



**HAL**  
open science

# Capture cérébrale de chélates de gadolinium : imagerie multimodale et analyse des conséquences neurotoxicologiques

Marlène Rasschaert

► **To cite this version:**

Marlène Rasschaert. Capture cérébrale de chélates de gadolinium : imagerie multimodale et analyse des conséquences neurotoxicologiques. Sciences pharmaceutiques. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS049 . tel-02294184

**HAL Id: tel-02294184**

**<https://theses.hal.science/tel-02294184>**

Submitted on 23 Sep 2019

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

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

# Capture cérébrale de chélates de gadolinium : imagerie multimodale et analyse des conséquences neurotoxicologiques

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°571 Sciences chimiques : molécules, matériaux,  
instrumentation et biosystèmes (2MIB)  
Spécialité de doctorat: Chimie

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 11 Février 2019, par

**Marlène Rasschaert**

## Composition du Jury :

Dr Florence Mahuteau-Betzer Directrice de Recherche CNRS, Institut Curie – UMR9187, U1196	Président du jury
Pr Clotilde Policar Professeur, Ecole Normale Supérieure, Paris – UMR7203	Rapporteur
Pr Olivier Clément PU-PH, Service de Radiologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris	Rapporteur
Pr Eric Jouvent PU-PH, Service de Neurologie, Centre hospitalier Lariboisière, Paris – UMRS1161	Examineur
Pr Jean-Pierre Laissy PU-PH, Service de Radiologie Ostéo-articulaire, Centre hospitalier Lariboisière, Paris – U1148	Examineur
Dr Jean-Luc Guerquin-Kern CRHC, Institut Curie – UMR9187, U1196	Directeur de thèse
Dr Jean-Marc Idée Pharmacologue senior, Guerbet – Division Recherche & Innovation, Aulnay-sous-Bois	Invité



# Remerciements

Je remercie vivement les Prs Clotilde Policar et Olivier Clément, pour avoir accepté le rôle de rapporteurs (impliquant la lecture scrupuleuse de ce pavé), ainsi que les Prs Florence Mahuteau, Marc Port, Eric Jouvent et Jean-Pierre Laissy, pour avoir accepté de juger mes travaux. C'est un honneur pour moi de tous vous compter parmi mon jury de thèse.

Je vous présente par avance mes excuses pour les éventuelles coquilles qui se seront glissées, ainsi que pour les presque 800 occurrences du mot « Gd ».

Ces trois années, passées à une allure folle, auront compté parmi les plus importantes de ma vie. Alors que cette période touche à sa fin, il est temps de remercier les personnes qui m'ont accompagnée dans cette aventure.

Je tiens tout d'abord à remercier Claire Corot, notre brillante directrice de la recherche de Guerbet, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de ses équipes. Merci à Sébastien, puis Aymeric lui ayant succédé, pour leur confiance et leurs encouragements.

Un énorme MERCI à mes directeurs de thèse, Jean-Marc Idée et Jean-Luc Guerquin-Kern, à qui je dois énormément.

Jean-Marc, toi qui as eu le courage de réitérer l'expérience, en me proposant cette thèse quelques années après mon passage au laboratoire en tant que stagiaire ! Tu auras su me communiquer ton amour de ce monde de fou qu'est la recherche. Merci pour ta présence, ta disponibilité, ton soutien, tes conseils et encouragements au quotidien, surtout quand « Tout s'arrange, mais mal ». Tu m'auras énormément appris, aussi bien par tes connaissances scientifiques impressionnantes, que tes sujets de conversation riches et inépuisables. Tu as également ma reconnaissance pour nous avoir supportées, parce qu'avec tous ces ouistitis (picardo-bretonno-versaillaises et j'en passe), c'est vrai que la condition masculine est difficile au GAPTO... Mais souviens-toi, les héros sont toujours seuls.

Un grand merci à toi Jean-Luc, pour ton aide précieuse tout au long de la thèse, qu'elle soit technique ou relevant de la compréhension du monde magique des sciences dures. Merci pour ta patience face à mon entêtement sans limite, ta minutie (on ne reparlera pas de la crise de la paillette propulsée par terre) et ton côté bricoleur de l'extrême. Merci pour ces pauses café à refaire le monde, tes jeûnes d'une semaine et ton ascension scotchante des marches ... tu m'étonneras toujours !

Merci à la team Curie : Sergio, pour sa générosité, son énergie et ses idées débordantes. Sylvain et Cédric, pour leur sympathie et leur aide avec la microscopie électronique. Ting Di pour sa gentillesse, son expertise du NanoSIMS, son rire communicatif et ses délicieux nougats. Sophie pour son aide sur la plateforme d'histologie. Et enfin Amandine, ma copine de thèse, de bubble tea et de jérémiades.

Je tiens à remercier Andréa et Kadda, pour nous avoir accueillis les week-ends à SOLEIL, mon Gado et moi, alors que nous débarquions un peu de nulle part. Merci pour votre sympathie, votre joie de vivre et votre disponibilité. Une mention spéciale à Kadda, pour ton aide et ta patience. M'apprendre à coder et utiliser MatLab, et me faire comprendre les subtilités de la XRF, ce n'était pas gagné !





I would like to address my gratitude to Josef Schroeder and Christoph Brochhausen for allowing me to realize this beautiful electron microscopy study in Regensburg. I thank Christoph for his kindness and his warm welcome. Many thanks to Josef for communicating his passion, for his expertise, his patience (No milk today!), and for his precious help in the understanding of the images. I would like to thank Heiko Siegmund, aka « Bob der Baumeister », and discrete Claudia Fischer, for their efficacy, their kindness, and these delicious snacks during these two weeks in Germany.

Un grand merci à Karine Cambon, pour ses précieux conseils en comportement et neurologie, pour son accueil au sein de MIRCen et sa gentillesse. Merci également à Julien Mitja pour sa patience et ses astuces sur la plateforme comportementale, ainsi qu'à Julien Flament et Julien Valette, pour le temps qu'ils ont consacré à la réalisation de la spectroscopie RMN.

Je tiens à remercier le Pr Mario Manto pour ses dons de pédagogie en neurologie, et son aide à la compréhension de ce bien complexe cervelet. J'ai beaucoup apprécié la période pendant laquelle nous avons pu échanger.

J'adresse mes remerciements à Dominique Meyer et Joël Mispelter, pour leurs précieux éclaircissements sur les notions de physique de l'IRM. Merci à Dominique pour ces nombreux échanges toujours inspirants autour de la chimie des chélates de Gd.

I would like to thank Prof. Taoka for fruitful discussions.

I sincerely thank Prof. Weller for his kindness and for sharing his knowledge of the fluid circulation in the brain, which was very helpful.

J'adresse mes remerciements à Adeline Mallet, pour sa gentillesse, son aide et sa disponibilité, le temps de la réalisation de la microscopie à balayage, ainsi qu'à Claire Bologne et Cynthia Gillet pour leur accueil et leur tentative de caractérisation de nos échantillons par EDS.

Je tiens également à remercier Jean-Pierre Laissy pour sa disponibilité et ses encouragements, en tant que légendaire membre externe de mon comité de suivi de thèse.

Je remercie nos amis chimistes du 2<sup>e</sup> étage, pour leur disponibilité et leur aide. Merci notamment à Caroline, Olivier et William pour le partage de leurs connaissances du Gd et pour la synthèse de produit deutéré, dont l'étude ne sera malheureusement pas réalisée à temps pour l'inclure dans cette thèse. Merci à Marie pour son aide sur le relaxomètre.

Merci à Gaëlle et Claire, du pôle bio-analyse, pour leur gentillesse et pour avoir réalisé les dosages de Gd, avec une précision et minutie relevant presque de la maniaquerie. Merci à Cécile et Izabela, pour leur sympathie et les échanges intéressants que nous avons pu avoir.

Je tiens à remercier tout particulièrement Manon, Andréa, Anne-Laure et Alice : mes stagiaires exploitées, sans qui tout ce travail n'aurait pas été réalisable. Un grand merci à :

- ❖ Manon, admirable par sa culture gé et sa philosophie, ainsi que pour ses tentatives gélifiées d'élucidation d'un effet T2\* du GdPO<sub>4</sub>, auxquelles nous n'avons malheureusement pas donné suite.



- ❖ Andréa, sa douce discrétion et taquinerie, et son amour de la pâtisserie, qui a mené avec brio l'expérimentation du deuxième article.
- ❖ Alice, qui s'est acharnée sur la deuxième étude comportementale, pour sa sympathie, sa bonne humeur (quand elle ne ronchonne pas :p), et son adorable côté bisounours. Je garderai notamment en tête notre soirée Fnac Live mémorable avec Joé, que je remercie également pour sa personnalité étonnante et pour m'avoir bien fait rire.
- ❖ Anne-Laure et son acolyte Agnès, avec qui nous avons monté la plateforme de comportement, à coups de détours chez Castorama et à la force de leurs petits bras (on se souviendra notamment d'un remplissage de la piscine au seau d'eau et à la bouilloire, ainsi que de son vidage une fois le lait en poudre devenu vert et dégageant une odeur de chaussette moisie). Vous avez toute mon admiration (ainsi qu'Alice) pour votre patience légendaire, quand il s'agissait de passer tous vos après-midi avec des rats complètement idiots qui ne comprenaient rien...

Oui oui, je suis démasquée, comme vous le comprenez mon travail aura consisté en la formation et le management de stagiaires exploitées, et du harcèlement d'experts... Mea culpa !

J'adresse mes remerciements à Philippe, pour ses conseils et son soutien au quotidien, de près ou de loin. Merci pour ces discussions et débats toujours des plus intéressants, notamment accompagnés de tapas ou d'un verre. Puisse cela ne jamais changer, alors que le grand torrent de la vie me mène à ton équipe !

Un milliard de mercis à toi, Nathalie. Merci merci merci merci merci merci merci [...]. Tu es passée de ma maîtresse de stage, à ma partenaire de bêtises et ma confidente. Merci d'avoir répondu présent, alors que je venais frapper à ta porte pour te demander de l'aide ou un renseignement, environ 12 fois par jour. On trouvera difficilement une fille plus adorable que toi sur cette Terre. Tu as été là pour me former, m'épauler, m'écouter, me remonter le moral, et as fait de la solidarité des GAPtettes une arme sans faille. Pourvu que l'on continue à travailler ensemble pendant de nombreuses années ! [...] merci merci merci merci merci.

Et alors Anne-Laure, que dire de plus sur toi, ma pauvre fille... C'était pas gagné, débarquant avec ton air Versaillais et ton style teen bobo. Mais déjà presque 2 ans qu'on se supporte au final, et ça ne se passe pas trop mal. Ton « penchant » avoué pour le houblon et ton humour douteux ont dû avoir raison de moi. Oui bon d'accord, j'avoue, tu as carrément égayé mon quotidien pendant ces dernières années de thèse. Oui, « trop d'amour » me diras-tu, mais rien n'aurait été pareil sans toi, et rien ne le sera plus quand tu t'en iras vers d'autres horizons, sniff. Je te remercie tout particulièrement pour le temps où tu m'as hébergée, alors que j'étais réduite au statut de SDF. J'ai beaucoup aimé cette période de vie en troupe. Trop hâte de partir à la découverte des lamas rampants en Bolivie avec toi.

Un grand merci à Véro, pour m'avoir formée à l'utilisation de l'IRM, avoir mis en place avec moi le prélèvement de LCR en stéréotaxie. Merci pour ton amitié, ta bêtise infinie, ces jours d'initiation au comportement, avec Bouddah et gros Mammouth ?... flottant telles de gros poissons Fugu, et tous ces fous rires encore à venir !

Merci également à Justine, pour sa joie de vivre, sa vision bisounours et ses distributions de câlins réconfortants.



Une petite pensée à Meryam, partenaire de notre duo de choc, pour avoir fait de mes 6 premiers mois chez Guerbet en tant que bébé stagiaire, 6 mois des plus agréables, où l'entraide, la zumba, les fous rires et confidences régnaient. Si je n'avais pas passé ce stage avec toi, peut-être n'aurais-je pas eu un si bon souvenir de Guerbet et eu envie de revenir parmi ces fous.

Je tiens à remercier Maud et Valérie, nos secrétaires toujours souriantes et adorables. Merci Maud pour ton écoute, ta sincérité et ta sensibilité. Valérie, pour ton humour inégalable.

Merci à Julien et Leila de la Propriété Intellectuelle pour leur sourire et leur gentillesse.

Je remercie également Véronique et Patricia, pour leur écoute et leur sympathie.

Je remercie nos chers animaliers pour leur aide précieuse au sein de ce fameux bâtiment Q... Jean-Philippe pour être ce bon vivant aux plaisirs simples, et pour sa culture de fou (cet homme a Wikipédia dans la tête, si si !). Simon pour ta nonchalance adorable, tes taquineries qui me font bien rire, et pour avoir fait le concours du plus grand râleur des temps avec moi.

J'adresse mes remerciements à toute l'équipe du PRIB, dans lequel je vais bientôt venir semer la pagaille héhéhé. Merci à Silvia, pour sa sympathie, ses bons plans, son côté aventurière qui fait rêver, et cette fatigue de naissance que l'on partage; Anne, pour sa culture et son amour de l'art ; Walter, pour sa gentillesse et son humanité ; Xavier pour sa zenitude et son caractère taquin. Merci à Emilie pour son énergie, et son amour de -M- et Juju ; à Claire, pour sa gentillesse, ses bons conseils et ses vieux petits carnets de notes précieux ; à Robin pour son ouverture d'esprit, et sa capacité à nous faire voyager au travers de ses photos et histoires ; à Elisabeth pour ses blagues toutes mignonnes et son côté maman poule. Je tiens à remercier tout particulièrement Miguel pour son humour de blagues à papa, son sens de l'organisation qu'il met au service de tous, et pour son talent de dessinateur, que vous aurez la chance de retrouver sur mon magnifique schéma bilan ! (Pssst, pas de spoil, vous le découvrirez en temps voulu).

J'espère n'avoir oublié personne.

Je tiens à m'excuser pour tous ces moments de râlerie et de nonchalance qui m'auront échappés pendant ces dures années de labeur. Promis, à partir de maintenant je ne serai que rayon de soleil, j'essaierai de prendre le temps de ranger et nettoyer mes labo et bureau, de mettre des gants pour toucher mes ratous, et d'en changer pour taper sur l'ordi... Tout ça tout ça :p. Oui oui, on y croit !

Pour finir, je souhaite remercier vivement mes parents, ma famille et mes amis, pour m'avoir soutenue tout au long de ces 3 ans. Une pensée particulière à ma petite mamie. A mes copains de thèse et de galères, qui se reconnaîtront. Je tiens à remercier Simon, qui m'a toujours poussée à me dépasser, et sans les encouragements de qui je ne me serais sans doute pas lancée dans l'aventure. Un énorme merci à Amandine, qui m'a écoutée me plaindre pendant des années le mercredi soir à la piscine, m'a encouragée et a toujours été là. Enfin, merci à Gwendal, pour son écoute, sa patience et sa grosse contribution (morale et nutritive) à ma survie lors de la dernière ligne droite.







# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>13</b>
<b>PARTIE I : INTRODUCTION AU CONTEXTE ET AU SUJET DE LA THESE</b>	<b>16</b>
<b>CHAPITRE 1 : PRINCIPES DE L'IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE ET DES AGENTS DE CONTRASTES EN IRM</b>	<b>16</b>
A. PRINCIPES ET FONCTIONNEMENT DE L'IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE	16
1. Introduction	16
2. RMN et notion de spin	16
3. Composantes longitudinales et transversales de l'aimantation	18
4. Relaxation $T_1$ et $T_2$	19
5. Inhomogénéités de champ et $T_2^*$	19
6. Temps de relaxation et imagerie tissulaire	20
7. Pondération des séquences et notions de $T_R$ et de $T_E$	21
B. CONTRIBUTION DES AGENTS DE CONTRASTE AU SIGNAL EN IRM	22
1. Eléments paramagnétiques et agents de contraste en IRM	22
2. Les complexes de gadolinium	24
3. Chélates de gadolinium et relaxation : mécanisme d'action	24
4. Relaxivité : efficacité des chélates de gadolinium en IRM	27
5. Le Gadolinium : Un effet $T_1$ majoritaire ?	28
6. Relaxivité et champ magnétique	28
7. L'injection de chélates de Gadolinium, dans quels cas ?	29
<b>CHAPITRE 2 : CHIMIE DES COMPLEXES DE GADOLINIUM</b>	<b>30</b>
A. DECOUVERTE ET UTILISATION DES LANTHANIDES ET DU GADOLINIUM	30
B. LES DIFFERENTS CHELATES DE GADOLINIUM	30
1. Structure moléculaire des chélates de gadolinium	30
2. Spécificité des différents chélates commercialisés	31
C. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES CHELATES DE GD	33
1. La viscosité	33
2. L'osmolalité	33
3. La stabilité thermodynamique	33
4. La stabilité cinétique	34
5. Lien entre structure moléculaire et stabilité des chélates	37
6. Le phénomène de transmétallation : une histoire de compétition entre métaux	38
D. PHARMACOCINETIQUE ET DISTRIBUTION	39
<b>CHAPITRE 3 : TOXICOLOGIE DU GADOLINIUM ET DE SES CHELATES</b>	<b>41</b>
A. TOXICITE DES LANTHANIDES	41
B. TOXICITE DU $Gd^{3+}$ DOCUMENTEE PAR L'ETUDE DU CHLORURE DE GD, LE $GdCl_3$	42
C. TOXICITE AIGÛE DES CHELATES DE GADOLINIUM	42
1. Dose létale 50%	42
2. Effets cardiovasculaire, hémodynamique et rénal	43
3. Effets indésirables et réactions d'hypersensibilité	43
D. TOXICITE CHRONIQUE DES CHELATES DE GD	44
1. Etudes de toxicologie réglementaires	44
2. Effets toxiques des chélates de Gd occasionnellement observés	45
3. La Fibrose Systémique Néphrogénique : une première crise sanitaire	46
<b>CHAPITRE 4 : INTRODUCTION A LA CAPTURE CEREBRALE DES CHELATES DE GD</b>	<b>51</b>
A. DONNEES CLINIQUES CONCERNANT LA CAPTURE CEREBRALE DES CHELATES DE GD	51



<b>CHAPITRE 1 : ANATOMIE ET METAUX ENDOGENES DES NOYAUX CEREBELLEUX PROFONDS ET DU <i>GLOBUS PALLIDUS</i></b>	<b>57</b>
A. <i>GLOBUS PALLIDUS</i>	57
B. LES NOYAUX CEREBELLEUX PROFONDS ET LE CERVELET	57
C. DES STRUCTURES RICHES EN METAUX ENDOGENES	59
<b>CHAPITRE 2 : LES DIFFERENTES FORMES D'ACCUMULATIONS POSSIBLES DU GD</b>	<b>62</b>
<b>CHAPITRE 3 : ETUDE DE L'ACCUMULATION DE GD DANS LES TISSUS CEREBRAUX : PRINCIPES PHYSIQUES D'ANALYSE</b>	<b>64</b>
A. RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE ET RELAXIVITE	64
B. LA SPECTROMETRIE DE MASSE	65
C. INTERACTION D'UN FAISCEAU D'ENERGIE AVEC LA MATIERE	66
1. Analyse de la perte d'énergie	67
2. Analyse de la fluorescence X	67
<b>TRAVAUX PERSONNELS</b>	<b>69</b>
A. COMPARAISON DE LA CAPTURE CEREBRALE DE GADOLINIUM CHEZ LE RAT SAIN ET LE RAT INSUFFISANT RENAL (PUBLICATION 1)	69
1. Analyse rationnelle	69
2. Méthodes	71
3. Synthèse des résultats	83
B. COMPARAISON DE L'ACCUMULATION DE CHELATES DE GD CHEZ LE RAT INSUFFISANT RENAL (PUBLICATION 2)	85
1. Analyse rationnelle	85
2. Conclusions	96
C. SUIVI IRM ET DISTRIBUTION CEREBRALE SUR LE MOYEN-LONG TERME, APRES INJECTIONS DE DOSES ELEVEES DE CHELATES DE GD	98
1. Administration de 36mmolGd/kg cumulées de gadodiamide, et suivi sur 5 mois post-injections	98
2. Administration de 50 mmolGd/kg cumulées de gadodiamide ou de gadotérate, et suivi sur 4 mois post-injections	104
<b>CHAPITRE 4 : NOTIONS ET RAPPELS SUR LES BARRIERES CEREBRALES</b>	<b>107</b>
A. LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE	108
1. Circulation sanguine cérébrale	108
2. De l'artère à la veine : structure des parois vasculaires	109
3. L'unité neurovasculaire	110
4. Types de transport à travers la BHE	112
5. Efflux actif par les transporteurs ABC	112
B. LA BARRIERE HEMATO-MENINGEE	113
1. Barrière sang-LCR et production du LCR	113
2. Les transports à travers les plexus choroïdes	114
3. Propriétés du liquide céphalo-rachidien	115
4. Barrière liquide céphalo-rachidien – sang et réabsorption du liquide céphalo-rachidien	115
C. LES ORGANES CIRCUMVENTRICULAIRES	116
<b>CHAPITRE 5 : HISTOLOGIE DU CORTEX CEREBELLEUX ET DES DCN</b>	<b>118</b>
<b>TRAVAUX PERSONNELS</b>	<b>120</b>
A. ETUDE DE L'ACCUMULATION DE CHELATES DE GD PAR IMAGERIE MULTIMODALE, CHEZ LE RAT INSUFFISANT RENAL (PUBLICATION 3)	120
1. Analyse rationnelle	120
2. Les techniques de microscopie électronique en transmission et du NanoSIMS	122
3. Synthèse des résultats	137
B. ANALYSE PAR FLUORESCENCE X DE NOYAUX CEREBELLEUX PROFONDS DE RATS AYANT REÇUS DES INJECTIONS MULTIPLES DE CHELATES DE GD	139
1. Introduction	139



