Rubin BS, Soto AM (2009) Bisphenol A: perinatal exposure and body weight. *Mol Cell Endocrinol* 304(1–2):55–62
47. Strakovsky RS et al (2015) Developmental bisphenol A (BPA) exposure leads to sex-specific modification of hepatic gene expression and epigenome at birth that may exacerbate high-fat diet-induced hepatic steatosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 284(2):101–112
48. Galyon KD, Farshidi F, Han G, Ross MG, Desai M, Jellyman JK (2016) Maternal bisphenol A exposure alters rat offspring hepatic and skeletal muscle insulin signaling protein abundance. *Am J Obstet Gynecol* 216(3):290.e1–e9
49. Shibata N, Matsumoto J, Nakada K, Yuasa A, Yokota H (2002) Male-specific suppression of hepatic microsomal UDP-glucuronosyl transferase activities toward sex hormones in the adult male rat administered bisphenol A. *Biochem J* 368(3):783–788

50. Araya J et al (2004) Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid $n - 6/n - 3$ ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci* 106(6):635–643
51. Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J (2004) Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med* 37(9):1499–1507
52. Gajdošík M et al (2014) In vivo relaxation behavior of liver compounds at 7 tesla, measured by single-voxel proton MR spectroscopy: relaxation of liver compounds at 7 T. *J Magn Reson Imaging* 40(6):1365–1374
53. Williams E, Hamilton JA, Jain MK, Allerhand A, Cordes EH, Ochs S (1973) Natural abundance carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of the canine sciatic nerve. *Science* 181(4102):869–871
54. Chen M et al (2012) Bisphenol A alters n-6 fatty acid composition and decreases antioxidant enzyme levels in rat testes: a LC-QTOF-Based metabolomics study. *PLoS One* 7(9):e44754
55. Grasselli E et al (2013) Direct effects of Bisphenol A on lipid homeostasis in rat hepatoma cells. *Chemosphere* 91(8):1123–1129
56. Fukazawa H et al (2002) Formation of chlorinated derivatives of bisphenol A in waste paper recycling plants and their estrogenic activities. *J Heal Sci* 48(3):242–249
57. Viñas R, Goldblum RM, Watson CS (2013) Rapid estrogenic signaling activities of the modified (chlorinated, sulfonated, and glucuronidated) endocrine disruptor bisphenol A. *Endocr Disrupt* 1(1):e25411
58. Riu A et al (2011) Characterization of novel ligands of ER, Er, and PPAR: the case of halogenated bisphenol A and their conjugated metabolites. *Toxicol Sci* 122(2):372–382

Evaluation quantitative par IRM et ^1H SRM de l'exposition à des xénobiotiques chez le petit animal dans un contexte clinique et environnemental

L'Imagerie et la Spectroscopie par Résonance Magnétique du proton (IRM et ^1H SRM) sont des méthodes innovantes en toxicologie. Ces outils permettent l'évaluation de l'impact des xénobiotiques *in vivo* au niveau structural et métabolique respectivement. Dans cette perspective, les travaux de cette thèse ont été réalisés sur deux modèles murins : (i) des injections répétées de gadodiamide chez le rat entraînant une accumulation de gadolinium dans les noyaux profonds cérébelleux (NCP) ; (ii) une exposition à faible dose (20 $\mu\text{g/kg/jour}$) pendant la gestation et la lactation au bisphénol A (BPA) et à ses dérivés chlorés qui sont des perturbateurs endocriniens.

L'étude des effets des injections répétées du gadodiamide a montré un rehaussement du signal des NCP sur des images pondérées T1 à 6 et 11 semaines post-injections. De manière inédite, il a été mis en évidence que le rehaussement du signal des NCP se maintient jusqu'à 1 an post-injections. Il a été également mesuré une augmentation prolongée de la concentration de créatine totale dans les NCP par la méthode de quantification ERETIC digital. Néanmoins, cette variation n'a pas été confirmée par les autres méthodes de quantification conventionnelles (jMRUI et LCModel). Une comparaison des méthodes de quantification en ^1H SRM (ERETIC digital, jMRUI et LCModel) a été réalisée afin de mettre en évidence l'influence de la correction de la ligne de base dans le traitement des spectres ^1H *in vivo*.

Des perturbations précoces des dérivés chlorés du BPA ont été quantifiés chez les jeunes souris mâles et femelles exposées pendant la période périnatale : (i) des modifications de la composition lipidique hépatique, et cela préalablement à tout changement structural ; (ii) des altérations microstructurales et métaboliques au niveau de l'hippocampe. Une méthode de diffusion spectroscopique a été optimisée puis des expériences *in vivo* ont été effectuées afin de caractériser ces anomalies de l'intégrité intracellulaire dans le cerveau des souris mâles.

Mots clés : IRM ; SRM ; agent de contraste ; gadodiamide ; cervelet ; BPA ; foie ; hippocampe.

Quantitative assessment by MRI and ^1H MRS of xenobiotics exposure in small animal within a clinical and environmental context

Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy (MRI and ^1H MRS) are new methods in toxicology. These tools allow the assessment of the impact of xenobiotics at structural and metabolic levels respectively. In this perspective, this thesis presents two studies in animal models: (i) repeated administrations of linear gadolinium-based contrast agent (gadodiamide) in rat leading to a deposition of gadolinium in deep cerebellar nuclei (DCN); (ii) gestational and lactational exposure to bisphenol A (BPA) and its chlorinated derivatives at low dose (20 $\mu\text{g/kg/day}$) which are endocrine disruptors.

The study of repeated injections of gadodiamide showed a hypersignal of DCN on T1-weighted images at 6 and 11 weeks post-injections. In an unprecedented way, it was demonstrated that the hypersignal of DCN persisted for 1 year post-injections. A prolonged increase of total creatine concentration in DCN was also measured by the quantitation ERETIC digital method. Nevertheless, this variation was not confirmed by other conventional quantitation methods (jMRUI and LCModel). A comparison of quantitation methods in ^1H MRS (ERETIC digital, jMRUI and LCModel) was performed in order to elucidate the influence of baseline correction in the processing of *in vivo* ^1H spectra.

Early disturbances caused by chlorinated derivatives of BPA were quantified in young male and female mice perinatally exposed: (i) modifications of hepatic lipid composition which precedes any structural change; (ii) microstructural and metabolic alterations in the hippocampus. A spectroscopic diffusion method was optimized, leading to *in vivo* experiments in order to characterize those abnormalities of intracellular integrity in the brain of male mice.

Keywords: MRI; MRS; contrast agent; gadodiamide; cerebellum; BPA; liver; hippocampus.