2. Le rayonnement synchrotron	139
3. La ligne Nanoscopium	139
4. Etude préliminaire : Caractérisation par imagerie multimodale de noyaux cérébelleux profonds de rats ayant reçu des injections répétées de gadodiamide.	141
5. Deuxième étude : Analyse par fluorescence X de structures cérébelleuses de rats ayant reçus des injections multiples de gadobénate	151
<b>DISCUSSION DES RESULTATS CONCERNANT LA CARACTERISATION DE LA RETENTION CEREBRALE DE GD</b>	<b>158</b>
A. L'INSUFFISANCE RENALE SENSIBILISE A LA CAPTURE CEREBRALE DE GD	159
B. ACCUMULATION DE GD DANS LES PLEXUS CHOROÏDES	161
C. VOIE DE PASSAGE DES CHELATES DE GD DU SANG AU SNC	162
1. Passage sang-LCR, à travers les plexus choroïdes	162
2. Passage du gadolinium entre le LCR et le parenchyme cérébral	163
3. Cas de notre étude de la distribution de Gd par fluorescence X	165
D. CHELATE LINEAIRE VS MACROCYCLIQUE : EFFET CLASSE	166
1. Arguments en faveur d'une déchélation des chélates linéaires de Gd	166
E. OU LE GD S'ACCUMULE-T-IL ET POURQUOI ?	168
1. Structures d'accumulation du Gd	168
2. Hypothèses concernant l'accumulation préférentielle dans certains tissus	169
F. LOCALISATION SUBCELLULAIRE DU GD	171
G. SPECIATION DU GD : SOUS QUELLE FORME EST-IL ACCUMULE ?	171
H. CHOIX DE LA ZONE DE REFERENCE POUR L'EVALUATION DU REHAUSSEMENT EN IRM	174
<b>PARTIE III : EVALUATION DES CONSEQUENCES NEURO-TOXICOLOGIQUES DE CETTE ACCUMULATION</b>	<b>175</b>
<b>CHAPITRE 1 : VOIES DE SIGNALISATION ET FONCTIONS DU <i>GLOBUS PALLIDUS</i> ET DES NOYAUX CEREBELLEUX PROFONDS</b>	<b>175</b>
A. LES NOYAUX GRIS CENTRAUX	175
1. Fonction des noyaux gris centraux	175
2. Connexions des noyaux gris centraux	175
B. LES NOYAUX CEREBELLEUX PROFONDS	177
1. Connexions des noyaux cérébelleux profonds	177
2. Fonction des noyaux cérébelleux profonds	179
3. Communication fonctionnelle entre les noyaux cérébelleux profonds et les noyaux gris centraux.	180
<b>CHAPITRE 2 : TROUBLES NEUROLOGIQUES ASSOCIES A CES STRUCTURES</b>	<b>181</b>
A. MANIFESTATIONS CLINIQUES DE LA LESION DU NOYAU DENTELE ET DU CERVELET	181
1. Syndromes cérébelleux	181
2. Syndrome de Schmahmann	182
B. MANIFESTATIONS CLINIQUES DE LA LESION DES NOYAUX GRIS CENTRAUX ET DU GLOBUS PALLIDUS	182
1. La maladie de Parkinson	182
2. Maladie d'Huntington	182
3. Pathologies d'accumulation de métaux affectant les noyaux gris centraux	182
C. EFFETS NEUROTOXIQUES DES CHELATES DE GD	183
1. Injections intrathécales de chélates de gadolinium (neurotoxicité aigüe)	183
2. Symptômes chroniques rapportés par les patients	183
<b>CHAPITRE 3 : METHODES D'EVALUATION D'UNE EVENTUELLE NEUROTOXICITE</b>	<b>185</b>
A. SPECTROSCOPIE RMN	185
B. MICRODIALYSE	187
C. MARQUEURS HISTOLOGIQUES DE TOXICITE	188
D. EVALUATION COMPORTEMENTALE	188
1. Observations générales et activité	188
2. Anxiété	188
3. La mémoire	189
4. L'apprentissage	189





5. La coordination motrice	189
6. Capacités sensorielles	190

## **TRAVAUX PERSONNELS : EVALUATION NEUROTOXICOLOGIQUE DES CHELATES DE Gd ADMINISTRES DE FAÇON REPETE 191**

A. INTRODUCTION	191
B. MATERIELS ET METHODES COMMUNS AUX DEUX ETUDES	192
1. Conditions d'hébergement	192
2. Injections et organisation générale de l'étude	192
3. Étude comportementale	192
4. Euthanasies et prélèvement pour analyse histopathologique	199
5. Tests statistiques	199
C. ETUDE 1 : ETUDE PRELIMINAIRE DE LA MANIFESTATION D'UNE NEUROTOXICITE, SUITE A L'INJECTION REPETEE ET A FORTE DOSE DE GADODIAMIDE (36 MMOLGd/KG)	200
1. Introduction	200
2. Matériel et Méthodes	201
3. Résultats	206
4. Conclusions	222
D. ETUDE 2: GADODIAMIDE VS GADOTERATE VS SERUM PHYSIOLOGIQUE, 50 MMOLGd/KG	223
1. Introduction	223
2. Méthodes	224
3. Résultats	227
4. Conclusions	240

## **DISCUSSION DES RESULTATS DE LA RECHERCHE D'UNE EVENTUELLE NEUROTOXICITE 242**

A. APPROCHE COMPORTEMENTALE	243
1. Comportement général, activité et anxiété	243
2. Tests d'évaluation de la coordination motrice	245
3. Tests de la mémoire, l'apprentissage, la sensibilité et l'olfaction	246
4. Conclusion des études neuro-comportementales	247
5. Autres études comportementales réalisées chez le Rongeur adulte	248
6. Administration à une population juvénile	248
7. Administrations chez la Souris gestante	249
8. Atteinte neurologique consécutive à l'injection de chélates de Gd	250
9. Analyse des signes cliniques chez l'Homme	251
B. APPROCHES NON COMPORTEMENTALES DE LA NEUROTOXICITE	252

## **DISCUSSION GENERALE 256**

LA CAPTURE CEREBRALE DE Gd, NOUVEAU CHOC POUR LA COMMUNAUTE RADIOLOGIQUE, NOUVEAU POSITIONNEMENT POUR LES AUTORITES DE SANTE	256
QUELLES SONT LES CONSEQUENCES NEUROTOXICOLOGIQUES DE L'ACCUMULATION CEREBRALE DES CHELATES DE Gd ?	257
EXISTE-T-IL DES POPULATIONS A RISQUE ?	258
QUELLES SONT LES CINETIQUES D'ACCUMULATION ET D'ELIMINATION DU Gd DANS LE SNC ?	259
PAR OU LE Gd PASSE-T-IL ? OU SE STOCKE-T-IL, ET SOUS QUELLES FORMES ?	260

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 269**

## **ANNEXES 313**

## **TABLE DES FIGURES 333**

## **Liste des Tableaux 343**



## Abréviations

ACR : American College of Radiology

AQP : Aquaporine

ATP : Adénosine Triphosphate

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

CD : Cluster of Differentiation

CEA : Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives

CHC : Carcinome hépatocellulaire

DCI : Dénomination Commune Internationale

DCN : Deep Cerebellar Nuclei

DFG : Débit de Filtration Glomérulaire

DL<sub>50</sub> : Dose Léthale 50 pour cent

DMT-1 : Divalent Metal Transporter-1

EELS : Energy Electron Loss Spectroscopy

EFTEM : Electron Filtered Transmission Electron Microscopy

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EMA : European Medical Agency

EPM : Elevated Plus Maze

EP-XRF : Electron Probe X-Ray Fluorescence

FAIR-RARE: flow-sensitive Alternating Inversion Recovery – Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement

FDA : Food and Drug Administration

FIB-SEM : Focused Ion Beam – Scanning Electron Microscopy

FLAIR : Fluid-Attenuated Inversion Recovery

FLASH : Fast Low Angle Shot

FSN : Fibrose Systémique Néphrogénique

GABA : Gamma-AminoButric Acid

GAD : Glutamate Décarboxylase

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

GP: *Globus pallidus*

GPe: *Globus pallidus* externe

GPI: *Globus pallidus* interne



HPLC : High Performance Liquid Chromatography  
ICP : Inductive Coupling Plasma  
IRM : Imagerie de Résonance Magnétique  
LA : Laser Ablation  
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien  
M0, M1, Mx : nombre de mois postérieurs à la période d'injection (chez le Rat)  
MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization  
MCA : Artère cérébrale moyenne (artère sylvienne).  
MS : Mass Spectrometry  
ND: Noyau Dentelé  
NMRD : Nuclear Magnetic Resonance Dispersion  
OATP : Organic Anion Transporting Polypeptides  
OF : Openfield  
OFA : Oncins France strain A  
ORL : Oto-Rhino-Laryngologique  
PAS : Periodic Acid Schiff  
PEEK : PolyEther Ether Ketone  
PFA : Paraformaldéhyde  
PMDA : Pharmaceuticals and Medical Devices Agency  
RF : Radiofréquence  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
RPM : Rotation Par Minute  
RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction  
SEM : Scanning Electron Microscopy  
SEP : Sclérose en plaques  
SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry  
SOLEIL : Source Optimisée de Lumière d'Énergie Intermédiaire du LURE (Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique)  
SNC : Système Nerveux Central  
STN : Noyau subthalamique  
SXRF : Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence  
TEM : Transmission Electron Microscopy



TRITC : Ttramethylrhodamine isothiocyanate

UBC: Unipolar Brush Cells

UCHL-1 : Ubiquitin C-terminal Hydrolase L1

(U)SPIO : (Ultrasmall) Superparamagnetic Iron Oxide



## Introduction générale

Les années 70 ont été marquées par la naissance de l'imagerie par résonance magnétique (IRM). En 1971, Raymond Vahan Damadian a, le premier, proposé l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire (RMN) en médecine. Les travaux de Paul Lauterbur et de Peter Mansfield ont permis le développement de l'IRM. Ils en seront récompensés par le Prix Nobel bien des années plus tard, en 2003. La première image du corps humain a été obtenue le 3 juillet 1977 (sous un champ magnétique de 0,05T, avec 4 heures d'acquisition pour une seule coupe (Damadian, 1977)).

Apportant une avancée révolutionnaire dans la médecine diagnostique, les équipements IRM se multiplient alors dans les hôpitaux. Alors que l'on pensait qu'un des avantages de l'IRM était qu'elle pouvait se passer des produits de contraste, ceux-ci apparaissent à la fin des années 80. Ils permettront des progrès diagnostiques exceptionnels au point que, dans certaines indications, ils sont quasiment irremplaçables (Van der Molen, 2014). Les produits de contraste ont le statut de médicaments de prescription. Guerbet commercialise le gadotérate de méglumine, Dotarem®, à partir de 1989, second chélate de Gd sur le marché (après le gadopentétate de diméglumine, Magnevist® de Bayer/Schering) mais premier agent macrocyclique. Ces produits de contraste reposent principalement sur le gadolinium (Gd). Cet élément de la famille des lanthanides (ou « terres rares » quand on y adjoint le scandium et l'yttrium), possède 7 électrons célibataires, ce qui lui confère d'importantes propriétés paramagnétiques. Cependant, injecté seul sous forme d'un sel soluble dans l'eau, le  $Gd^{3+}$  présente une toxicité aiguë élevée (c'est notamment le plus puissant inhibiteur inorganique des canaux calciques voltage-dépendants) (Spencer, 1997 ; Palasz, 2000). Il peut alors chélaté au moyen d'un ligand polyaza-polycarboxylique qui en améliore très nettement la tolérance, tout en conservant un paramagnétisme suffisant pour l'imagerie. Administrés par voie intraveineuse, les chélates de Gd améliorent drastiquement le contraste entre les tissus (en fonction de leur distribution et de la composition de ces derniers) et donc la détection de structures pathologiques. L'utilisation des chélates de Gd pour la meilleure prise en charge des patients est alors universellement adoptée. Depuis la commercialisation du premier agent de contraste à base de gadolinium (le gadopentétate de diméglumine, par Schering, devenu Bayer en 2006) en 1987, on estime que plus de 300 millions de doses ont été délivrées dans le monde (Gulani, 2017).

L'IRM et les chélates de Gd sont alors considérés comme extrêmement bien tolérés pendant près de 20 ans. Hormis quelques cas d'hypersensibilité (pouvant être graves), leur tolérance est jugée si bonne que, pour certains radiologues, ce sont probablement les médicaments les plus sûrs du marché (Caravan, 1999). C'est alors qu'en 2006, un néphrologue autrichien propose un lien causal entre leur administration et la survenue, chez des patients insuffisants rénaux, d'une pathologie très rare, mais grave et très invalidante : la fibrose systémique néphrogénique (FSN) (Grobner, 2006). La FSN ne se manifeste que chez les patients souffrant



d'insuffisance rénale sévère ou terminale, après administration d'une des deux catégories de produits de contraste IRM commercialisés, les chélates de Gd dits « linéaires ». Ces derniers s'opposent aux chélates « macrocycliques », par la structure de leur ligand, qui, « encage » mieux leur ion central  $Gd^{3+}$ , leur conférant une meilleure stabilité cinétique. Il est en effet connu que les stabilités thermodynamique et cinétique des chélates de Gd dépend de la structure moléculaire du ligand (Port, 2008). S'ensuivent de très nombreuses publications de cas cliniques et de recherches précliniques, aboutissant à des recommandations de la part des autorités de santé en 2007 (EMA, FDA). Il faudra attendre 2010 pour que les chélates de Gd linéaires soient contre-indiqués chez les patients en insuffisance rénale chronique au-delà du stade 3 (stades dits sévère et terminal) (EMA, 2010 ; FDA, 2010). On constate alors que les signalements de nouveaux cas de FSN aux autorités sanitaires sont désormais rarissimes. Le cours de la vie reprend alors normalement dans le domaine de l'IRM.

Cependant, l'histoire ne s'arrête pas là. En effet, en 2014, survient un nouveau coup de théâtre. Un lien causal est de nouveau établi entre l'administration répétée de chélates de Gd, et l'apparition d'un hypersignal T1 dans des structures saines du cerveau de patients étudiées en l'absence d'injection de chélate de Gd (Kanda, 2014). On démontre même une corrélation entre le nombre d'injections préalables et la prise de signal T1 de ces structures cérébrales (McDonald, 2015). Ensuite, il apparaît que ce phénomène est quasi-exclusivement le fait de chélates de Gd linéaires (Radbruch, 2016). Différentes questions se posent alors autour de cette thématique préoccupante. Où le Gd se stocke-t-il et pourquoi ? Par quelles voies les chélates de Gd accèdent-ils aux tissus cérébraux, qui plus est, sains ? Sous quelle(s) forme(s) le Gd est-il stocké dans les tissus cérébraux ? Existe-t-il des populations particulièrement à risque ? L'accumulation cérébrale de Gd induit-elle des conséquences neurotoxicologiques ?

Cette thèse porte sur la caractérisation de l'accumulation cérébrale des chélates de Gd, et la recherche des conséquences neurotoxiques potentielles. Située à l'interface entre la biologie et la chimie, cette thèse multidisciplinaire sera scindée en trois parties.

Dans la première, le contexte et l'introduction du sujet seront abordés, à travers des rappels concernant les principes de l'IRM et la place que jouent les chélates de Gd dans sa pratique, la physico-chimie de ces agents, ainsi que la fibrose systémique néphrogénique. La découverte du phénomène de la capture cérébrale des chélates de Gd sera retracée, à travers les premiers articles cliniques.

Une seconde partie portera sur la caractérisation du phénomène d'accumulation cérébrale de ces molécules, au moyen notamment de techniques d'imagerie dans une approche multimodale. Des chapitres rappelant l'anatomie des structures d'intérêt, les différentes barrières intra-cérébrales, ainsi que les méthodes utilisées pour l'analyse de la présence de Gd dans les tissus, seront inclus. Enfin, nos travaux personnels, publiés ou non, seront détaillés.



Seront ainsi traités, dans les deux premiers articles publiés, la distribution du Gd au sein des structures cérébrales, la description du rehaussement T1 en IRM et le rôle des métaux endogènes dans ce phénomène, sur un modèle animal visant à mimer une population à risque. Un troisième article analysera la localisation subcellulaire de l'accumulation de Gd, à travers une étude d'imagerie multimodale et comparative de différents chélates de Gd. Des travaux non-publiés décriront l'étude plus large de la distribution et de la recherche de la forme du Gd dans les tissus cérébraux.

Une première discussion de ces travaux sera réalisée.

Enfin, une troisième partie traitera de l'analyse des potentiels effets neurotoxiques des chélates de Gd administrés de façon répétée. Un rappel des fonctions assurées par les structures d'intérêt sera présenté, ainsi que les principaux effets associés à leur atteinte. Les principales méthodes d'analyse de la neurotoxicité utilisées seront décrites. Les travaux non-publiés, concernant ce sujet, seront présentés puis discutés.

Pour finir, une discussion générale cherchant à établir un mécanisme général pour la capture cérébrale des chélates de Gd sera menée.



# Partie I : Introduction au contexte et au sujet de la thèse

## Chapitre 1 : Principes de l'imagerie par résonance magnétique et des agents de contrastes en IRM

### A. Principes et fonctionnement de l'imagerie par résonance magnétique

#### 1. Introduction

L'IRM, ou **Imagerie par Résonance Magnétique**, est une technique d'imagerie médicale mise en œuvre dès les années 1970. Elle permet le diagnostic, le suivi thérapeutique et le pronostic de millions de patients chaque année. L'examen d'IRM anatomique, non invasif et aux délais d'acquisition relativement rapides, permet l'obtention d'images bidimensionnelles (2D) et de reconstructions tridimensionnelles (3D), et donc, *in fine*, de repérer toute anomalie tissulaire, anatomique, voire même physiologique. Cette technique possède une excellente résolution spatiale, notamment des tissus mous, riches en eau. Son principe physique repose en effet sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton, décrit en 1946 par Félix Bloch et Edward Mills Purcell (Bloch, 1946 ; Purcell, 1946), récompensés par le Prix Nobel en 1952. Ces travaux découlaient eux-mêmes de ceux de Cornelius J. Gorter (le premier à démontrer la relaxation paramagnétique en 1936 (Gorter, 1936)), puis d'Isidore Rabi, Prix Nobel de Physique en 1944, qui, le premier, a calculé le moment magnétique du proton (Rabi, 1937 ; Kellog, 1939). L'utilisation de la RMN pour l'obtention non invasive d'images est due aux travaux de Raymond Vahan Damadian (Damadian, 1971), Paul Lauterbur (Lauterbur, 1973) et Peter Mansfield (Mansfield, 1976). L'examen peut également être décliné en IRM fonctionnelle (étude non invasive de la fonction ou de l'activité d'un organe (Ogawa, 1990)) ou en IRM de diffusion (visualisation/quantification de la mobilité aléatoire des molécules d'eau intra-tissulaires) (Le Bihan, 1986). Il apparaît que l'IRM est à l'origine de très nombreux progrès survenus dans le domaine des neurosciences, depuis près d'un quart de siècle.

#### 2. RMN et notion de spin

La **résonance magnétique nucléaire** (RMN) étudie le comportement de noyaux possédant un spin nucléaire non nul, placés dans un champ magnétique, et soumis à des ondes de radiofréquence.

Le noyau d'un atome est composé de neutrons et de protons, habituellement désignés par le terme « nucléons ». Ces nucléons, de façon naturelle, répondent au phénomène de « **spin** », ou mouvement de précession (Figure 1). Cela signifie qu'ils possèdent un mouvement de rotation autour d'un axe qui tourne lui-même.

Le mouvement rotatif d'une charge induit localement un champ magnétique. Cette particularité confère aux particules chargées un « **moment magnétique angulaire** » (en  $A.m^2$ ), pouvant être représenté par un vecteur  $\vec{\mu}$  (Figure 1).





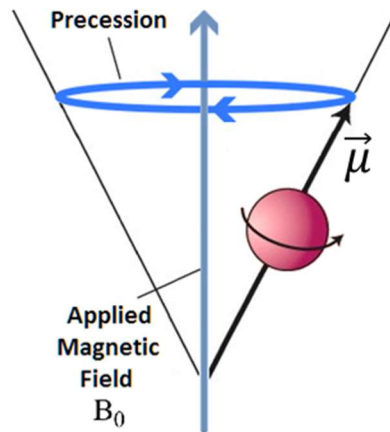


Figure 1 : Schéma d'un spin placé sous l'effet de l'application d'un champ magnétique  $B_0$ . (site internet 1).

Pour posséder un moment magnétique, grandeur vectorielle qui résulte de la différence des charges du noyau, les atomes doivent posséder un nombre impair de nucléons. C'est le cas de  $^1\text{H}$  ;  $^{12}\text{C}$  ;  $^{15}\text{N}$  ;  $^{19}\text{F}$  ;  $^{31}\text{P}$ . Le **proton**, seul nucléon du noyau de l'atome d'hydrogène, est le grand élu de l'IRM : présent à la fois dans l'eau, les lipides, les protéines et à peu près tout ce qui constitue un organisme vivant, il représente plus des 4/5<sup>e</sup> de la composition des tissus biologiques. De plus, il donne déjà un excellent contraste entre les différents tissus, en termes de densité de protons.

Soumis à un champ magnétique ( $B_0$ , dans l'axe transversal z), le spin nucléaire s'alignera dans la direction du champ, de façon parallèle (niveau d'énergie  $E_1$ ), ou antiparallèle (niveau d'énergie  $E_2$ ). L'orientation parallèle demande une énergie très légèrement plus faible ( $E_2 > E_1$ ) et selon la loi de répartition de Boltzmann, elle sera donc l'orientation privilégiée (pour juste un peu plus de la moitié des protons, on parle en effet de 4 protons de différence pour un million). Cela suffit à donner une résultante vectorielle  $\vec{M}_0$  orientée dans le sens du champ magnétique, ou **aimantation** (Figure 2). Les spins des atomes orientés sous un champ magnétique  $B_0$  verront cependant toujours leur axe de rotation tourner, et ainsi former un angle avec la direction du champ  $B_0$ . Il en résulte un **mouvement de précession**.

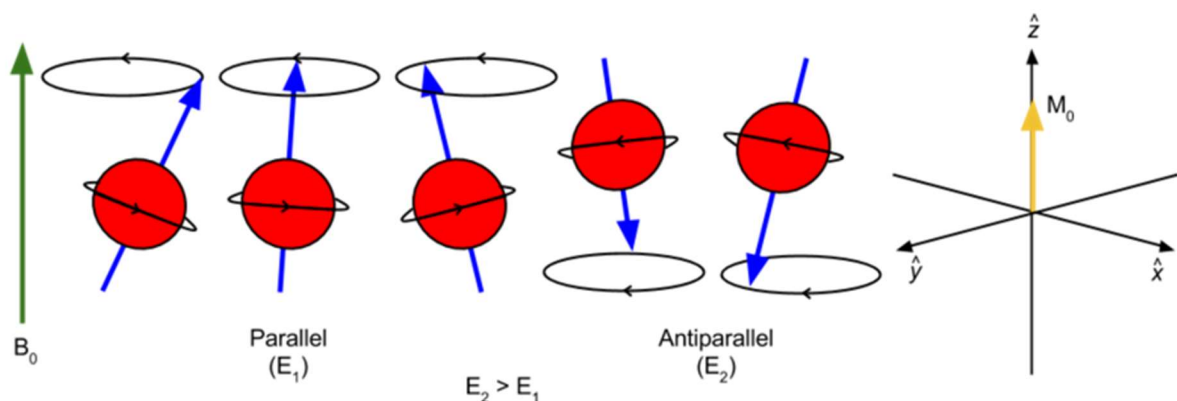


Figure 2 : Schéma de l'orientation des spins : Orientation parallèle ou antiparallèle des spins, sous l'effet d'un champ magnétique  $B_0$  (site internet 2).

Il est ensuite possible d'orienter tous les spins dans le seul sens parallèle. Pour cela, il leur faut un apport d'énergie. En pratique, cela est réalisé par l'application d'une onde électromagnétique, dite aussi « **impulsion de radiofréquence** ». Celle-ci est de direction orthogonale à celle de  $B_0$ , et de la



même fréquence que celle de précession des noyaux. Cette fréquence  $\omega$ , dite **de Larmor** (en MHz), peut être déterminée à partir de la valeur du champ  $B_0$  (en Tesla) et du rapport gyromagnétique  $\gamma$  (en MHz/Tesla) caractéristique du noyau d'intérêt (rapport entre le moment magnétique et le moment cinétique du noyau). On a donc :

Équation 1 : 
$$\omega = \gamma B_0 / 2\pi$$

Les atomes entrent alors en état d'excitation, ils subissent une transition d'énergie  $E_1$  vers un niveau plus élevé d'énergie  $E_2$ , et prennent tous une orientation parallèle : c'est le phénomène de **résonance**.

La proportion d'atomes concernés par ce phénomène va dépendre de l'intensité de l'onde de radiofréquence appliquée ainsi que de sa durée.

### 3. Composantes longitudinales et transversales de l'aimantation

Comme nous l'avons vu précédemment, à l'équilibre, l'aimantation est parallèle à  $B_0$  sur l'axe longitudinal  $z$ , soit  $\vec{M}_{z_0}(0,0,z)$  (Figure 3, état d'équilibre 1). L'application d'une onde de radiofréquence orthogonale à  $B_0$  va avoir pour effet de modifier la répartition de Boltzmann, et ainsi d'équilibrer l'orientation  $E_1$  et  $E_2$  des spins. Ce nouvel équilibre va annuler l'aimantation longitudinale. Simultanément, cette impulsion de radiofréquence a pour effet de mettre en phase les précessions des spins. La cohérence de phase fait apparaître une aimantation sur le plan  $xy$  dite **aimantation transversale** (Figure 3, état d'excitation 2).

De ce fait, suite à l'application d'une onde de radiofréquence, l'aimantation résultante ( $\vec{M}_{xy}(x,y,0)$ ) est uniquement transversale (sur l'axe  $xy$ ), alors que l'aimantation longitudinale (sur le plan  $z$ ) est nulle.

Une fois l'émission des ondes de radiofréquence arrêtée, le système retrouve progressivement son état d'équilibre initial : c'est le phénomène de **relaxation** (Figure 3, état de relaxation 3). Lors de cette relaxation, les particules vont dissiper l'énergie accumulée lors de l'excitation, et ainsi produire un signal RMN, ou « **écho** », qui sera enregistré par l'appareil, ainsi que des données spatiales.

On distingue donc deux types de relaxation : la **relaxation longitudinale**, sur le plan  $Mz$  ; et la **relaxation transversale**, sur le plan  $Mxy$ .

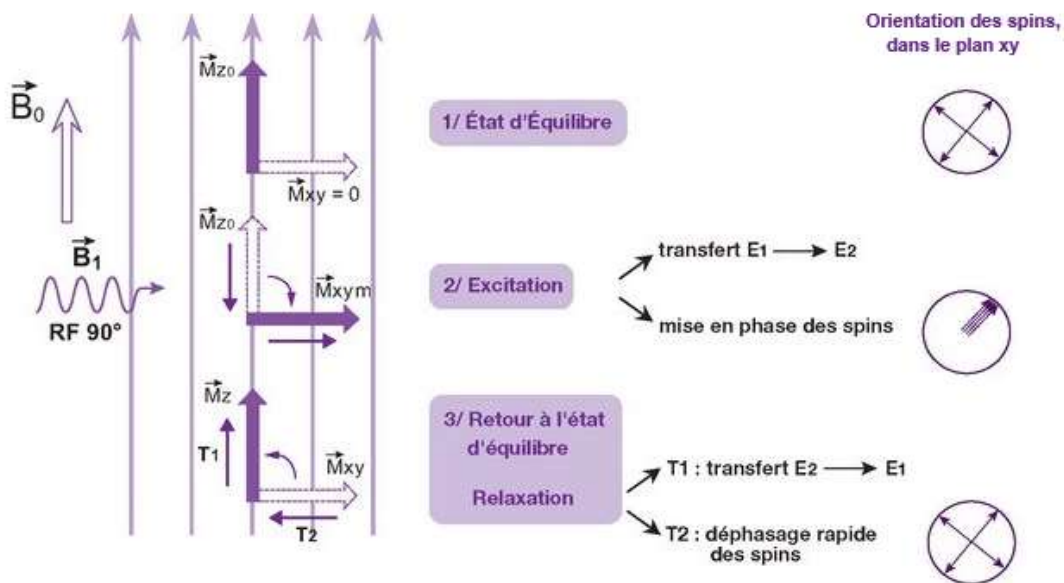


Figure 3 : Schéma de l'orientation des spins, projetée sur le plan  $xy$ , lors de l'état d'équilibre, l'excitation et la relaxation (adapté du site internet 3).



#### 4. Relaxation $T_1$ et $T_2$

Suite à l'impulsion de  $90^\circ$ , Les spins libres de retourner à leur état d'équilibre, vont revenir le long de l'axe z. La **relaxation longitudinale**, aussi appelée **relaxation  $T_1$** , consiste en la « repousse » de l'aimantation longitudinale, le long de l'axe z, suite à l'application d'une onde de radiofréquence. On définit le temps de relaxation longitudinal  $T_1$  par la durée nécessaire au retour à cet équilibre de l'aimantation.  $T_1$  correspond au temps de repousse de 63%, c'est-à-dire au temps au bout duquel l'aimantation longitudinale a retrouvé 63% de sa valeur initiale. On admet qu'après cinq  $T_1$ , la relaxation est totale.

Inversement, la **relaxation transversale**, ou **relaxation  $T_2$** , fait référence à la **décroissance** de l'aimantation transversale dans le plan Mxy, après l'impulsion de  $90^\circ$ , où elle était maximale. N'étant plus soumise à une quelconque contrainte, les spins vont en effet se déphaser progressivement et la composante transversale va se rééquilibrer jusqu'à redevenir nulle. Le temps de relaxation  $T_2$  est alors égal au temps nécessaire pour obtenir une perte de l'aimantation transversale, là encore, de 63% (ou, autrement dit, un retour à 37% de sa valeur initiale de zéro) (Figure 4).

Lors de la relaxation, les aimantations longitudinale et transversale à l'instant t sont reliées à l'aimantation initiale  $M_0$  selon les équations suivantes :

Équation 2 : 
$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-\frac{t}{T_1}})$$

Équation 3 : 
$$M_{xy}(t) = M_0(1 - e^{-\frac{t}{T_2}})$$

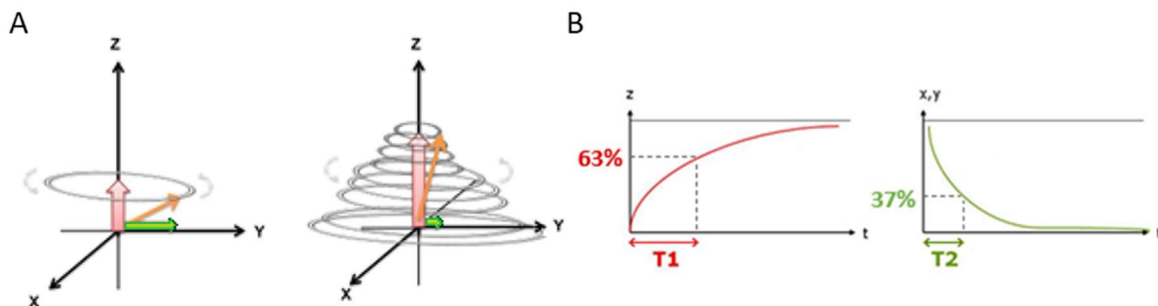


Figure 4 : Relaxation des spins nucléaires. A : Orientation moyenne des spins au cours de la relaxation (orange), et projections associées sur le plan z (rouge) et sur le plan xy (vert), correspondant respectivement aux relaxations longitudinale et transversale. B : Courbes de repousse longitudinale et transversale associées. (Adapté de Currie, 2013 ; et du site internet 4).

#### 5. Inhomogénéités de champ et $T_2^*$

La décroissance enregistrée de l'aimantation transversale est en réalité souvent plus rapide que celle calculée de façon théorique, et correspond à un **temps de relaxation transversale  $T_2$  accéléré, ou  $T_2^*$** . En effet, un déphasage supplémentaire (qui raccourcit donc le temps de relaxation transversal) est produit par des **inhomogénéités locales de champ**. Le temps de relaxation  $T_2^*$  est, en effet, défini par une combinaison de  $T_2$  ainsi que d'une composante  $T_2'$  des effets du champ externe, qui dépend de l'échantillon, et des inhomogénéités liées à l'appareil IRM. Elle peut être considérée stable, mais non-nulle, lors d'une expérience de RMN. L'effet  $T_2^*$  est plus important en périphérie des tissus, à l'interface tissu-air. Une succession d'impulsions RF90 et RF180 va permettre d'accéder à des informations en  $T_2$  « vrai », en gommant en partie ces



inhomogénéités : les impulsions  $180^\circ$  vont permettre que les spins qui se déphasent plus vite du fait des inhomogénéités soient « rattrapés » par ceux qui ne sont pas affectés par ce phénomène et qui se déphasent donc plus lentement (Figure 5).

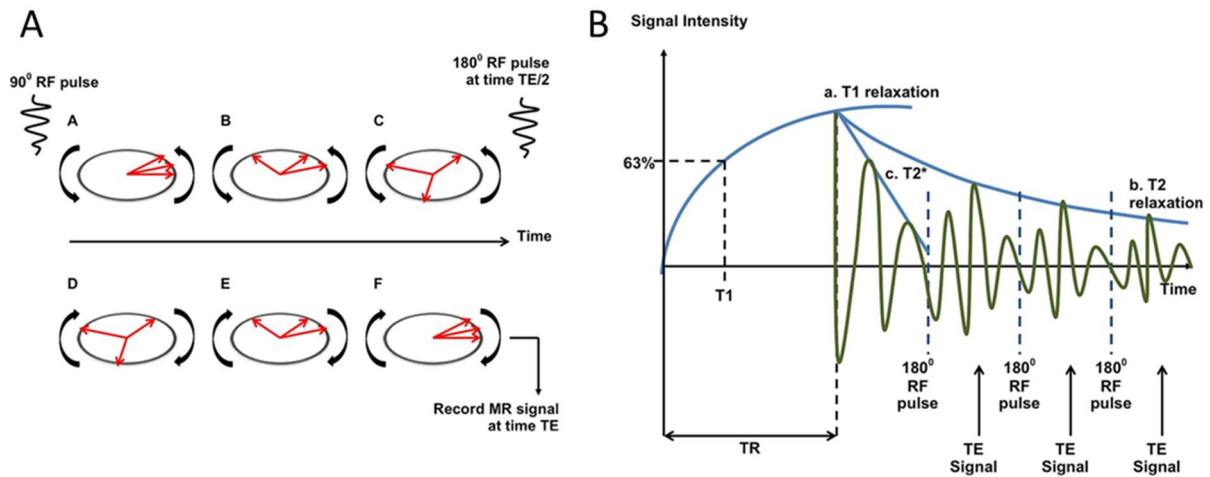


Figure 5 : A : Impact d'une onde d'inversion de  $180^\circ$  sur l'orientation des spins, projetés sur le plan xy. L'inversion, entre C et D, permet aux spins les plus lents de rattraper les plus rapides, grâce au « demi-tour » engendré. B : courbes  $T_1$ ,  $T_2$  et  $T_2^*$  avec inversions à  $180^\circ$  et temps d'échos  $T_E$  permettant l'enregistrement du signal  $T_2$  et  $T_2^*$ . Le  $T_2^*$ , affecté par les inhomogénéités de champ, est plus court que le  $T_2$  réel (Currie, 2013).

## 6. Temps de relaxation et imagerie tissulaire

Les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  correspondent respectivement à la vitesse de restitution de l'énergie d'excitation des protons, et à leur vitesse de déphasage. Chaque tissu est caractérisé par des valeurs de  $T_1$  et  $T_2$  qui lui sont propres, dans un champ magnétique donné. Le  $T_1$  est toujours plus long que le  $T_2$  ; et les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  sont plus longs dans l'eau par exemple (soit un  $T_1$  d'environ 3000 ms à un champ  $B_0$  de 1,5 T), que dans la graisse (qui, par exemple, a un  $T_1$  de 150 ms au champ clinique de 1,5T) (Bottomley, 1984).

Des séquences d'IRM sont ensuite construites, afin qu'elles renseignent au mieux les temps de relaxation  $T_1$ , ou  $T_2$ , ou  $T_2^*$ . On parle de « pondération » selon chacun de ces temps de relaxation (c'est-à-dire que l'on va ainsi pouvoir distinguer les tissus en fonction de leurs propriétés  $T_1$  ou  $T_2$ ). En IRM cérébrale, une séquence pondérée  $T_1$  va renforcer le contraste entre substance blanche (en hypersignal, car la myéline présente un temps de relaxation  $T_1$  plus court que celui de la substance grise, du fait de sa richesse en sphingomyéline, en galactocébroside et en cholestérol) et substance grise (De Kerviler, 1998). Une séquence pondérée  $T_2$ , quant à elle, supprimera le signal des liquides.

Les champs les plus faibles sont plus sensibles à une pondération  $T_1$ , tandis que les champs plus élevées sont plus adaptés à l'étude des inhomogénéités du champ, donc aux pondérations  $T_2$  mais surtout  $T_2^*$  (Stanisz, 2005 ; Soher, 2007 ; Dumoulin, 2018)



## 7. Pondération des séquences et notions de $T_R$ et de $T_E$

En pratique, les mesures sont réalisées sur plusieurs cycles, correspondant à l'enchaînement de plusieurs impulsions  $90^\circ$  (excitation), éventuellement intercalées d'impulsions de  $180^\circ$  (impulsion de détection, pour s'affranchir des inhomogénéités du champ magnétique et faire renaître un signal écho, car celui-ci « s'esouffle » vite). Cet enchaînement diffère selon la pondération souhaitée. On peut définir le **temps d'écho  $T_E$**  comme le temps écoulé entre l'impulsion  $90^\circ$  et le temps de mesure de l'écho (signal RMN mesuré émis par les spins en relaxation). De même, le **temps de répétition  $T_R$**  sépare deux impulsions de  $90^\circ$ . L'impulsion  $180^\circ$ , si elle est appliquée, a lieu à  $T_E/2$ .

Les **séquences pondérées  $T_1$**  sont constituées d'un **temps de répétition  $T_R$  court** (pour éviter une repousse complète de tous les tissus, qui gommerait leur différence de relaxation longitudinale) ainsi que d'un **temps d'écho  $T_E$  court** pour pouvoir mesurer cette différence de façon quasiment immédiate (alors que la relaxation transversale  $T_2$  est encore faible, donc) (Figure 6A).

Inversement, les **séquences pondérées  $T_2$**  comporteront un **temps de répétition  $T_R$  long** pour laisser le temps à tous les tissus d'effectuer leur repousse longitudinale (et ainsi homogénéiser le contraste  $T_1$ ), et un **temps d'écho  $T_E$  relativement long** afin d'observer une différence optimale de la relaxation transversale. Pour les séquences pondérées en  $T_2$ , une succession d'impulsions de  $90^\circ$  et  $180^\circ$  va permettre d'accéder à des informations en  $T_2$  « vrai », en gommant les inhomogénéités de champ (Figure 6B).

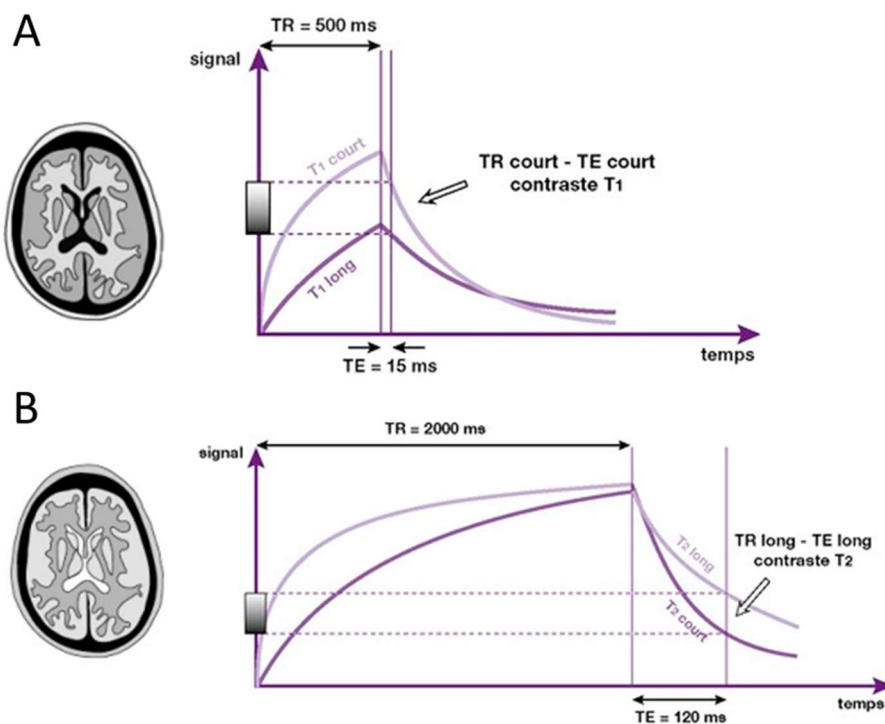


Figure 6 : Choix du temps d'écho  $T_E$  et du temps de répétition  $T_R$  selon la pondération de la séquence d'acquisition, afin d'obtenir le contraste  $T_1$  ou  $T_2$  idéal entre les structures, et images IRM associées (Sites internet 5 et 6).

Si l'on choisit un  $T_R$  long et un  $T_E$  court, on obtient une image pondérée en **densité de proton** (ou  $\rho$ ). L'image est alors peu influencée par les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$ . Dans ce cas, le tissu qui aura la plus grande densité de protons sera en hypersignal et celui qui aura la plus faible densité de protons sera en hyposignal.



Le contraste en IRM est donc donné par la différence de la densité locale de protons, et les propriétés intrinsèques de temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  de ces protons. La répétition des mesures du signal permet l'acquisition de données spatiales, qui, après transformation du plan de Fourier, résulte en une image 2D. La superposition de plans de coupe rend ensuite possible une visualisation 3D du tissu.

Les deux tableaux ci-dessous résument les données présentées plus haut.

Tableau 1 : Type de signal IRM selon la composition tissulaire prépondérante et la pondération sélectionnée

Composition	Pondération T1	Pondération T2
Graisse	Blanc (hypersignal)	Gris clair
Tissus	Gris	Gris
Eau	Noir-Gris	Blanc (hypersignal)
Air Os compact	Noir (hyposignal)	Noir (hyposignal)

Soit, au niveau du système nerveux central :

Tableau 2 : Aspect IRM des trois tissus du système nerveux central selon la pondération (Kastler, 2003)

Structure anatomique	Pondération T1	Pondération T2
$T_R$ et $T_E$	Courts	Longs
Substance grise	Gris	Gris clair
Substance blanche	Blanc	Gris foncé
Liquide céphalo-rachidien	Noir	Blanc

## B. Contribution des agents de contraste au signal en IRM

### 1. Éléments paramagnétiques et agents de contraste en IRM

Avec l'avancée des recherches sur le magnétisme, l'IRM a vu l'émergence, dès la fin des années 1980, d'agents de contraste dédiés à cette technologie.

Ces agents de contraste sont constitués **d'éléments paramagnétiques**, c'est-à-dire d'atomes qui ont la propriété d'acquies une aimantation, ou « **moment magnétique** », quand ils sont soumis à un champ magnétique, grâce à la présence d'électrons en nombre impair sur leur couche électronique externe. Ces éléments peuvent donc interagir avec les protons environnants, et ainsi influencer les temps de relaxation de ces derniers.



Les métaux de transition et les lanthanides, dont, respectivement les sous-couches (3-4-5)*d* et 4*f*, sont incomplètes en électrons, sont des éléments paramagnétiques (car qui dit couche électronique incomplète dit électrons non-appariés). Parmi les plus intéressants, on trouve Mn, Fe, Gd, Dy, dans leur état d'oxydation naturel (II) ou (III).

Selon l'élément considéré, l'effet principal concernera le temps de relaxation longitudinal ( $T_1$ ), ou bien transversal ( $T_2$ ), des protons.

Le **gadolinium** ( $Gd^{3+}$ ) (numéro atomique  $Z = 64$ , masse atomique =  $157,25 \text{ u} \pm 0,03 \text{ u}$ , configuration électronique  $[Xe] 4f75d16s2$ , comme indiqué ci-dessous) appartient à la famille des **lanthanides**, comprenant 15 éléments allant du cérium ( $Z=58$ ) au lutécium ( $Z=71$ ), auxquels est classiquement ajouté le lanthane ( $Z=57$ , dépourvu d'électrons 4*f*), du fait de ses propriétés chimiques voisines. Se situant au milieu de la série, le  $Gd^{3+}$  a le plus grand nombre d'électrons non-appariés : ils sont au nombre de 7 (Figure 7). Cela lui confère un moment magnétique élevé. De plus, contrairement aux autres lanthanides, il ne possède pas d'anisotropie du fait de son état orbital S symétrique, ce qui est à l'origine d'un temps de relaxation de ses spins électroniques plus long ( $T_{1e} > 10^{-9} \text{ s}$ , contre  $\sim 10^{-13} \text{ s}$  pour  $Eu^{3+}$  et  $Dy^{3+}$  par exemple). Cela assure au Gd une perturbation du champ magnétique local dont la fréquence de fluctuation est en adéquation avec la fréquence de précession des spins nucléaires (la fréquence de Larmor), et qui a donc ainsi un effet non négligeable sur leur relaxation (Sessler, 1993).

	Ion	Configuration		Magnetic moment
		3d	4f	
Transition metal ion	$^{24}Cr^{3+}$	↑ ↑ ↑ — —		3.88
	$^{25}Mn^{2+}$	↑ ↑ ↑ ↑ ↑		5.92
	$^{26}Fe^{3+}$	↑ ↑ ↑ ↑ ↑		5.92
	$^{29}Cu^{2+}$	↑↓ ↑↓ ↑↓ ↑↓ ↑		1.73
Lanthanide metal ion	$^{63}Eu^{3+}$		↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ —	3.4
	$^{64}Gd^{3+}$		↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑	7.94
	$^{66}Dy^{3+}$		↑↓ ↑↓ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑	10.65

Figure 7 : Configuration électronique des éléments de transition et des lanthanides, ainsi que le moment magnétique que leurs spins électroniques leur confèrent (d'après Motovilova, et Shaoying, 2017)

L'ion **manganèse** ( $Mn^{2+}$ ), dont l'effet  $T_1$  est inférieur à celui de  $Gd^{3+}$ , a suscité un intérêt notable dans l'étude de phénomènes physiologiques car il est endogène au corps humain, et paramagnétique. Cependant, sa toxicité cardiaque et hépatique, couplée à sa faible affinité pour les ligands auxquels il pourrait être associé, font qu'il est peu utilisé, même s'il existe toujours une recherche active concernant ses applications en IRM, notamment pour l'imagerie du foie (Islam, 2018). L'utilisation de  $Mn^{2+}$  comme agent de contraste était, en effet, souvent limitée aux indications hépatiques, du fait de son élimination hépatobiliaire.

L'ion **ferrique**  $Fe^{3+}$  est utilisé dans des nanoparticules d'oxydes de fer (parfois cité sous le nom de « (U)SPIO », (pour « (ultrasmall) superparamagnetic iron oxide »), qui constituent une catégorie d'agents de contraste  $T_2/T_2^*$  spécifiques. Leurs indications cliniques ont surtout concerné l'imagerie hépatique (recherche de lésions tumorales) et ganglionnaire (recherche de métastases ganglionnaires). Selon la taille, la charge et la nature de leur enrobage, les nanoparticules sont soit captées par les cellules de Kupffer du foie, soit,





si elles ont pu éviter ce « filtre hépatique », par les macrophages des ganglions lymphatiques ou d'autres localisations (les plaques d'athérome, par exemple). Dans les deux cas, l'oxyde de fer phagocyté induit un effet  $T_2/T_2^*$  à l'origine d'un hyposignal recherché par le radiologue (Corot, 2006).

L'ion **dysprosium Dy<sup>3+</sup>**, un autre lanthanide, est plus efficace à haut champ et il agit principalement sur le temps de relaxation  $T_2$ . Il possède un moment magnétique très élevé, permettant son encapsulation et son utilisation dans des complexes amphiphiles (Debroye, 2013).

C'est aux agents de contraste incluant le Gd que nous allons désormais nous intéresser.

## 2. Les complexes de gadolinium

Le  $Gd^{3+}$  « libre » a une toxicité non négligeable (Idée, 2006). Ce métal est donc toujours utilisé, en imagerie médicale, associé à un ligand polyaza-polycarboxylique, pour former un « chélate » de Gd (Port, 2008). Cette liaison au ligand va réduire son effet sur les temps de relaxation des protons, mais elle est indispensable pour qu'il soit administrable. Même sous forme chélatée, son effet sur la relaxation des protons reste toujours d'intérêt en imagerie.

Le **nombre de coordination** du  $Gd^{3+}$  est admis proche de 9, c'est-à-dire qu'il peut interagir avec des atomes environnants donneurs d'électrons, en recevant jusqu'à 9 électrons. Ce nombre de coordination va croissant parmi les lanthanides, entre 8 et 10, contre 6 au maximum pour les métaux de transition. Or, plus la « densité » d'un ligand (c'est-à-dire le nombre d'atomes de ce ligand pouvant se lier à l'atome métallique central, ici le  $Gd^{3+}$ ) est élevée, plus le temps de relaxation du complexe qu'il formera sera élevé (Lauffer, 1987). Les ligands des agents de contraste à base de Gd présentent l'avantage de pouvoir être octadentés. Le  $Gd^{3+}$  verra donc 8 de ses 9 sites de coordination occupés par le ligand, et il restera donc un site pouvant interagir avec l'oxygène (par liaison électrostatique avec un de ses doublets d'électrons non appariés) d'une molécule d'eau, et donc indirectement avec ses protons, dans sa sphère de coordination interne (Figure 8).

## 3. Chélates de gadolinium et relaxation : mécanisme d'action

La relaxation du spin nucléaire induite par un ion paramagnétique résulte des fluctuations du champ magnétique local créé par les effets de la relaxation des spins électroniques des électrons non appariés. L'intensité de ce champ local créé au niveau des protons des molécules d'eau dépend :

-du moment magnétique de l'ion (qui dépend lui-même du nombre d'électrons non appariés, comme on l'a vu plus haut) ;

-de l'amplitude (au carré) de l'interaction des ions avec les protons, soit de contact (par échange de liaisons électroniques), soit dipolaire (qui dépend de la distance qui les sépare) ;

Dans le cas du Gd, l'interaction de contact est négligeable. En effet, les électrons non appariés sont, au sein de la couche 4f, profondément enfouis dans le nuage électronique et donc peu accessibles pour établir une interaction covalente.





Il convient ici de définir la **relaxivité  $r_1$  ou  $r_2$  ( $r_i$ )**, qui est liée au temps de relaxation  $T_1$  ou  $T_2$  ( $T_i$ ) du spin nucléaire du proton de l'eau par l'équation suivante :

Équation 4: 
$$\left(\frac{1}{T_i}\right)_{obs} = \left(\frac{1}{T_i}\right)_{dia} + r_i [Gd^{3+}]$$

où  $T_i(dia)$  est le temps de relaxation (diamagnétique) des spins nucléaires avant l'ajout de l'agent de contraste et où  $[Gd^{3+}]$  est la concentration de l'ion paramagnétique (ici le Gd) dans le milieu après ajout de l'agent de contraste.

Comme nous l'avons vu précédemment le Gd pourra établir une liaison ionique de type électrostatique avec une molécule d'eau environnante. C'est ce que l'on appelle l'effet « sphère interne » de la relaxation paramagnétique, qui représente 60% de l'apport à la relaxivité (Figure 8).

En effet, pour voir leur relaxation influencée par un élément paramagnétique, les spins des protons environnants doivent en être suffisamment proches. C'est particulièrement le cas de ceux situés au sein de sa sphère de coordination interne.

La contribution du complexe paramagnétique aux vitesses de relaxation du spin nucléaire est régie par **l'équation de Solomon, Bloembergen et Morgan**, qui fait intervenir l'amplitude des interactions de contact (non applicable dans notre cas) et dipolaire, ainsi que les temps de corrélation de ces fluctuations, respectivement  $\tau_e$  et  $\tau_c$ . Nous nous intéresserons donc surtout aux termes temporels de  $\tau_c$ , temps d'interaction dipolaire, qui répondent à la relation suivante :

Équation 5 : 
$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_r} + \frac{1}{\tau_s} + \frac{1}{\tau_m}$$

- Le terme  $\frac{1}{\tau_r}$  représente le temps de corrélation de rotation du complexe, modulant l'interaction dipolaire (sauf à bas champ, pour lequel c'est surtout le cas de  $\tau_s$ ) ;
- $\frac{1}{\tau_s}$  est la vitesse des fluctuations de l'orientation du moment magnétique du spin électronique de l'ion, directement reliée à sa vitesse de relaxation ;
- $\frac{1}{\tau_m}$  est un terme d'échange, représentant le temps de résidence des molécules d'eau au sein de la sphère interne du complexe.
- En pratique, c'est le temps le plus court qui domine le  $\tau_c$

En plus de l'interaction du Gd avec l'eau constituant la **première sphère de solvation** (modulée par le terme cinétique d'échange  $\tau_m$ ), des molécules d'eau environnantes vont aussi percevoir les perturbations locales de champ ; c'est **l'effet seconde sphère de solvation**.

De même, le ligand lui-même, par l'intermédiaire des groupements carboxyles, va influencer la relaxation de protons environnants ; c'est **l'effet « sphère externe »**.

Les effets de « seconde sphère » et de « sphère externe » dépendent de la distance du Gd aux protons et de paramètres de diffusion. Ils représentent environ 40% de l'apport du chélate de Gd à la relaxivité (De León-Rodríguez, 2015).



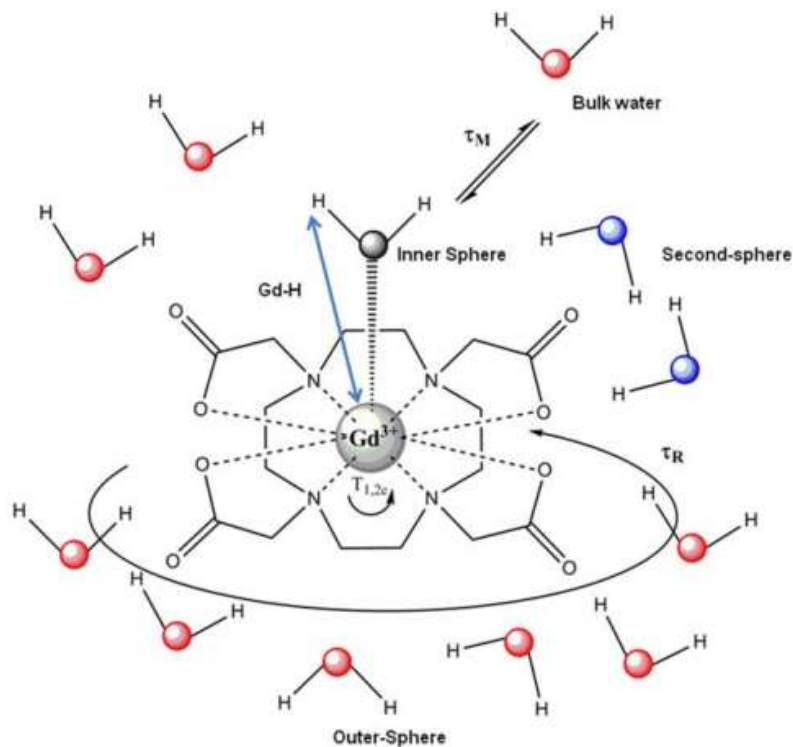


Figure 8 : Représentation des facteurs des sphères interne (« inner sphere ») et externes d'un chélate de Gd, affectant la relaxation des protons du milieu environnant. L'oxygène des molécules d'eau est schématisé de couleurs différentes : gris : molécule d'eau interagissant avec le Gd<sup>3+</sup>, dans la sphère interne ; bleu : molécules d'eau environnantes interagissant dans la sphère externe avec le ligand ; rouge : molécules d'eau pouvant remplacer celle de la sphère interne, via un échange modulé par le temps de résidence  $\tau_m$  et le temps de corrélation rotationnel  $\tau_r$  du chélate (De León-Rodríguez 2015).

Le ligand permet, en effet, l'accès à une molécule d'eau, qui pourra s'approcher très près du Gd<sup>3+</sup>, environ 0,25 nanomètres (Caravan, 1999). Une interaction « dipôle-dipôle », sous un champ magnétique, a alors lieu, entre les spins des protons et le spin de la sphère interne de l'ion. Cette interaction va être de courte durée, puisqu'une autre molécule d'eau viendra prendre la place d'une précédente en presque 1 microseconde. Ainsi, des millions de protons seront affectés par la présence de la molécule paramagnétique, en une très faible durée. Il faut aussi noter que la rotation de la molécule paramagnétique dépend de sa masse moléculaire : plus celle-ci sera lourde et donc moins mobile, plus l'interaction entre les spins des protons et le Gd paramagnétique sera facile (De León-Rodríguez, 2015).

Les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  observés dépendent donc de la contribution intrinsèque du tissu, discutée plus haut, et de la contribution paramagnétique du Gd, faisant, quant à elle, intervenir les interactions de couplage dipolaire entre un spin électronique et un spin nucléaire des sphères interne et externe. Les chélates de Gd, agissant comme des aimants plus intenses que les protons de leur environnement, vont les entraîner dans le sens de l'aimantation, et ainsi accélérer les phénomènes de relaxation longitudinale (surtout) et transversale. Les temps  $T_1$  et  $T_2$  seront donc plus courts qu'en l'absence de Gd.

De ces temps de relaxation, mesurés pour un champ et une séquence d'imagerie donnés, on déduit une **vitesse de relaxation**  $R_{1,2}$  (exprimée en  $s^{-1}$ ), qui est l'inverse du temps de relaxation :

Équation 6 :

$$R_{1,2} = \frac{1}{T_{1,2}}$$



Les chélates de Gd, en réduisant  $T_1$  et  $T_2$ , **augmenteront ainsi les vitesses de relaxations  $R_1$  et  $R_2$**  (Figure 9).

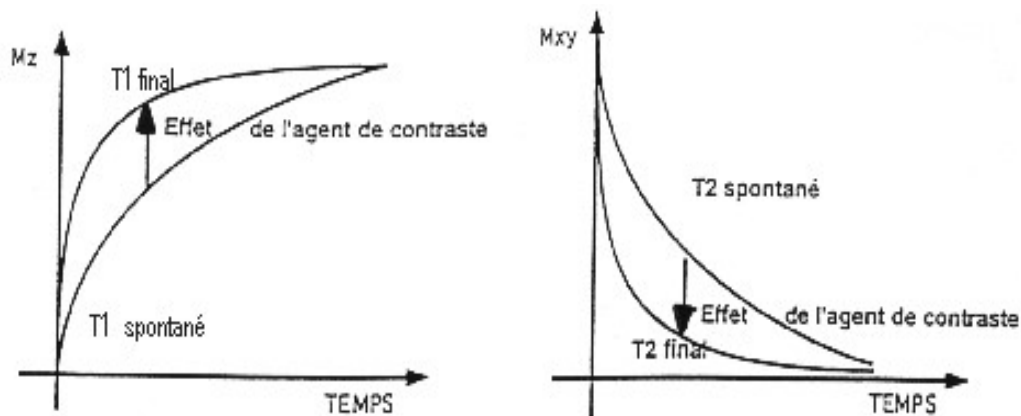


Figure 9 : Effet des agents de contraste sur les courbes de relaxivités longitudinale et transversale, menant à des  $T_1$  et  $T_2$  diminués (source Guerbet).

#### 4. Relaxivité : efficacité des chélates de gadolinium en IRM

Les chélates de Gd sont caractérisés, en IRM, par leurs **constantes de relaxivité longitudinale  $r_1$  et transversale  $r_2$** , exprimées en  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Cela rend compte de la contribution du chélate de Gd à la vitesse de relaxation  $T_{1,2}$  (en  $\text{s}^{-1}$ ) des protons du tissu, par unité de concentration  $C$  (en mM). Cette constante de relaxivité peut être représentée comme l'équation de la courbe  $R_{1,2} = f[C]$ , avec  $R_{1,2}$  étant la vitesse de relaxation, qui correspond à l'inverse du temps de relaxation  $T_{1,2}$ . La constante de relaxivité peut donc être définie par la relation suivante:

Équation 7 :

$$r_{1,2} = \frac{R_{1,2}}{[Gd]} = \frac{1}{T_{1,2} \times [Gd]}$$

Ainsi, plus la concentration tissulaire locale de Gd est élevée (jusqu'à une certaine concentration où l'effet s'inverse), plus les temps de relaxation seront réduits et donc plus les contrastes avec les structures où le métal n'est pas présent, seront élevés (Rinck et Muller, 1999). Plus la constante de relaxivité  $r_1$  d'un chélate de Gd est élevée, plus il est efficace pour une imagerie pondérée en  $T_1$ . Tous les chélates de Gd présents sur le marché présentent une efficacité sur le signal sensiblement équivalente, avec une relaxivité  $r_1$  comprise entre  $3,6$  et  $6,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  dans des conditions physiologiques et à un champ clinique de  $1,5T$ . Il en existe neuf au total, qui sont commercialisés ou qui l'ont été (ils seront présentés dans le chapitre suivant). Les chélates de Gd dits « spécifiques », de plus haute masse moléculaire et/ou ayant la capacité de se lier à des protéines (gadobénate, gadoxétate), ont cependant une relaxivité légèrement supérieure à celle des agents dits « non spécifiques », du fait de la masse moléculaire résultante qui ralentit la rotation de la molécule et augmente le  $\tau_r$  comme vu plus haut (Cavagna, 1997 ; Vander Elst, 1997).



Tableau 3 : Constantes de relaxivité longitudinale  $r_1$  et transversale  $r_2$  des différents chélates de Gd, dans du plasma bovin à 37°C (Rohrer, 2005).

Chélate de Gd	$r_1$ (mM <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$r_2$ (mM <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
Gadotérate	3,6	4,3
Gadobutrol	5,2	6,1
Gadotéridol	4,1	5,0
Gadobénate	6,3	8,7
Gadopentétate	4,1	4,6
Gadoxétate	6,9	8,7
Gadodiamide	4,3	5,2
Gadoversétamide	4,7	5,2
Gadofosveset	19	34

## 5. Le Gadolinium : Un effet $T_1$ majoritaire ?

Les chélates de Gd ont un effet  $T_1$  et  $T_2$ , mais **l'effet  $T_1$  est prépondérant**. En effet, bien que leurs constantes de relaxivité  $r_1$  et  $r_2$  soient du même ordre, leur contribution à la relaxation longitudinale et transversale des tissus apparaît à travers les vitesses de relaxation  $R_1$  et  $R_2$ , qui s'ajoutent à celles des tissus. L'apport en  $R_1$  et  $R_2$  du complexe de Gd est sensiblement le même, donc, mais le temps de relaxation  $T_2$  des tissus étant, comme nous l'avons vu, presque 10 fois plus court que le  $T_1$ , la vitesse de relaxation  $R_2$  du tissu (l'inverse de  $T_2$ ), est intrinsèquement 10 fois plus élevée que son  $R_1$ . L'effet  $T_2$  n'apparaît donc vraiment qu'à des concentrations d'agent de contraste élevées (dans les veines ou la vessie, par exemple).

## 6. Relaxivité et champ magnétique

En fonction du champ magnétique, et donc de la fréquence de Larmor (les deux étant directement liés : 1 Tesla  $\approx$  42,5 MHz dans le cas du proton), l'apport des chélates de Gd à la relaxivité est variable (Estler, 1994 ; Rohrer, 2005). Cela est classiquement représenté sous forme de « **profils NMRD** » (signifiant « Nuclear Magnetic Resonance Dispersion »). Les champs magnétiques utilisés en clinique correspondent à la zone allant de 63,8 MHz (1,5T) à 300 MHz (7T), où la relaxivité en présence des chélates de Gd va de 3 à 5 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> (Figure 10).



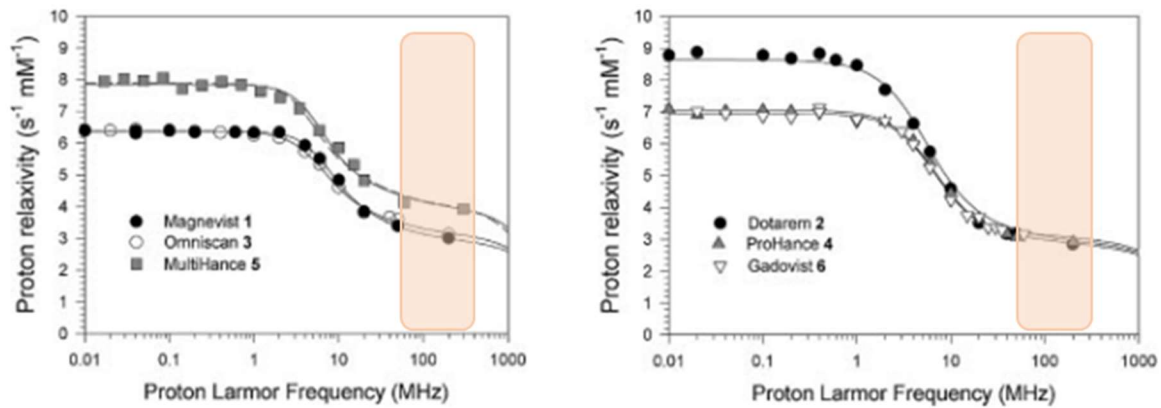


Figure 10 : Profil NMRD du proton pour différents complexes de Gd dans l'eau, à 37°C (Laurent, 2006). La zone colorée correspond aux champs d'application clinique.

## 7. L'injection de chélates de Gadolinium, dans quels cas ?

Environ 27 % des examens IRM sont associées à l'injection d'un agent de contraste (source Guerbet datant de 2018, établie sur les 5 principaux pays européens, les USA et la Chine). La plupart des examens nécessitant l'injection de chélates de gadolinium sont ceux explorant les vaisseaux (44% des examens sont injectés), les organes abdomino-pelviens, les articulations (mais l'injection y est locale et non intraveineuse), et surtout le système nerveux central (41-42% en France et en Allemagne en 2013, source Guerbet 2018) et le sein (où 48% des examens sont injectés avec un chélate de Gd).

Dans l'examen du système nerveux central, l'apport théorique de l'agent de contraste est basé sur le fait que les chélates de Gd sont classiquement considérés comme ne traversant pas la barrière hémato-encéphalique saine. Or, au niveau de lésions ou tumeurs cérébrales, on observe une hyper-vascularisation avec des microvaisseaux (généralement des néovaisseaux) perméables, et une altération de cette barrière sang-tissu (Chacko, 2013). Les lésions tumorales comme le glioblastome, très angiogénique, permettent au produit de contraste de s'échapper dans l'espace interstitiel, ce qui augmente logiquement la concentration locale de Gd (Lauffer, 1987). Les temps de relaxations sont alors diminués à ce niveau et le signal à l'image est alors localement rehaussé.

## Chapitre 2 : Chimie des complexes de gadolinium

### A. Découverte et utilisation des lanthanides et du gadolinium

Le gadolinium doit son nom à Johan Gadolin, qui découvrit en 1794 dans une carrière proche de Stockholm le premier élément des lanthanides, aussi appelés « terres rares » : l'yttrium, présent dans un minerai appelé ytterbite (Gadolin, 1794). C'est presque un siècle plus tard, en 1880, qu'un chimiste suisse, Jean-Charles Galissard de Marignac le découvre, et, 6 ans plus tard, le chimiste français Paul-Emile Lecoq de Boisbaudran réussit à l'isoler, nommant ainsi cet élément en hommage à son prédécesseur (Idée, 2009b). Ces « terres rares » ne le sont, en fait, qu'assez peu. Des mines d'extraction se trouvent notamment en Chine, aux USA, au Brésil, en Australie, en Inde (Emsley, 2011). Cependant, l'extraction et la séparation des lanthanides depuis les minéraux dans lesquels on les trouve est coûteuse et fastidieuse. De plus, ces procédés s'accompagnent de rejets toxiques importants (métaux lourds et radioactifs), dangereux pour la santé et l'environnement. C'est pour ces raisons que la Chine (environ 30% des réserves mondiales de terres rares), plus souple en matière de réglementation, en détient le quasi-monopole (site internet 7).

Les lanthanides sont largement utilisés dans de nombreuses technologies, telles que les turbines éoliennes, les moteurs électriques, le raffinement pétrolier, la production nucléaire, et plus récemment dans les fibres optiques, en tant que pigments dans le verre et les céramiques, les agents de contraste en imagerie bien sûr, ou encore comme marqueurs anti-contrefaçon (Eliseeva, 2011 ; Bünzli, 2013).

Le Gd, en plus de servir d'agent de contraste en imagerie, se retrouve dans les cathodes couleur des téléviseurs, dans les disques durs, dans des alliages de fer ou de chrome, dans des composés optiques, ainsi que dans les centrales nucléaires pour ses capacités d'absorption des neutrons (Hurst, 2010). Sa concentration dans la croûte terrestre est estimée à 5 ppm (Wastie, 2004).

### B. Les différents chélates de gadolinium

Comme cela a été évoqué précédemment, le  $Gd^{3+}$ , sous forme hydrosoluble, est fortement toxique pour l'organisme. Les différences entre chélates hydrosolubles de Gd résident dans la structure de leur ligand polyaza-polycarboxylique. Le terme « chélate » a été introduit en 1920 par Sir Gilbert T. Morgan et KT Drew à partir du mot grec *chele* κηλη qui signifie « pince de crabe » (Morgan, 1920). On distingue les chélates de Gd par leur structure moléculaire (il en existe 4 grandes catégories), leur efficacité en IRM, leur spécificité, ainsi que leurs constantes de stabilité thermodynamique (Bellin et Van Der Molen, 2008).

#### 1. Structure moléculaire des chélates de gadolinium

On distingue 4 catégories structurales pour les chélates de Gd en molécules linéaires ou macrocycliques, puis dans chaque cas, ioniques ou non-ioniques (Port, 2008).

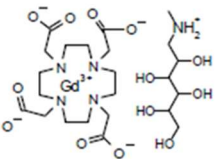
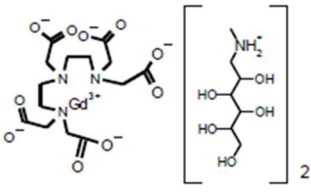
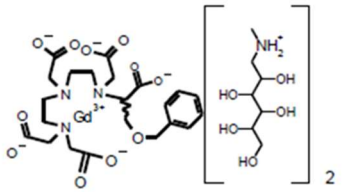
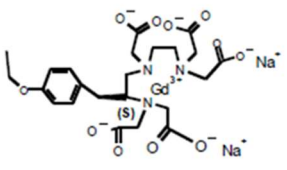
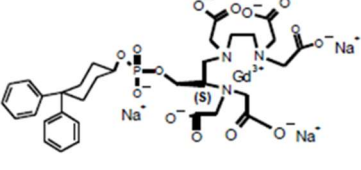
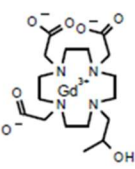
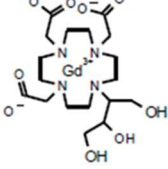
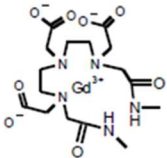
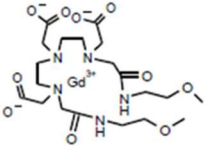
Les chélates macrocycliques ont un ligand qui « encage » en quelque sorte l'ion  $Gd^{3+}$ , par des liaisons avec 4 groupes amines centraux, et 4 groupes carboxyles pour les ioniques ou 3 groupes carboxyles et un groupe alcool pour les ligands dits « non-ioniques » (ou « neutres ») (équilibre des 3 charges positives de  $Gd^{3+}$  avec 3 charges négatives des 3 groupes carboxyliques) (Port, 2008). Il n'en existe que 3 sur le marché : gadotérate (Dotarem®), gadotéridol (ProHance®), et gadobutrol (Gadovist®, ou Gadavist® aux Etats-Unis).



Dans la catégorie des chélates dits « linéaires », la structure du ligand est en « chaîne ouverte », avec uniquement 3 groupes aminés centraux et 5 groupes carboxyles pour les agents ioniques, ou 3 groupes carboxyles et 2 carbonyles pour les non-ioniques (Port, 2008). Les chélates linéaires étaient, jusqu'à 2018, au nombre de 6, mais désormais tous ne sont plus autorisés, du moins en Europe.

Les chélates ioniques, en solution aqueuse, apparaissent sous forme de sel de méglumine, de diméglumine, disodique ou trisodique, afin de neutraliser les charges négatives du complexe de Gd. Tous les chélates de Gd ne sont pas commercialisés dans les mêmes pays, et leurs indications peuvent également différer selon le pays et l'autorité de santé auxquels cela est soumis (EMA, European Medicines Agency : Agence Européenne du Médicament ; FDA, Food and Drug Administration, aux USA ; PMDA : Pharmaceuticals and Medical Devices Agency au Japon).

Tableau 4 : Structure moléculaire de complexes de gadolinium commercialisés à ce jour ou l'ayant été (Port, 2008).

	Complexes macrocycliques	Complexes linéaires		
Ioniques	 <p>Gd-DOTA, acide gadotérique, Dotarem®</p>	 <p>Gd-DTPA, acide gadopentétique, Magnevist®</p>	 <p>Gd-BOPTA, acide gadobénique, MultiHance®</p>	
		 <p>Gd-EOB-DTPA, acide gadoxétique, Primovist/Eovist®</p>	 <p>MS325, gadofosveset, Vasovist/Ablavar®</p>	
Non-ioniques	 <p>Gd-HP-DO3A, gadotéridol, ProHance®</p>	 <p>Gd-BT-DO3A, gadobutrol, Gadovist/Gadavist®</p>	 <p>Gd-DTPA-BMA, gadodiamide, Omniscan®</p>	 <p>Gd-DTPA-BMEA, gadoversétamide, OptiMARK®</p>

## 2. Spécificité des différents chélates commercialisés

Les chélates de Gd sont prescrits pour l'exploration des pathologies cérébrales et médullaires, les pathologies du rachis, les angiographies, mais aussi pour l'imagerie de toute autre pathologie du corps entier (notamment du foie, du sein, mais aussi des articulations par exemple). En effet, leur masse moléculaire relativement faible (par exemple, pour le gadopentétate diméglumine : 938 g/mol, pour le gadotérate de méglumine : 558,64 g/mol): ajoutée à leur haut caractère hydrophile (Port, 2008), les chélates de Gd diffusent aisément et rapidement dans l'espace extravasculaire / interstitiel.





Cependant, du fait de la structure de leur ligand, certains chélates de Gd ont des indications spécifiques.

C'est le cas des chélates dont le ligand contient un groupe aromatique, à savoir le gadoxétate (Primovist® ou Eovist® aux Etats-Unis), ou le gadobénate (MultiHance®) en moindre proportion, qui vont, de ce fait, être capturés par les hépatocytes et présenteront donc une spécificité hépatique. Le gadoxétate a ainsi une indication purement hépatique, car son élimination est réalisée à 50% par la voie biliaire (Bashir, 2014). Le gadobénate n'est lui excrété qu'à 2 à 4% par le foie chez l'Homme (Kirchin, 1998), et présente donc les mêmes indications cliniques que les agents non-spécifiques, auxquelles s'ajoute l'imagerie des lésions hépatiques en oncologie. Ce tropisme hépatique est la conséquence de l'incorporation de structures aromatiques sur le ligand. Cela diminue l'hydrophilie du chélate de Gd et, par conséquent, en augmente la capture hépatocytaire puis l'élimination biliaire (Port, 2008).

Enfin, le gadofosveset (ou MS-325), aux deux cycles aromatiques, est, quant à lui, spécifique de l'angiographie. En effet, il ne s'extravase que très peu car il se lie de manière réversible et non covalente aux protéines sanguines telles que l'albumine, ce qui augmente son temps de résidence vasculaire. On parle alors d'un « **agent à rémanence vasculaire** » (ou « blood pool contrast agent » dans la littérature anglophone). Au bolus, en fait, 25% de cet agent sont liés à l'albumine (Port, 2005). Cela a, en outre, la propriété d'augmenter le  $\tau_r$  (temps de corrélation rotationnel) en IRM, et donc sa relaxivité (De León-Rodríguez, 2015), pour les 25% de la dose administrée qui sont liés (Port, 2005). Il a cependant été retiré du marché en 2017 pour des raisons commerciales.

Tableau 5 : Concentration, dose et indications des différents chélates de Gd

Principe actif (dénomination commune internationale)	Nom de marque	Fabricant – année de mise sur le marché	Concentration en Gd de la solution pharmaceutique (mM)	Dose (mmolGd/kg)	Indications
<b>Gadotérate</b>	Dotarem®	Guerbet 1989	500	0,1	Non-spécifiques (N.-S.)
<b>Gadobutrol</b>	Gadovist® (UE) / Gadavist® (US)	Bayer 1998	1000	0,1	N.-S. + rénale et hépatique
<b>Gadotéridol</b>	ProHance®	Bracco 1992	500	0,1	Non-spécifiques
<b>Gadobénate</b>	MultiHance®	Bracco 1997	500	0,1	N.-S. + hépatique
<b>Gadopentétate</b>	Magnevist®	Bayer 1986	500	0,1	Non-spécifique
<b>Gadoxétate</b>	Primovist® (UE) / Eovist (US)	Bayer 2004	250	0,1	Hépatique
<b>Gadodiamide</b>	Omniscan®	General Electric Healthcare 1993	500	0,1	Non-spécifiques
<b>Gadoversétamide (n'est plus commercialisé)</b>	OptiMARK®	Covidien 1999 puis Guerbet	500	0,1	N.-S. + hépatique
<b>Gadofosveset (n'est plus commercialisé)</b>	Vasovist® / Ablavar®	Lantheus 2005 puis Bayer	250	0,03	Angiographie périphérique





## C. Propriétés physico-chimiques des chélates de Gd

Injectés par voie intraveineuse et ayant, pour la plupart, la capacité de se distribuer rapidement dans l'espace extravasculaire, il convient de décrire ici les principales propriétés physico-chimiques des chélates de Gd.

### 1. La viscosité

Ce paramètre dépend, logiquement, de la concentration de l'agent de contraste. Représentant la résistance au mouvement de fluides, la viscosité de la plupart de chélates de Gd est comprise entre 1,2 et 2,9 mPa.s à 37°C. Seuls le gadobutrol, commercialisé à une concentration double (1 M contre 0,5 M pour la grande majorité des autres produits), et le gadobénate, du fait de son cycle aromatique (Port, 2008), ont une viscosité quasiment double de celles des autres agents (respectivement 5,0 et 5,3 mPa.s à 37°C). Cela reste donc de l'ordre de la viscosité sanguine qui est de 3,26 mPa.s à 37°C pour un taux de cisaillement de 100 s<sup>-1</sup> (Rosenson, 1996)). Ce paramètre ne pose donc pas de problèmes lors de l'injection.

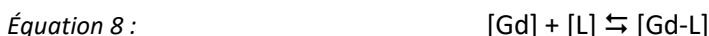
### 2. L'osmolalité

L'osmolalité, ou concentration de particules osmotiquement actives dissoutes par kilogramme de solvant, dépend de l'ionocité de la molécule. En effet, les chélates ioniques sont mis en solution sous forme saline, ce qui augmente logiquement leur osmolalité. Dans tous les cas, les chélates, même non-ioniques, sont hyperosmolaires par rapport au plasma. On pourrait ainsi craindre plus de problèmes avec les agents ioniques qu'avec les non-ioniques, notamment en cas d'extravasation ou d'insuffisance rénale préexistante, comme c'est le cas pour les produits de contraste iodés hydrosolubles. En pratique, les chélates de Gd sont administrés sous un faible volume (en général 0,2 mL/kg) et leur **charge osmotique** est donc faible : elle est comprise entre 0,7 et 2 mOsm/L (Port, 2008), soit nettement moins que celles des agents de contraste iodés, qui est d'environ 10 mOsm/L pour un monomère non ionique tri-iodé à la posologie utilisée pour un examen tomodensitométrique (Thomsen, 2005). L'injection de chélates de Gd n'a donc pratiquement aucun effet hémodynamique après administration intraveineuse à la dose clinique.

### 3. La stabilité thermodynamique

La stabilité thermodynamique d'un chélate de Gd (Gd-L) reflète l'affinité du ligand (L) pour son métal Gd<sup>3+</sup> (Gd), qu'il retient en son cœur. Il s'agit donc d'un paramètre essentiel. L'ion Gd<sup>3+</sup> ayant un niveau de toxicité élevé, il serait malencontreux qu'il se retrouve libéré dans l'organisme, abandonné par son ligand.

La stabilité thermodynamique peut être représentée par l'équation suivante :



De cette équation, on définit la constante de stabilité  $K_{\text{therm}}$  du complexe :

Équation 9 : 
$$K_{\text{therm}} = \frac{[\text{Gd-L}]}{[\text{Gd}][\text{L}]}$$

Cette constante est souvent représentée, de façon physiologiquement plus pertinente, par la constante de stabilité thermodynamique apparente ou « conditionnelle »  $K_{\text{cond}}$ , au pH physiologique (pH=7,4)



(Équation 10). Cette constante rend ainsi compte de la compétition entre le  $Gd^{3+}$  et les protons pour le ligand L.

Elle est alors définie pour une concentration totale de ligand non-complexé (LT), {c'est à dire  $L + [HL] + [H_2L] + \dots$ } (où [HL], [H<sub>2</sub>L], etc. sont les concentrations des formes protonées du ligand libre) au lieu de la concentration du ligand libre L, selon la formule :

Équation 10 : 
$$K_{cond} = \frac{[Gd-L]}{[Gd][LT]}$$

Cette constante de stabilité conditionnelle peut aussi être exprimée à partir de la constante  $K_{therm}$  selon l'équation suivante :

Équation 11 : 
$$K_{cond} = \frac{K_{ther} \times L}{L_T}$$

La constante de stabilité thermodynamique reflète, de façon plus simple, la force du lien entre le métal et le ligand, et donc, la quantité de Gd susceptible d'être libéré une fois l'équilibre atteint.

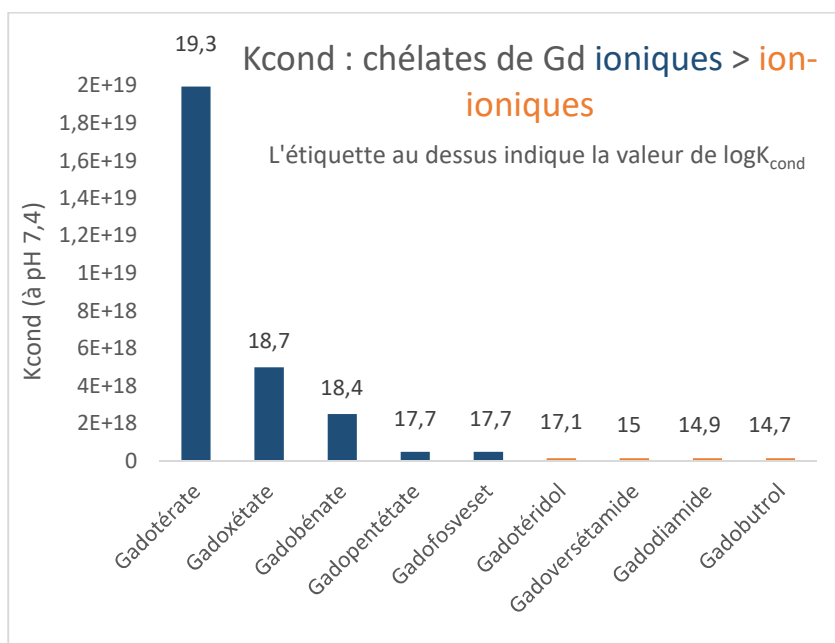


Figure 11 : Constantes de stabilité thermodynamique des différents chélates de Gd, représentées par  $K_{cond}$  (échelle logarithmique) ou  $\log K_{cond}$  (étiquette au-dessus du graphe) (d'après Port, 2008).

#### 4. La stabilité cinétique

La stabilité cinétique, ou inertie, exprime la vitesse de dissociation du complexe, autrement dit la durée nécessaire au complexe pour atteindre l'état d'équilibre thermodynamique. La stabilité cinétique se traduit par le calcul de demi-vies de dissociation du chélate de Gd  $T_{1/2}$ , généralement déterminées en conditions très acides.

Ce phénomène de dissociation correspond (Port, 2008) :

- a) soit à la réaction suivante :



Cette dissociation peut être soit spontanée soit assistée par un proton et catalysée par des métaux endogènes.

- b) soit à la conséquence d'un phénomène de transmétallation avec un métal endogène ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) représenté par la relation suivante :



La cinétique de dissociation des chélates de Gd est beaucoup plus rapide à pH acide qu'à pH physiologique (Brücher, 2002).

La demi-vie de dissociation des chélates de Gd dépend de la structure de leur ligand (Port, 2008). Cette dissociation est nettement plus longue dans le cas des agents macrocycliques que linéaires et dans l'ordre décroissant gadotérate > gadobutrol > gadotéridol, comme cela apparaît ci-dessous (Figure 12).

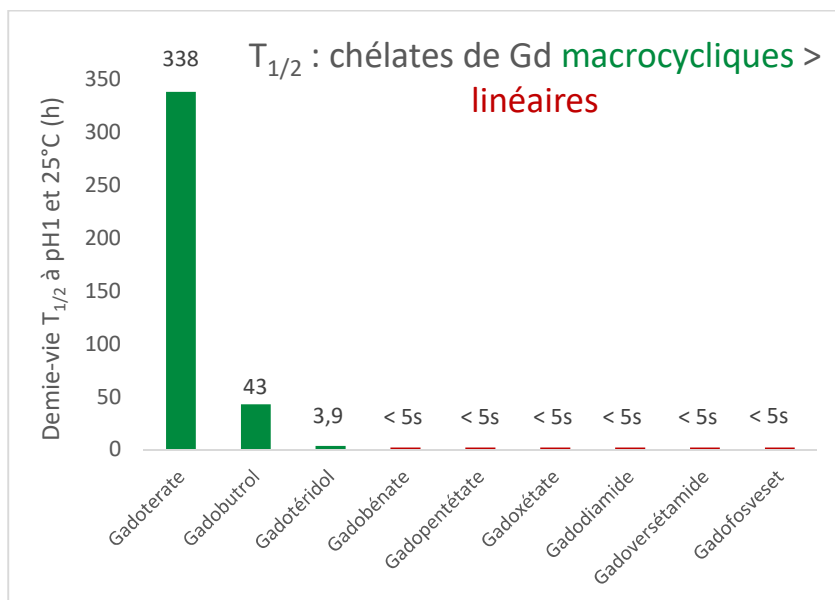


Figure 12 : Demi-vies de dissociation des chélates de Gd, dans des conditions acides (pH 1) et à 25°C. Les chélates macrocycliques se distinguent par une demi-vie de retour à l'état d'équilibre très nettement supérieure à celles des agents linéaires : même à pH 1 (et à 25°C), ils ne se déchélatent *in vitro* qu'au bout de plusieurs heures, contre quelques secondes pour les linéaires (d'après Port, 2008).

Par ailleurs, la vitesse de dissociation de ces chélates dépend aussi de la température (elle est plus élevée à 37°C qu'à 25°C) (Port, 2008).

Ce phénomène de dissociation ne survient pas qu'à pH acide. Ainsi, dans du sérum humain, à pH et température physiologiques, une dissociation progressive a été mesurée pour les chélates linéaires de Gd, d'abord non ioniques puis ioniques, alors qu'aucun effet similaire n'a été constaté pour les trois chélates de Gd macrocycliques pendant toute la durée de l'étude (15 jours) (Figure 13) (Frenzel, 2008).



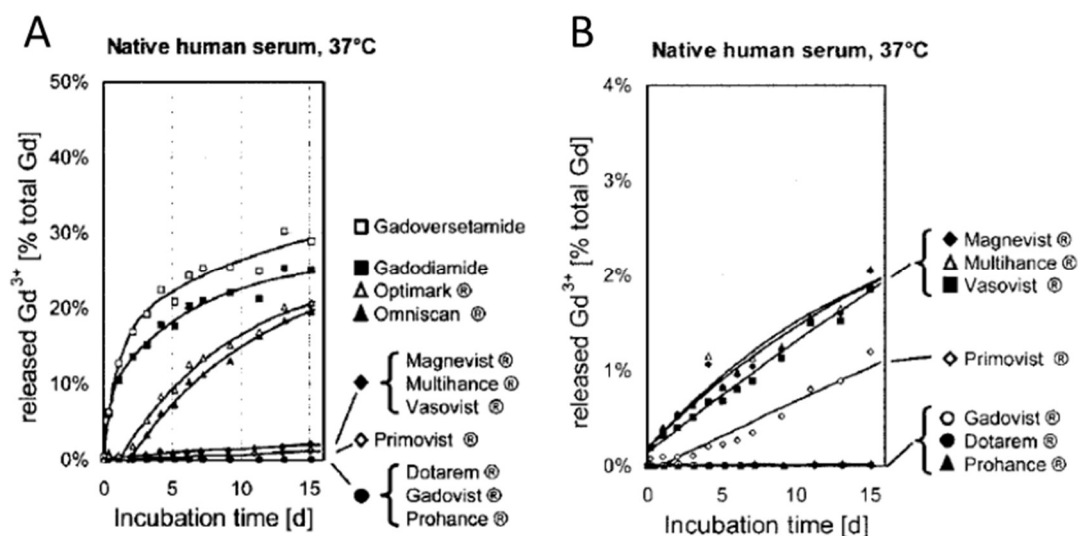


Figure 13 : (A) Evolution temporelle de la concentration de Gd dissocié rapportée à la concentration totale pour tous les chélates de Gd commercialisés incubés dans du sérum humain à 37°C. (B) Changement d'échelle pour l'observation du comportement des chélates macrocycliques et linéaires ioniques (Frenzel, 2008).

Comme illustré dans les figures précédentes, les chélates macrocycliques de Gd actuellement commercialisés sont cinétiquement beaucoup plus stables que les linéaires et les chélates ioniques thermodynamiquement plus stables que les chélates non-ioniques (Laurent, 2001; Idée, 2006 ; Wedeking, 1992 ; Port, 2008). Ainsi, en fonction du type de chélate administré lors d'une IRM, la quantité de Gd<sup>3+</sup> dissocié et se retrouvant sous forme « libre » dans l'organisme sera variable (en réalité, il ne peut pas être « libre » *stricto sensu* mais il s'associe, dans la femtoseconde, à une autre structure moléculaire).

Tableau 6 : Caractéristiques physico-chimiques des chélates de Gd (d'après Port, 2008).

DCI	Viscosité (37°C) (mPa/s)	Osmolalité (mOsm/kg)	log K <sub>therm</sub> (à pH 11,0)	log K <sub>cond</sub> (à pH 7,4)	T1/2 (h) (à pH 1,0 et 25°C)
Gadotérate	2,4	1350	25,6	19,3	338
Gadobutrol	5,0	1603	21,8	14,7	43
Gadotéridol	1,3	630	23,8	17,1	3,9
Gadobénate	5,3	1970	22,6	18,4	< 5s
Gadopentétate	2,9	1960	22,1	17,7	< 5s
Gadoxétate	1,2	688	23,5	18,7	< 5s
Gadodiamide	1,4	789	16,9	14,9	< 5s
Gadoversétamide	2,0	1110	16,6	15,0	< 5s
Gadofosveset	2,1	825	22,1	17,7	< 5s

Certains chélates sont commercialisés sous l'état dit « formulé » : un excès de ligand, libre ou complexé à du Ca<sup>2+</sup>, est alors ajouté à la solution pharmaceutique. Cet ajout permet de contrecarrer la libération éventuelle de Gd<sup>3+</sup>, en favorisant sa chélation par le ligand « libre », du moins dans le flacon avant l'administration au patient ; ou encore de piéger les impuretés métalliques susceptibles d'être générées lors des étapes de stérilisation, à forte température (c'est le cas du gadobutrol).



Tableau 7 : Nature et concentration des ligands « libres » ajoutés dans les solutions pharmaceutiques de certains chélates de Gd (Port, 2008).

DCI & Nom de marque	Excipient	Concentration (mmol/L)	Pourcentage
<b>Gadotérate (Dotarem®)</b>	-		
<b>Gadobutrol (Gadovist® (UE) / Gadavist®)</b>	Ca-BT-DO3A	1	0,1%
<b>Gadotéridol (ProHance®)</b>	Ca-HP- DO3A	0,5	0,1%
<b>Gadobénate (MultiHance®)</b>	-		
<b>Gadopentétate (Magnevist®)</b>	DTPA	1	0,2%
<b>Gadoxétate (Primovist® (UE) / Eovist® (US))</b>	Ca-EOB-DTPA	1,5	0,6%
<b>Gadodiamide (Omniscan®)</b>	Ca-DTPA- BMA	25	5%
<b>Gadovesétamide (OptiMARK)</b>	-	50	10%
<b>Gadofosveset (Vasovist® / Ablavar®)</b>	Fosveset	0,325	0,065%

## 5. Lien entre structure moléculaire et stabilité des chélates

Pour parler de stabilité générale des chélates de Gd, il faut donc tenir compte à la fois de la stabilité thermodynamique, et surtout de la stabilité cinétique.

La stabilité thermodynamique est surtout régie par la basicité du ligand (représentée par la somme des constantes de protonation des atomes donneurs, les constantes pKa) et donc la présence d'atomes durs (au sens de la terminologie de Pearson, comme les azotes et oxygènes chargés négativement) (Cacheris, 1990). Plus le ligand sera basique, plus sa liaison avec l'ion  $Gd^{3+}$  sera forte. Ainsi, le remplacement d'un groupe carboxylique par un groupe non chargé (amide, carbonyle ou autre), se traduira souvent par une moins bonne stabilité thermodynamique (Figure 14). C'est principalement le cas des chélates de Gd non-ioniques, dont le ligand est généralement moins basique, en comparaison avec les chélates ioniques qui possèdent un 4<sup>e</sup>, voire même un 5<sup>e</sup> groupe carboxylique sur le ligand polyaza-polycarboxylique, contribuant à ce que l'ion  $Gd^{3+}$  soit mieux retenu au sein du ligand (Port, 2008). De plus, le nombre de cycles possédant 5 éléments (CH<sub>2</sub>-N-Gd-N-CH<sub>2</sub> ou CH<sub>2</sub>-N-Gd-O-C), qui réduisent les contraintes stériques au niveau du chélate et qui induisent une rigidité conformationnelle élevée, joue également en faveur d'une stabilité thermodynamique (Figure 15) (Meyer, 1988 ; Port, 2008).



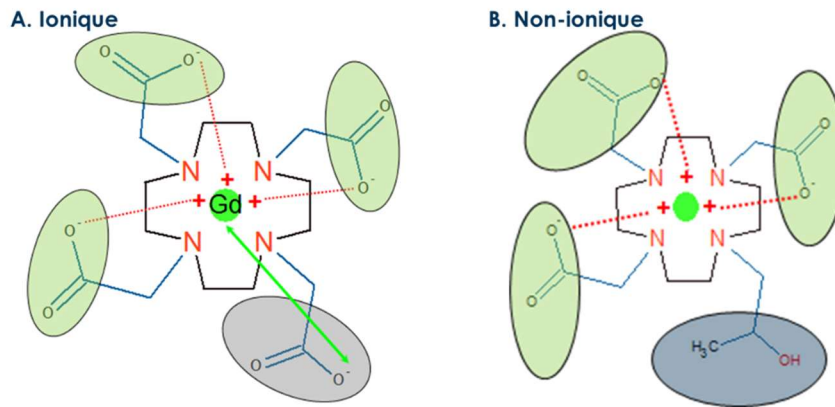


Figure 14 : Apport du groupe carboxylique des chélates ioniques dans le maintien de l'ion  $Gd^{3+}$  en son sein.

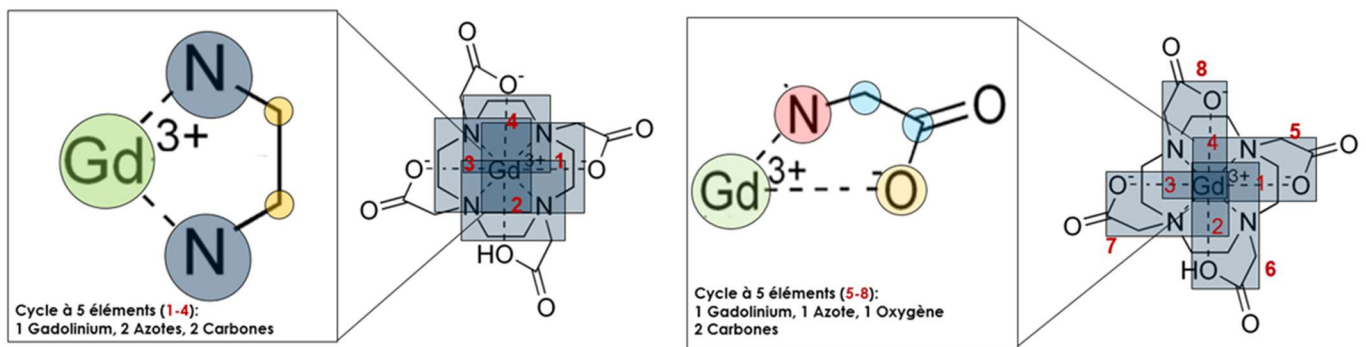


Figure 15 : Représentation des 8 cycles à 5 chaînons du gadotérate, chélate de Gd ionique et macrocyclique.

La composante cinétique de la stabilité du chélate s'explique, quant à elle, par la **conformation tridimensionnelle pré-organisée de la cavité interne des ligands macrocycliques**. En effet, la conformation de la sphère de coordination du ligand macrocyclique seul est très proche de celle formée par liaison à l'ion  $Gd^{3+}$ . Ce n'est pas le cas des molécules au ligand linéaire, intrinsèquement plus flexibles, qui voient leur espace conformationnel réduit sous l'effet de la chélation d'ions métalliques. Cette pré-organisation conformationnelle, associée à la rigidité de cette conformation conférée par la structure macrocyclique du cyclène (cycle de 12 chaînons tétraazacyclododécane), fait des ligands macrocycliques une structure particulièrement bien adaptée à la chélation d'un ion de géométrie sphérique comme le gadolinium, ce qui se répercute sur les paramètres cinétiques (Port, 2008).

Les chélates macrocycliques de Gd disponibles sur le marché sont donc cinétiquement plus stables que les chélates linéaires et ne se déchelèrent qu'après un délai très long.

## 6. Le phénomène de transmétallation : une histoire de compétition entre métaux

Une fois injecté par voie intraveineuse, un autre facteur intervient dans la stabilité des chélates de Gd. En effet, la présence de métaux endogènes, tels que le calcium, le fer, le cuivre, le zinc, dans le milieu biologique local, peut faciliter une déchélation. Les différents ligands des chélates de Gd ont également une certaine affinité pour les autres métaux, et, s'ils sont présents en concentration suffisante, ils vont avoir tendance à se dissocier de leur ion  $Gd^{3+}$ , pour se lier à l'un de ces métaux (M). C'est le phénomène de **transmétallation** (Équation 13).



Les constantes d'affinité  $K_{\text{therm}}$  de ligands pour lesquels la valeur est connue, sont présentées dans le *Tableau 8* ci-dessous. Encore une fois, plus le chélate de Gd est thermodynamiquement stable, moins le ligand sera enclin à échanger son métal pour un autre.

*Tableau 8 : Constantes de stabilités de différents ligands avec les métaux  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  (Port, 2008).*

	$\log K_{\text{therm}} \text{ GdL}$	$\log K_{\text{therm}} \text{ CaL}$	$\log K_{\text{therm}} \text{ CuL}$	$\log K_{\text{therm}} \text{ ZnL}$
<b>DOTA</b>	25,6	17,2	22,6	21,1
<b>HP-DO3A</b>	23,8	14,8	22,8	19,4
<b>BOPTA</b>	22,6	-	-	-
<b>DTPA</b>	22,1	10,8	21,4	18,3
<b>DTPA-BMA</b>	16,9	7,2	13,0	12,0

Une fois libéré de son ligand, l'ion  $\text{Gd}^{3+}$  se réassocie immédiatement à une autre entité. Cela peut-être des peptides, des protéines, ou encore des anions qui formeront avec le Gd un précipité : le carbonate  $\text{CO}_3^{2-}$  formera du  $\text{Gd}_2(\text{CO}_3)_3$ , l'hydroxyde  $\text{OH}^-$  formera du  $\text{Gd}(\text{OH})_3$ , ou encore l'anion phosphate  $\text{PO}_4^{3-}$  qui formera le sel  $\text{GdPO}_4$ . Selon l'entité à laquelle il s'associe, le  $\text{Gd}^{3+}$  peut devenir plus biologiquement réactif, ou bien plus inerte.

En termes de relaxivité, dans le cas de la liaison du Gd avec une macromolécule endogène, la valeur de la vitesse de relaxation  $R_{1,2}$  sera maintenu, voire même probablement augmentée, selon la masse moléculaire de celle-ci. En effet, le temps de corrélation rotationnelle  $\tau_R$  sera plus important, comme décrit dans le chapitre précédent. Cependant, si le Gd précipite et devient donc insoluble, il a beaucoup moins facilement accès aux protons de l'eau environnants, et sa relaxivité  $r_1$  chute alors. Cela a été démontré *in vitro*, par des études de relaxométrie (Laurent, 2010 ; Robic, 2011). En revanche, un effet  $T2^*$  ne peut être exclu, notamment à haut champ magnétique (Dumoulin, 2018).

#### D. Pharmacocinétique et distribution

Il est classiquement admis que les chélates de Gd non-spécifiques, une fois administrés par voie intraveineuse, sont rapidement distribués dans le compartiment extracellulaire, puis éliminés par les reins par filtration glomérulaire simple, sans subir aucun métabolisme. Ils sont ainsi éliminés en quasi-totalité en quelques heures (la demi-vie d'élimination  $T_{1/2\beta}$  est d'environ 1h30 chez l'Homme sain et de 20 minutes chez le Rat sain) (Oksendal et Hals, 1993 ; Idée, 2009a). Chez le patient insuffisant rénal, l'excrétion est réduite, et la demi-vie ainsi allongée jusqu'à plus de 30h en cas d'insuffisance rénale terminale (débit de filtration glomérulaire  $\leq 15 \text{ mL/mn}/1,73 \text{ m}^2$ ) (Joffé, 1998).

Pour ce qui est des agents de contrastes hépato-spécifiques, le gadoxétate est éliminé à 50% par voie hépatobiliaire (Bashir, 2014), après captation par les hépatocytes et à 50% par voie rénale. Il présente une demi-vie  $T_{1/2\beta}$  d'environ 1h chez le volontaire sain (Hamm, 1995). Le gadobénate, éliminé à moins de 4% par voie hépatobiliaire chez l'Homme (Kirchin, 1998 ; Spinazzi, 1999), contre près de 50% chez le Rat (Lorusso, 1999), a une demi-vie du même ordre que celles des chélates non-spécifiques ( $T_{1/2\beta} = 1,9\text{-}2 \text{ h}$ ) (Spinazzi, 1999, Idée, 2009a).

Les chélates de Gd sont classiquement décrits comme ne pouvant pas passer la barrière hématoencéphalique saine, mais susceptibles de traverser la barrière transplacentaire. Chez la femme allaitante, les chélates de Gd accèdent au lait maternel, avec une demi-vie d'élimination d'environ 1h30 également.



Le Tableau 9 ci-dessous résume les principales caractéristiques des chélates de Gd actuellement commercialisés.

Tableau 9 : Principaux paramètres pharmacocinétiques des chélates de Gd chez le patient adulte avec fonction rénale normale, après administration intraveineuse (Idée, 2009a).

Paramètre	Chélates de Gd non spécifiques	Gadoxétate	Gadobénate
$T_{1/2\alpha}$ (mn)	3-7	N/A	28,8-36,6
$T_{1/2\beta}$ (h)	1,2-2	0,95	1,9-2,0
Vd (mL/kg)	190-280	210	260-280
Cl <sub>r</sub> (mL/mn/kg)	1,5-1,9	~1,7	N/A
Cl <sub>t</sub> (mL/mn/kg)	1,6-1,9	~3,6	~1,6

Abréviations : Cl<sub>r</sub>= clairance rénale ; Cl<sub>t</sub>= clairance totale ;  $T_{1/2\alpha}$  : demi-vie de distribution ;  $T_{1/2\beta}$  = demi-vie d'élimination ; Vd = volume de distribution.





## Chapitre 3 : Toxicologie du Gadolinium et de ses chélates

Les chélates de Gd ont le statut de **médicaments** au sens du Code de la Santé Publique en France, mais aussi au niveau international, puisqu'à visée diagnostique :

« *On entend par médicament toute substance [...] pouvant être utilisée chez l'Homme ou chez l'animal, ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique* » (article L.5111-1 du Code de la santé Publique).

Cela implique qu'ils doivent être soumis au même processus d'enregistrement réglementaire que les médicaments à visée thérapeutique.

Les produits de contraste ont pour unique objectif de fournir le meilleur contraste possible lors d'un examen d'imagerie et la plus forte inertie toxicologique. Ils ne doivent pas être stockés dans l'organisme, mais totalement éliminés.

« *The different gadolinium complexes on the market all have comparable pharmacodynamic and diagnostic properties. They are outstandingly well tolerated.* », pensait-on, dans les années 1990 (Caillé, 1994). Un autre article indiquait, en 1999, que les chélates de Gd sont « *one of the safest classes of drugs ever developed* » (Caravan, 1999). Nous allons maintenant voir que, dans les faits, cela n'est hélas plus si simple, bien au contraire.

Quand il s'agit de discuter la toxicité du gadolinium, il convient de distinguer la toxicité aiguë de celle qui survient tardivement ou après des administrations répétées de ce lanthanide, et qui fait l'objet de cette thèse.

### A. Toxicité des lanthanides

La toxicité des lanthanides est jugée « légère » selon l'échelle de Hodge et Sterner (Bulman, 2003). On leur a même découvert des propriétés antiémétiques, bactéricides, anticoagulantes, ou encore anti-tumorales (Bulman, 2003). Cependant, cela repose notamment sur leurs propriétés biochimiques et leur capacité d'inhibition des ATPases calciques. Après administration, les lanthanides s'accumulent principalement dans l'os ou le foie, selon leur affinité et leur taille (les ions les plus acides et les plus petits vont s'accumuler plutôt dans le foie, tandis que les plus basiques et les plus gros iront préférentiellement dans l'os, les poumons ou encore la rate). Ils s'avèrent toxiques, quels que soient le lanthanide et la voie d'administration (Bulman, 2003). Par exemple, la présence de cérium en trop grande quantité dans l'alimentation en Inde serait un facteur contributif au développement de la fibrose endomyocardique (Valiathan, 1989). *In vitro* et *in vivo* chez le Rat, le chlorure de cérium  $\text{CeCl}_3$  promeut en effet la synthèse protéique et celle du collagène cardiaque (Kumar, 1995). Le chlorure de terbium  $\text{TbCl}_3$  injecté par voie intraveineuse chez le Rat provoque la peroxydation de lipides pulmonaires (Shimada, 1996), tandis qu'un effet génotoxique a été mis en évidence *in vitro* pour le chlorure de terbium  $\text{TbCl}_3$  et le chlorure d'yttrium  $\text{YCl}_3$  (Yang, 1998). Par inhalation, le chlorure de lanthane  $\text{LaCl}_3$  engendre une fibrose pulmonaire, dont les effets se prolongent longtemps, plus de 8 mois (Haley, 1991 ; Suzuki, 1992).



## B. Toxicité du Gd<sup>3+</sup> documentée par l'étude du chlorure de Gd, le GdCl<sub>3</sub>

Du fait de son rayon ionique (107,8 pm) proche de celui du Ca<sup>2+</sup> (114 pm), le Gd<sup>3+</sup> présente de nombreux effets toxiques aigus (Spencer, 1997 ; Idée, 2009b). Il bloque ainsi les canaux calciques voltage-dépendants et ceux sensibles à l'étirement et, par conséquent, les très nombreux processus physiologiques calcium-dépendants, provoquant notamment l'inhibition de la coagulation, de la contraction musculaire (lisse, squelettique et cardiaque), de la neurotransmission (inhibition de l'influx nerveux à des concentrations nano- ou micro-molaires) (Lansman, 1990 ; Biagi, 1990). Il peut également inhiber des enzymes activées par le calcium (certaines déshydrogénases, les glutathion-S-transférases, il se lie à la fois aux sites de transport du calcium et sur le site catalytique de la Ca<sup>2+</sup>-ATPase (adénosine triphosphatase) (Ogurusu, 1991). Il inhibe aussi certaines cytokines ou des facteurs de transcription (Haley, 1961 ; Rai, 1996 ; Spencer, 1997 ; Palasz, 2000 ; Adding, 2001 ; Idée, 2006 ; Kuo, 2007). Le Gd<sup>3+</sup> inhibe la respiration cellulaire, et déprime le système réticulo-endothélial, inhibant le processus de phagocytose (Evans, 1990 ; Husztik, 1980). Cette dernière propriété du Gd est d'ailleurs amplement utilisée dans les études concernant les propriétés macrophagiques du foie, assurées par les cellules de Küpffer (Hardonk, 1992). Le Gd<sup>3+</sup> est également inhibiteur de canaux co-transporteurs K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> (mis en évidence sur une culture de neurones médullaires de Rat), provoquant une augmentation des concentrations intracellulaires des ions chlorure (Ishibashi, 2009). Le Gd<sup>3+</sup>, issu de la déchélation du gadopentétate, aurait également la capacité d'inhiber des canaux épithéliaux Na<sup>+</sup> chez l'Homme, *via* une liaison de forte affinité à des résidus histidine et cystéine de cette protéine transmembranaire (Knoepp, 2017).

Au niveau tissulaire, le Gd est susceptible d'induire la minéralisation des lits capillaires, surtout au niveau du foie et de la rate, ainsi que de stimuler la prolifération de fibroblastes, pouvant engendrer à des lésions de fibrose (Spencer, 1997 ; Varani, 2009).

Il a, plus récemment, été suggéré que le Gd pouvait promouvoir l'apoptose cellulaire hépatique par effet d'ouverture des pores de transition de la perméabilité mitochondriale, par liaison du Gd<sup>3+</sup> à des groupements thiols de protéines membranaires, ainsi qu'à des lipides anioniques (Zhao, 2014).

## C. Toxicité aigüe des chélates de Gadolinium

### 1. Dose létale 50%

La toxicité aigüe est dans un premier lieu, classiquement évaluée par la mesure de dose létale 50%, ou « DL<sub>50</sub> », dose unique pour laquelle on relève la mort de 50% des animaux. Le Gd<sup>3+</sup> est très toxique, probablement car son rayon ionique est de 107,8 pm, très proche de celui du Ca<sup>2+</sup>, qui est de 114 pm (Lück, 2010 ; Caravan, 1999).

Ainsi, la DL<sub>50</sub> du GdCl<sub>3</sub> administré par voie intraveineuse chez le Rat n'est que de 0,38 mmolGd/kg. En l'associant à un ligand, le Gd est bien mieux toléré, d'un facteur 20 (Bousquet, 1988): ainsi la DL<sub>50</sub> par voie intraveineuse de ces molécules est, au minimum, de 8 mmolGd/kg (pour le DTPA-Gd, ou gadopentétate) (Gries, 2002), sachant que la dose clinique est de 0,1 mmolGd/kg. En préclinique, il faut cependant tenir compte de facteurs tels que la surface corporelle de l'espèce, pour calculer l'équivalent de cette dose (recommandations de la FDA, 2005). Cela revient ainsi à 0,6 mmolGd/kg chez le Rat, et 1,2 mmolGd/kg chez la Souris.

L'ajout d'un excès de ligand dans la formulation pharmaceutique de certains chélates de Gd augmente leur tolérance systémique. Le ligand libre agit d'une part « comme une éponge », en chélatant le Gd susceptible de se dissocier quand il est encore en solution pharmaceutique, et d'autre part, en déplaçant l'équilibre thermodynamique vers la formation d'un chélate stable (Cacheris, 1990 ; Okasaki, 1996 ; Idée, 2006).



Les ligands « libres » présentent cependant, eux aussi, une DL<sub>50</sub> faible, donc une toxicité aiguë élevée, quand ils sont injectés seuls : 0,5 mmol/kg pour le DTPA administré par voie intraveineuse chez le Rat, par exemple (Gries, 2002).

## 2. Effets cardiovasculaire, hémodynamique et rénal

Des effets cardiovasculaires et hémodynamiques transitoires ont été évoqués après administration unique de gadodiamide ou de gadopentetate diméglumine chez le Chien, tels qu'une diminution de la pression artérielle, des résistances vasculaires pulmonaire et systémique (Harpur, 1993), mais sans qu'un groupe témoin iso-osmolaire prenant en compte l'aspect volémique ou qu'un témoin d'osmolalité soient associés. Du fait de leur hyperosmolalité, on peut en effet s'attendre à un effet hémodynamique associé à l'injection de chélates de Gd, aux doses élevées testées. En fait, comme mentionné plus haut, à la dose clinique, la charge osmotique associée à ces agents est nettement plus faible que celle des agents de contraste iodés, injectés sous un volume plus élevé (Port, 2008). De plus, il apparaît que les effets cardiovasculaires observés sont plutôt liés à la chélation d'une partie du calcium endogène par le ligand, qu'à l'osmolalité de la solution (Mühler, 1992 ; Idée, 1998).

Enfin, chez l'Homme, quelques cas anecdotiques d'insuffisance rénale aiguë ont été relevés chez des patients préalablement insuffisants rénaux (Ledneva, 2009), mais, globalement, la tolérance hémodynamique et rénale de ces agents est bonne (Bourrinet, 2007 ; Chachuat, 1992 ; Deray, 1990).

## 3. Effets indésirables et réactions d'hypersensibilité

Il s'agit là d'un sujet qui a fait l'objet de nombreux travaux et de controverses récurrentes.

La Figure 16 ci-dessous résume les entités nosologiques regroupées sous le terme générique d'« **hypersensibilité** ». La distinction entre ces différentes entités est importante pour la prédiction du risque, en pratique clinique.



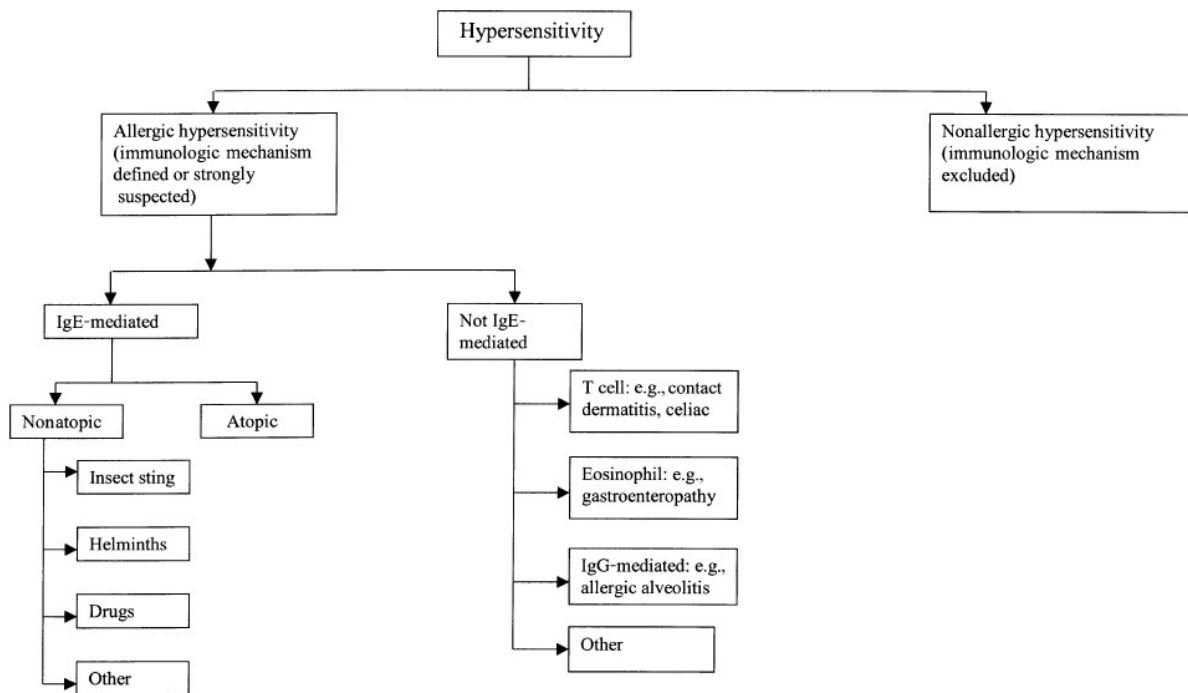


Figure 16 : Réactions englobées sous le terme d'hypersensibilité (Johansson, 2001).

Les réactions d'hypersensibilité immédiate consécutives à l'injection intraveineuse des chélates de Gd, surviennent dans moins de 2,4% des cas (Galera, 2010). Des réactions immédiates qualifiées de chimio-toxiques peuvent se traduire par des maux de tête, des nausées et vertiges, des sensations de froid ou de chaleur. Les réactions d'hypersensibilité modérées, intervenant dans moins de 0,03% des cas, consistent en une réponse immunitaire avérée, un bronchospasme, la survenue d'un érythème, ou encore un œdème laryngé. Les réactions sévères, menaçant la survie, surviennent dans moins de 0,01% des cas (ACR, 2018). Elles consistent en une hypotension profonde, une perte de conscience, la survenue d'une arythmie, ou encore en un arrêt cardiopulmonaire. Des chocs de type anaphylactiques avec chute des résistances vasculaires systémiques et arrêt cardio-circulatoire peuvent survenir. La prévalence de mortalité liée aux agents de contraste IRM est inférieure à 1 sur un million (Costello, 2016).

Des travaux récents indiquent que le grade de sévérité des réactions d'hypersensibilité immédiate aux chélates de Gd ne diffère pas de celui des réactions associées aux agents de contraste iodés, avec une fréquence similaire de signes cliniques (Clément, 2018).

Il est important qu'après la survenue d'une réaction d'hypersensibilité immédiate, des examens (incluant un suivi) biochimiques et allergologiques (tests cutanés) soient menés afin de tenter d'élucider le mécanisme de cet effet et d'en éviter une possible survenue ultérieure (Clément, 2018).

## D. Toxicité chronique des chélates de Gd

### 1. Etudes de toxicologie réglementaires

Les études menées sur l'évaluation préclinique de l'usage de ces produits ont parfois révélé quelques alertes potentielles de toxicité subaiguë à doses élevées administrées de façon répétées. En effet, une injection par jour pendant 3 ou 4 semaines de chélates de Gd à des doses de 1 à 5 mmolGd/kg chez le rongeur voit la survenue d'effets délétères sur l'estomac, la vessie, le foie, le poumon, le pancréas, le rein, les



testicules, avec la survenue de vacuolisations par exemple (Harpur, 1993). Les études ne démontrent cependant aucun effet mutagène, génotoxique, ni sur la fertilité. Pour le gadodiamide, des lésions cutanées apparaissent, ayant initialement évoqué un trouble du métabolisme du zinc (Harpur, 1993).

Quant aux études d'excrétion après administration unique à dose clinique, elles indiquent que 95,4 à 99,8% du produit administré sont éliminés en 21 jours (Harpur, 1993). Une accumulation sur le moyen terme dans l'os, le rein, le foie sont connus pour les chélates linéaires, mais elle a été initialement jugé non alarmante. En ce qui concerne le cerveau, étant donné la faible dose injectée dans ces études, et les limites de détections ne permettant pas, à l'époque, l'étude de traces, aucune accumulation à 24h n'a été détectée, même si l'on en retrouve pour des délais plus précoces (Tweedle, 1995 ; Harpur, 1993 ; Allard, 1988). La tolérance neurologique est évaluée par injection intracisternale (dans le LCR) à dose clinique, et ne montre pas de signe comportemental (Harpur, 1993).

Toutefois, une étude ancienne a concerné la distribution au sein du SNC du Rat par fractionnement cellulaire, après une injection intracisternale de gadotérate (Allard, 1987). Elle révèle que 6% de la dose administrée se trouvent dans le parenchyme cérébral 30 minutes après injection, alors que 2h et 24h après, 0,2% sont retrouvés. Parmi ces 6%, 3,7% sont présents dans la partie soluble (le fluide interstitiel et cytoplasmique), 2% seraient dans le noyau ou le cytosquelette, 0,15% dans une fraction que les auteurs pensent être les mitochondries, et enfin 0,1% dans le réticulum endoplasmique. L'hypothèse proposée était que le chélate de Gd, sous sa forme intacte soit rapidement éliminé du parenchyme cérébral, tandis qu'une petite portion qui serait déchélatée, se retrouve accumulée sur un plus long terme, dans les organites où l'on trouve principalement le calcium. Cette étude n'était pas comparative (Allard, 1987).

## 2. Effets toxiques des chélates de Gd occasionnellement observés

Certains effets toxiques chroniques des chélates de Gd diffèrent de ceux provoqués par le  $Gd^{3+}$  seul. Ainsi, une étude chez la Moule *Dreissena polymorpha* a mis en évidence la production de dérivés réactifs de l'oxygène en présence de gadodiamide, aboutissant à un effet pro-inflammatoire. Cette même étude montre au contraire un effet anti-oxydant et la mise en place de mécanismes de détoxification de l'organisme lorsqu'il est mis en présence de chlorure de Gd (Hanana, 2017).

Une étude métabolomique exploratoire par résonance magnétique nucléaire réalisée sur le sérum et l'urine de rats ayant reçus 2 ou 5 mmolGd/kg de gadopentétate diméglumine (DTPA-Gd, chélate linéaire), ou 0,1 mmolGd/kg de  $GdCl_3$ , a mis en évidence plusieurs effets liés à la dose (Wan, 2017). Ainsi, une altération du métabolisme des lipides, avec modification du cycle de l'acide citrique et survenue d'une hyperlipidémie sont notées suite à l'injection de gadopentétate, alors que l'on observe le contraire dans le cas de  $GdCl_3$ . Une diminution de la concentration sérique du glucose et des produits de la glycolyse est notée dans les deux cas, ainsi que celle des acides aminés ramifiés, impliqués dans la stimulation du système immunitaire et du métabolisme glutamate/glutamine. En cas d'injection de gadopentétate, ce métabolisme est orienté en faveur de l'élévation du glutamate plutôt que de la glutamine, potentiellement pour répondre à des dommages d'ordre oxydatif, alors que le contraire se produit suite à l'injection de  $GdCl_3$ . Le microbiote intestinal est lui aussi perturbé dans le cas d'une injection du chélate linéaire de Gd. Tous ces effets se sont avérés transitoires.



### 3. La Fibrose Systémique Néphrogénique : une première crise sanitaire

Alors que les chélates de Gd avaient été évalués comme suffisamment bien tolérés pour l'usage pour lequel ils étaient destinés en clinique, ils ont été mis sur le marché, et effectivement, tout s'est bien déroulé... Jusqu'à ce qu'on découvre que tout ne se passait pas comme prévu.

La première crise sanitaire concernant les chélates de Gd fut la découverte fortuite du lien causal entre certains de ces molécules et une pathologie connue depuis 2000 (Cowper, 2000), la fibrose systémique néphrogénique (FSN). La FSN est une maladie rare mais sévère, se manifestant uniquement chez des patients souffrant d'insuffisance rénale sévère ou terminale, et ayant reçu au moins une administration de certains chélates de gadolinium (les chélates linéaires) (Girardi, 2011).

#### A. Contexte historique

Les premiers cas, découverts rétrospectivement, ont été diagnostiqués en Californie en 1997 (soit une dizaine d'années après l'apparition des premiers chélates de Gd sur le marché), chez 14 patients dialysés. Ils furent décrits comme atteints d'une « dermatopathie fibrosante néphrogénique » (Cowper, 2000), nouvelle maladie initialement décrite comme survenant exclusivement chez des patients insuffisants rénaux et uniquement au niveau cutané. En 2003 cependant, il a été admis que cette pathologie affecte également d'autres organes (les poumons, par exemple), est associée à des contractures très invalidantes, et elle prit alors le nom de Fibrose Systémique Néphrogénique (Cowper, 2005). Ce n'est qu'en 2006 qu'un lien causal entre la survenue de cette pathologie et l'administration préalable de chélates de gadolinium, linéaires uniquement, a été suggéré (Grobner, 2006 ; Marckmann, 2006). La FSN concerne tous les groupes d'âge et ne semble pas avoir de prédilection particulière pour une zone géographique, une race ou un sexe (Abu-Alfa, 2011).

#### B. Caractéristiques cliniques de la Fibrose Systémique Néphrogénique

Les premiers symptômes de la pathologie se manifestent le plus souvent entre 2 et 10 semaines après l'administration d'un chélate de Gd linéaire peu stable (mais des délais beaucoup plus tardifs ont été décrits). Ils consistent en une décoloration ou une hyperpigmentation, un épaissement et une induration douloureux de la peau, au niveau des extrémités distales des membres inférieurs. La pathologie s'étend ensuite progressivement aux membres inférieurs, à l'avant-bras, puis au tronc (jamais la tête ou les épaules) (Girardi, 2011). On note notamment, au niveau cutané, une sclérose du derme avec un aspect en « peau d'orange », des colorations claires et brunâtres, des plaques et des papules érythémateuses (Cowper, 2008). Les lésions s'étendent, accompagnées d'une sensation de brûlure.

De plus, des contractures musculaires et articulaires réduisent peu à peu la mobilité du patient, le confinant souvent au fauteuil roulant. Des plaques oculaires scléales jaunes apparaissent parfois chez de jeunes patients (Girardi, 2011). Les muscles striés, le cœur, les poumons et les reins peuvent être atteints par des lésions fibrosantes (Levine, 2004), pouvant mener à des cardiomyopathies voire même une paralysie du diaphragme, rendant, bien sûr, la situation du patient beaucoup plus critique.







Figure 17 : Manifestations cliniques de la FSN (d'après Cowper, 2008 et Girardi, 2011)

### C. Caractéristiques histologiques

Pour poser le diagnostic, des analyses histologiques doivent être réalisées à partir d'une biopsie cutanée. Les lésions observées se caractérisent par un épaissement du derme associé à une augmentation de la cellularité, des amas de fibres élastiques et de collagène désorganisées (Cowper, 2008). S'infiltrent également dans ces tissus des cellules CD34 positives, cellules fusiformes provenant de la moelle osseuse, appelées fibrocytes circulants (Ortonne, 2004). Ces tissus présentent également une surexpression du facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF $\beta$ ), marqueur phare de la fibrose (Kelly, 2008 ; Levine, 2004 ; Schieren, 2009). Des métaplasies osseuses sont plus rarement observées, formant des structures calcifiées denses d'ostéoïdes entourés par des ostéoblastes, ovales ou ronds, d'où leur appellation de « lésions en sucette » (Grekin, 2012; Wiedemeyer, 2009). Elles sont très caractéristiques de la FSN.

Le diagnostic de cette pathologie étant difficile, un système de scores clinique et histopathologique a été publié (Girardi, 2011).

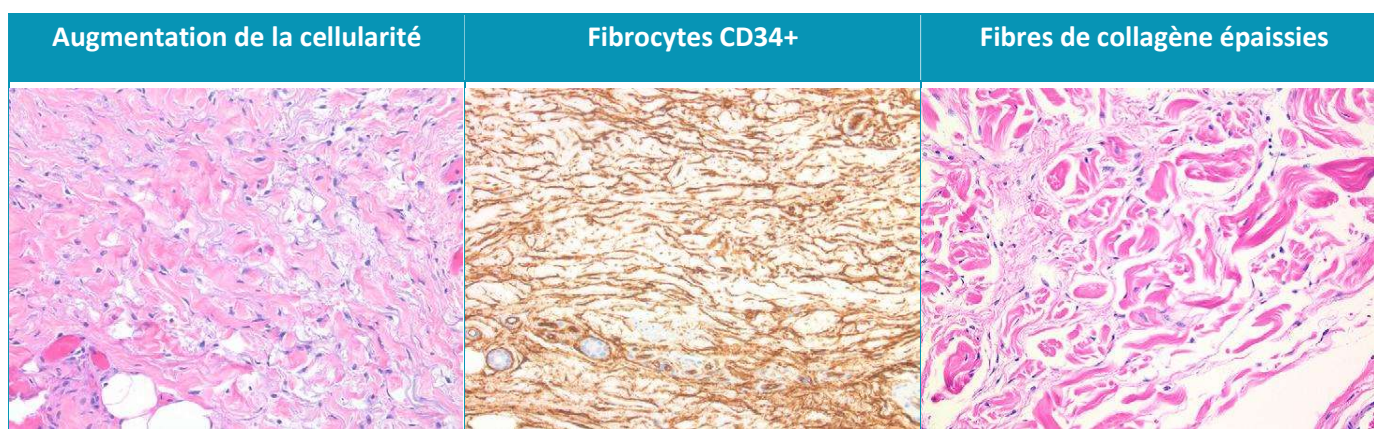


Figure 18 : Principales caractéristiques histopathologiques de la FSN (d'après Girardi, 2011).

## D. Cofacteurs de la FSN

Le principal facteur de risque clinique associé à la FSN est la préexistence d'une **insuffisance rénale sévère ou terminale** (Cowper, 2007), mais également une concentration sérique élevée de phosphate (Marckmann, 2006) ou de calcium (Swaminathan et Shah, 2007). On trouve aussi un contexte pro-inflammatoire ainsi que, parfois, des antécédents de thrombose veineuse profonde (Sadowski, 2007). L'administration de chélates de gadolinium préalable à l'apparition de la FSN est toujours rapportée (Marckmann, 2006 ; Abu-Alfa, 2011). Par ailleurs, le risque et la sévérité de la FSN semblent liés à la dose cumulée de chélate de Gd administrée (Collidge, 2010).

### a) Insuffisance rénale et survenue de la FSN

La FSN ne survient que chez des patients souffrant d'insuffisance rénale chronique ou aiguë, le plus souvent sous hémodialyse ou dialyse péritonéale. La quasi-totalité des cas ont été rapportés chez des patients aux stades 4 ou 5 d'insuffisance rénale chronique, c'est à dire dont le débit de filtration glomérulaire, ou DFG, est égal ou inférieur à 30 mL/min/1,73m<sup>2</sup>. Ce lien entre FSN et insuffisance rénale s'expliquerait (peut-être en partie seulement) par le fait que chez ces patients, l'élimination urinaire des chélates de Gd suite à leur injection intraveineuse est bien plus lente que chez les patients dont la fonction rénale est normale, ce qui conduit à une augmentation du temps d'exposition de l'organisme au produit. Ainsi, la demi-vie d'excrétion des chélates de Gd peut être multipliée par 4 chez un patient souffrant d'insuffisance rénale chronique de stade 3 (Chachuat, 1992).

### b) Chélates de gadolinium et survenue de la FSN

De nombreuses analyses rétrospectives ont rapidement suivi l'article *princeps* de Grobner (Grobner, 2006), confirmant ce lien causal. La présence de gadolinium a notamment été observée dans des biopsies de patients souffrant d'une FSN (Abraham, 2008a; High, 2007). Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a permis de déterminer de façon certaine chez l'Homme la forme du Gd directement impliquée dans la pathologie (chélatée, libre soluble ou insoluble).

Plus de 1600 cas ont été recensés à ce jour. On dénombre notamment plus de 500 cas dits « purs » sur 49 millions d'administrations de gadodiamide (c'est-à-dire associés à ce seul chélate de Gd, signant ainsi un lien causal direct) ; environ 180 cas « purs » sur 105 millions pour le gadopentétate et 35 cas sur 3,5 millions d'administrations dans le cas du gadoversetamide (Endrikat, 2018). Les cas de FSN associés aux agents macrocycliques sont très rares voire inexistants comme pour le gadotérate.

## E. Hypothèses mécanistiques de la FSN

Le mécanisme précis de cette maladie n'est toujours pas complètement élucidé.

L'hypothèse la plus courante implique une dissociation *in vivo* des chélates les moins stables (Fretellier, 2011b; High, 2007; Sieber, 2008). Plusieurs études vont dans le sens de cette hypothèse, tout en se complétant. Le rôle des métaux endogènes et d'une transmétallation est souvent soulevé. Il a été montré, sur un modèle murin, que l'administration intraveineuse de fer et d'érythropoïétine amplifie la FSN (Hope, 2009), alors que l'injection d'un chélateur du fer (la défériprone) prévient la FSN (Bose, 2015). Par ailleurs, la présence de Gd<sup>3+</sup> dissocié et insoluble, souvent associé à du phosphate ou du calcium, a été mise en évidence dans les tissus de patients souffrant de FSN (Abraham, 2008b; George, 2010).





A cause de l'insuffisance rénale associée, les chélates de Gd seraient difficilement éliminés de l'organisme et s'accumuleraient dans différents tissus, par exemple le foie, ou dans l'os à cause de l'affinité particulière du Gd pour ces tissus (Vidaud, 2012).

Un mécanisme général de la pathologie est proposé en Figure 19. L'insuffisance rénale, associée à certains facteurs de risque tels que l'augmentation, dans la circulation sanguine de phosphate, de fer, d'érythropoïétine (EPO), ou, dans les tissus, de zinc ou de glycosaminoglycanes, favoriserait la dissociation des chélates de Gd les moins stables thermodynamiquement (donc les agents linéaires). Le Gd déchélaté est capté par les macrophages, induisant ainsi une libération de cytokines profibrosantes. La synthèse de collagène en excès en est favorisée, ainsi que la prolifération de fibroblastes, menant à une fibrose des tissus.

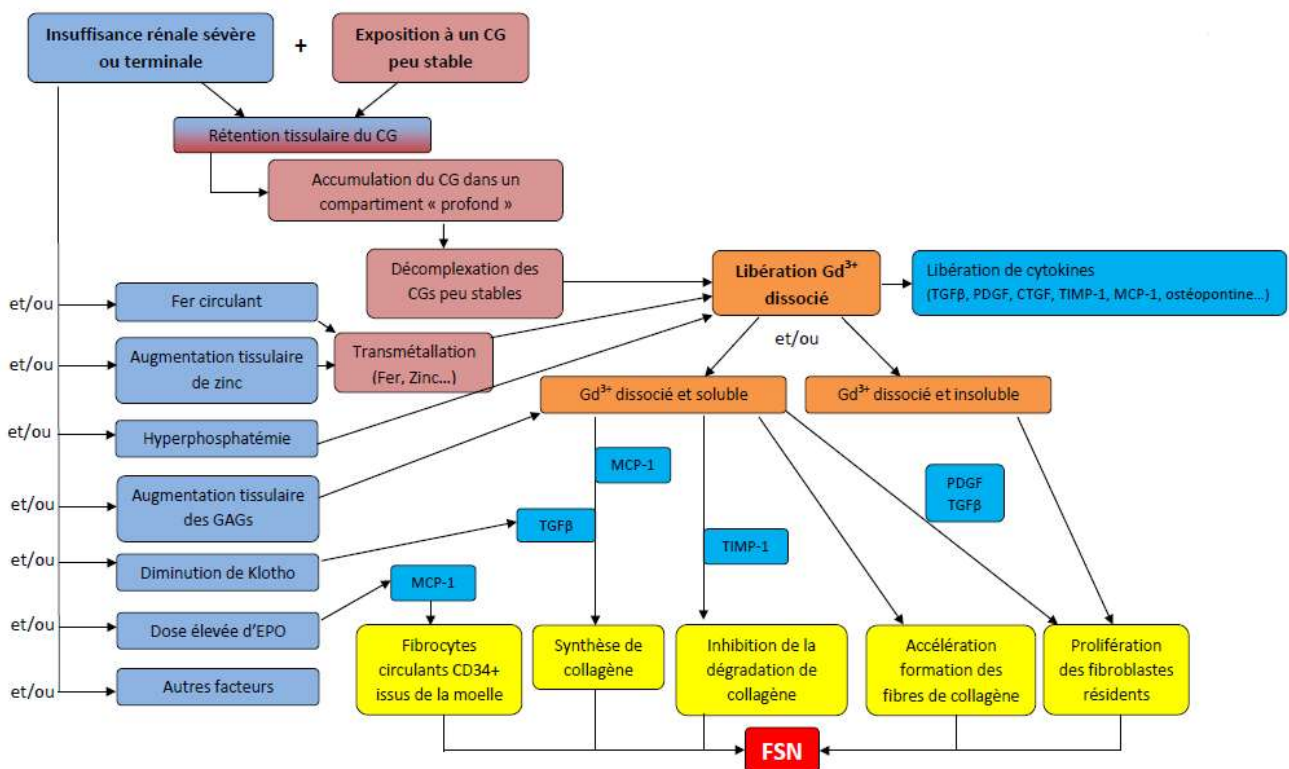


Figure 19 : Mécanisme schématisé de la fibrose systémique néphrogénique sur la base des données avérées (Fretellier, 2013).



## F. Traitements disponibles

A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif reconnu de la FSN. Cependant, certaines approches thérapeutiques ont parfois conduit à des améliorations cliniques (Schieren, 2009). On trouve notamment dans la littérature des succès associés à la transplantation rénale (Bangsgaard, 2011; Cuffy, 2011) la plasmaphérèse (Baron, 2003), ou encore au traitement par l'imatinib, un inhibiteur de tyrosine kinases (Kay et High, 2008), qui tous ralentiraient l'évolution de la pathologie et induiraient même parfois la réversibilité de certains symptômes. En fait, le meilleur traitement est préventif, par l'éviction des chélates de Gd linéaires chez les patients insuffisants rénaux dont le DFG est égal ou inférieur à 30 mL/mn/1,73 m<sup>2</sup>. Il apparaît d'ailleurs que la mise en place de ces mesures par les autorités sanitaires au niveau international a conduit à la quasi-disparition de cette pathologie (Thomsen, 2016).

## G. Recommandations des autorités de santé

En décembre 2007, après avoir reconnu que le risque de développer une FSN dépend du type de chélate de Gd utilisé, le Comité des Médicaments à usage Humain de l'EMA a établi une classification en trois groupes de risque (EMA, 2010):

- Elevé: gadoversétamide (OptiMARK®), gadodiamide (Omniscan®) et gadopentétate (Magnevist®); contre-indiqués pour un DFG  $\leq 30$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup>.
- Modéré: gadofosveset (Vasovist®, Ablavar®), gadoxétate (Primovist®) et gadobénate (MultiHance®)
- Faible: gadotérate (Dotarem®), gadotéridol (ProHance®) et gadobutrol (Gadovist®), correspondant aux 3 agents macrocycliques commercialisés.

L'EMA et la FDA ont ainsi pris des mesures, avec la contre-indication des chélates de Gd à haut risque pour les patients atteints d'insuffisance rénale aiguë ou chronique sévère, et un dépistage fortement recommandé de toute pathologie rénale du patient avant l'administration d'un chélate de gadolinium (Yang, 2012). Depuis, quasiment plus aucun cas n'a été recensé.



## Chapitre 4 : Introduction à la capture cérébrale des chélates de Gd

En janvier 2014, la parution d'un article vint interrompre le calme qui était revenu dans la communauté radiologique, après la tempête qu'avait provoquée la fibrose systémique néphrogénique. Une équipe japonaise suggéra en effet l'accumulation progressive de gadolinium dans des structures cérébrales saines, au cours d'injections répétées de chélates de Gd (Kanda, 2014). C'est alors qu'une agitation notable reprit...

### A. Données cliniques concernant la capture cérébrale des chélates de Gd


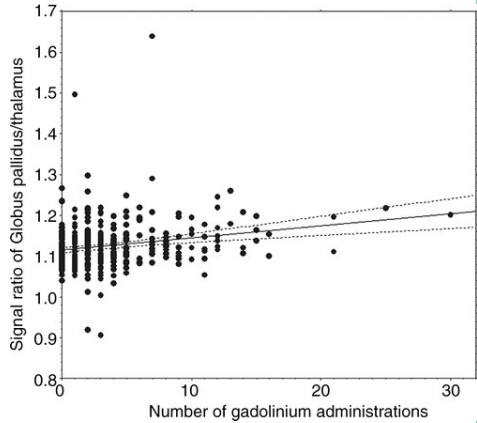

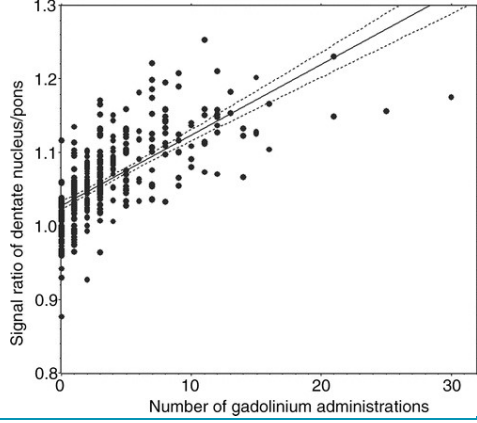
Le premier article est publié en janvier 2014, par l'équipe du Dr Tonomori Kanda, radiologue à l'hôpital d'Akashi, dans la préfecture d'Hyōgo, au Japon (Kanda, 2014). Cette équipe a mené une étude rétrospective, menée sur une cohorte de 381 patients présentant une histoire de néoplasie cérébrale. Des examens IRM non-injectés et pondérés T1 ont ainsi été réalisés pour évaluer la taille tumorale ou la recherche de nouvelles métastases. Parmi ces patients, 2 groupes ont pu être constitués. Le premier était composé de 19 sujets (sans insuffisance rénale) ayant reçu exclusivement de gadopentétate (Magnevist®) ou de gadodiamide (Omniscan®) lors de 6 à 12 IRM. Le second, constituant le groupe témoin négatif, comprenait 16 patients ayant bénéficié de 6 à 13 IRM, jamais injectées.

L'étude approfondie des images obtenues au cours du suivi des patients a mis en évidence une corrélation entre le nombre d'administrations de chélates de Gd, et la survenue d'un rehaussement du signal T1 dans certaines structures cérébrales saines (sans anomalie de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique): le *globus pallidus*, et le noyau dentelé du cervelet, par rapport aux structures adjacentes, respectivement le thalamus et le pont (Tableau 10). Ces données suggèrent donc que ce rehaussement local du signal T1, croissant au cours des injections, reflète la présence (croissante, donc, elle aussi), de Gd spécifiquement accumulé dans ces structures, a priori saines et sans évidence de lésion de la barrière hémato-encéphalique.

Une seconde équipe a très vite confirmé ces résultats, étudiant à la fois des patients possédant des métastases tumorales (n=37) et d'autres souffrant d'une sclérose en plaque (n=38) (Errante, 2014). Ils constatent également un rehaussement du signal T1 du noyau dentelé et du *globus pallidus*, croissant avec le nombre d'injections de gadodiamide (Figure 20).



Tableau 10 : Synthèse des résultats présentés par Kanda et al. (Kanda, 2014).

Structure impliquée	IRM non-injectées pondérées T1	Représentation des ratios d'intensité de signal vs. le nombre d'injections de chélates de Gd préalablement reçues	Conclusion
Globus pallidus (noyaux gris profonds)			Une corrélation significative est observée entre le ratio des intensités de signal <b>globus pallidus / thalamus</b> et le nombre d'injections de chélates de Gd préalablement reçues  ( $P < 0,001$ ; $r^2 = 0.288$ )
Noyau dentelé (cervelet)			Une corrélation significative est observée entre le ratio des intensités de signal <b>noyau dentelé / pont</b> et le nombre d'injections de chélates de Gd préalablement reçues  ( $P < 0,001$ ; $r^2 = 0.695$ )

Ces deux équipes avaient identifié des articles plus anciens rapportant un rehaussement T1 spécifique du noyau dentelé dans le cas de la sclérose en plaque, et chez des patients présentant une tumeur cérébrale et traités par radiothérapie (Roccatagliata, 2009 ; Kashara, 2011). Des hypersignaux du *globus pallidus* étant également décrits dans le cas de dysfonction hépatiques, des maladies de Wilson et de Rendu-Osler-Weber, d'une toxicité au manganèse, d'hémodialyse, de calcification, de nutrition parentérale, ou d'une neurofibromatose de type I (Kanda, 2014), les auteurs se sont alors interrogés sur l'implication d'injections répétées de chélates de Gd dans l'étiologie de ce phénomène. Une autre hypothèse, prédominante à cette époque, attribuait l'origine de ces hypersignaux à la radiothérapie (Kanda, 2014).



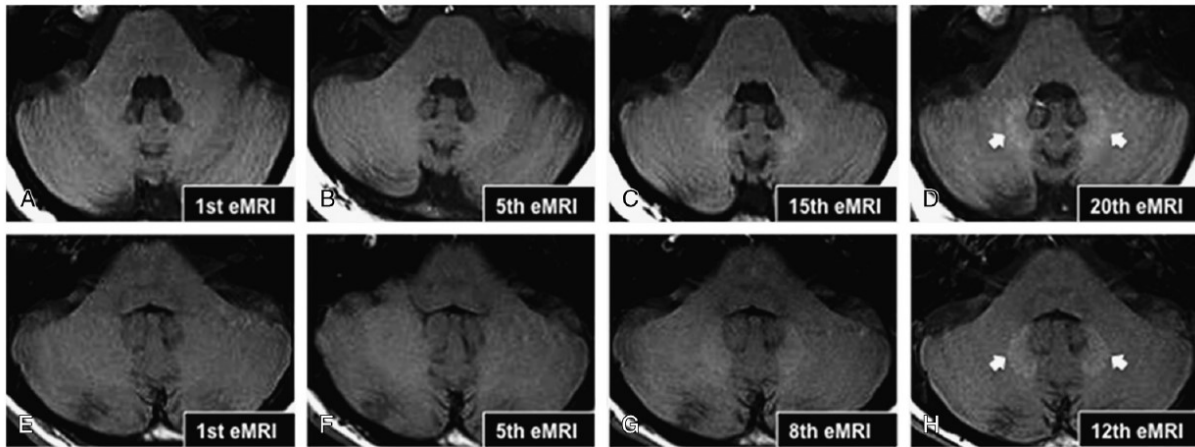


Figure 20 : Augmentation progressive de l'hypersignal T1 au niveau du noyau dentelé (l'un des NPC) chez un patient présentant des métastases cérébrales (A-D) et un patient présentant une sclérose en plaques (E-H) (Errante, 2014).

Ces travaux *princeps* ont rapidement été suivis d'un très grand nombre d'études cliniques, logiquement rétrospectives, qui les confirment, tant chez l'adulte (Annexe 1) que chez l'enfant (Annexe 2).

Les différentes équipes sont arrivées à un consensus : plus la dose cumulée de chélate de Gd est élevée, plus l'hypersignal T1 se manifestera au niveau de certaines structures cérébrales saines, avec une relation dose-effet comme celle décrite à la Figure 21 (Adin, 2015).

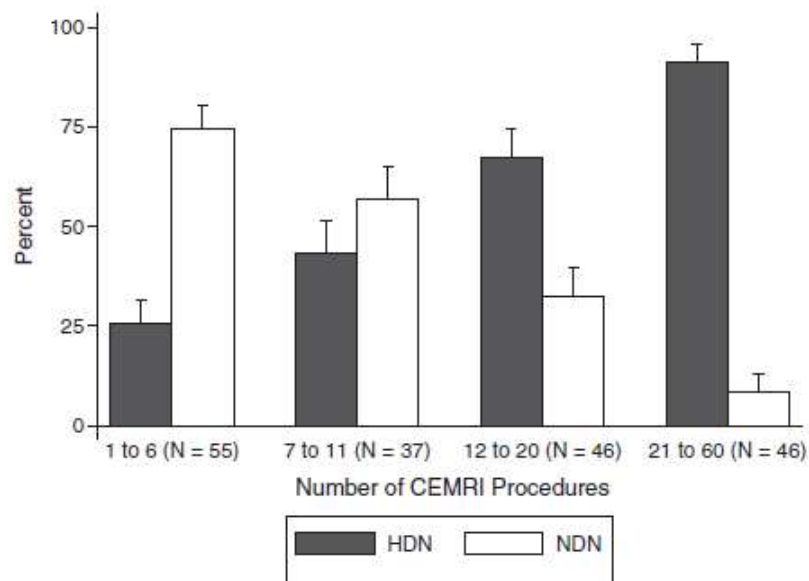


Figure 21 : Lien établi entre le nombre de procédures IRM injectées, et l'apparition d'un hypersignal au niveau du noyau dentelé (CEMRI : « contrast-enhanced magnetic resonance imaging » ; HDN : hypersignal apparent du noyau dentelé ; NDN : noyau dentelé normal) (Adin, 2015).

Par la suite, comme cela avait été fait dans le cadre de la FSN, les radiologues se sont intéressés aux cas dits « purs », c'est-à-dire concernant les patients n'ayant reçu qu'un unique chélate de Gd, et non plus plusieurs agents différents. C'est ainsi qu'il a été établi que cet hypersignal T1, enregistré lors d'IRM non injectées, est associé quasi-uniquement à **l'injection répétée de chélates de Gd linéaires** (Quattrochi, 2015 ; Radbruch, 2015 a et b ; Weberling, 2015 ; Kanda, 2015a ; Agris, 2016 ; Runge, 2015).



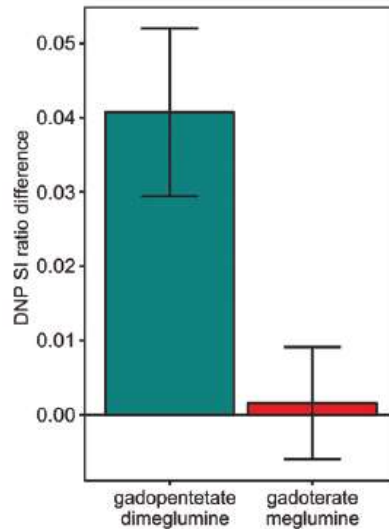


Figure 22 : Rapport du signal T1 noyau dentelé / pont de patients ayant reçu plus de 6 injections de gadopentétate (Magnevist®, linéaire), ou de gadotérate (Dotarem®, macrocycle) (50 patients par groupe). Dans le cas du chélate de Gd linéaire, un rehaussement du signal T1 du noyau dentelé est observé par rapport à celui du pont, mais pas dans le cas du chélate macrocyclique (Radbruch, 2015a).

La présence de Gd dans ces structures cérébrales est avérée. Cela a été démontré par dosage de Gd par spectrométrie de masse (Kanda, 2015b). L'analyse de dépôts localisés en microscopie électronique dans ces zones a également permis d'identifier par spectrométrie de rayons X, la présence de gadolinium tissulaire (McDonald, 2015). Cette même étude a déterminé la concentration tissulaire de Gd chez 13 patients ayant reçu entre 4 et 29 injections de gadodiamide : elle se situait entre 0,6 et 374,0 nmolGd/g dans le noyau dentelé et de 0 à 109,4 nmolGd/g dans le *globus pallidus*, avec une corrélation significative entre la dose reçue et la concentration de Gd total dosée dans plusieurs structures, mais aussi, voire même surtout, entre la dose de gadodiamide préalablement reçue et l'augmentation du signal T1 (McDonald, 2015), comme cela apparaît ci-dessous (Figure 23).

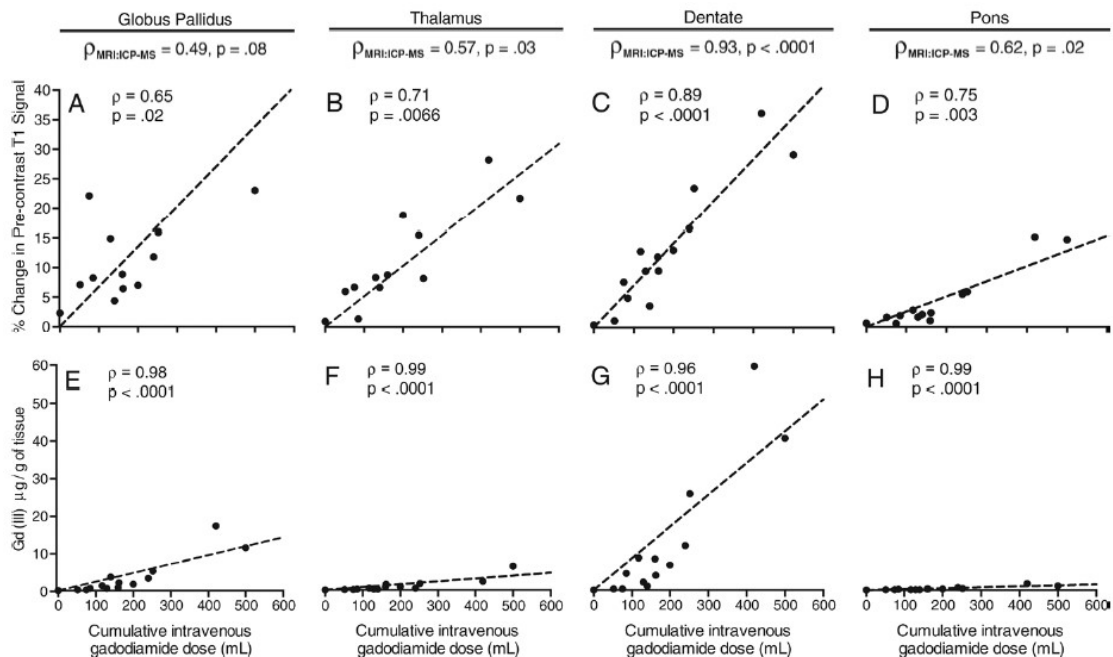


Figure 23 : Concentration de Gd total mesurée par ICP-MS sur des pièces d'autopsie de 13 patients et quantification des changements du signal T1. A-D : modifications de l'intensité du signal T1 dans le globus pallidus, le thalamus, le noyau dentelé et le pont vs. la dose cumulée de gadodiamide (mL). E-H : modifications de la concentration





de Gd (ICP-MS) vs. la dose cumulée de gadodiamide (mL) (McDonald, 2015).

C'est dans ce contexte qu'une première étude de mise au point d'un modèle préclinique a été menée dans le laboratoire (Robert, 2015). Ce modèle d'injections répétées d'un chélate de Gd linéaire chez le Rat, a permis de reproduire l'apparition progressive de l'hypersignal T1 en IRM, dans les noyaux cérébelleux profonds (pas uniquement le noyau dentelé, mais les 3 noyaux). C'est sur la base de ce modèle que cette thèse a été initiée.

Différents axes de recherches nous sont alors apparus essentiels, s'organisant autour des questions présentées sur la figure suivante. Autant de questions auxquelles il nous faudra tenter de répondre au cours de cette thèse.

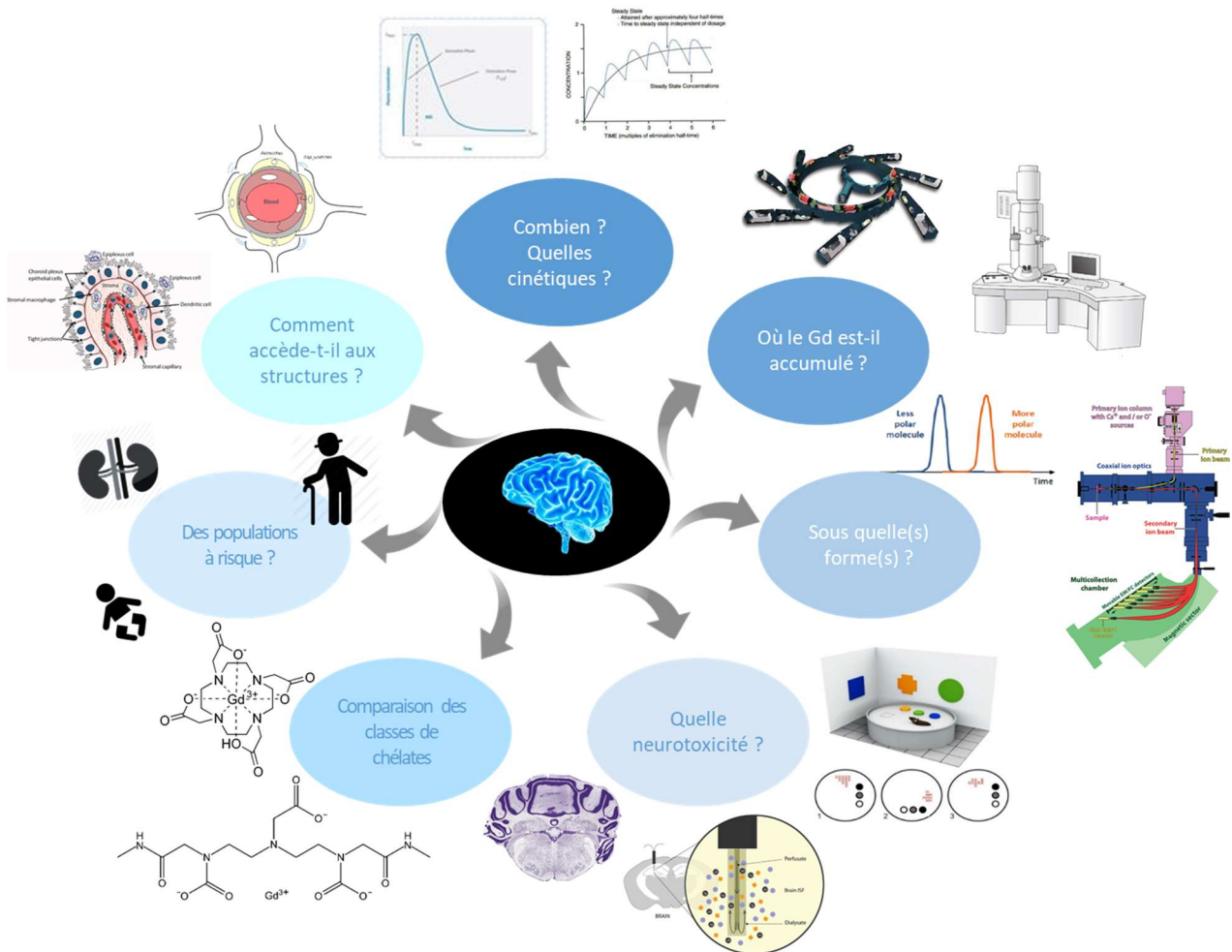


Figure 24 : Les différentes questions se posant autour du phénomène de l'accumulation cérébrale des chélates de Gd, auxquelles nous nous efforcerons de répondre dans ce travail.



## Partie II : Caractérisation de l'accumulation cérébrale des chélates de Gd

Jusqu'en 2006, les chélates de Gd étaient considérés comme étant extrêmement bien tolérés. L'administration de ces agents à des populations importantes a cependant fait apparaître des effets non identifiés sur les cohortes étudiées dans les études cliniques. Les études réglementaires de pharmacocinétique (Harpur, 1993) ou non (Tweedle, 1995) rapportaient une élimination du produit de l'ordre de 98-99% dans les heures suivant son injection. C'est maintenant les « traces » restantes, s'accumulant à plus long terme, qui vont être au centre de nos travaux.

Au niveau cérébral, tout reste à faire. Dans un premier temps, il s'agit de caractériser l'accumulation cérébrale des chélates de Gd, et de renseigner où précisément le Gd est stocké, sous quelle(s) forme(s), et de tenter de savoir pourquoi, en mettant en relation les catégories de chélates de Gd, leurs voies d'accès aux parenchymes cérébraux, et enfin les caractéristiques des structures anatomiques d'accumulation préférentielle.

Nous commencerons par décrire les structures cérébrales les plus fréquemment citées pour leur rehaussement T1 après administrations répétées de chélates de Gd.





## Chapitre 1 : Anatomie et métaux endogènes des noyaux cérébelleux profonds et du *globus pallidus*

### A. *Globus pallidus*

Le *globus pallidus* (ou *pallidum*), « globe pâle, est l'une des deux principales structures affectées par le phénomène de capture cérébrale du Gd. Il appartient aux **noyaux gris centraux**, aussi appelés ganglions de la base. Cet ensemble de structures correspond à une grande partie de la zone sous corticale du télencéphale.

Les noyaux gris centraux sont composés :

- du putamen et du noyau caudé, que l'on regroupe souvent sous l'appellation de *striatum* (on y associe parfois le *globus pallidus*) ;
- du *globus pallidus*, lui-même divisé en *globus pallidus interne* (GPi) et *globus pallidus externe* (GPe) ;
- du noyau subthalamique (STN) ;
- de la substance noire (*substantia nigra*), ainsi appelée pour sa richesse en neuromélanine qui lui confère sa couleur, elle-même divisée en substance noire réticulée (SNr), et en substance noire compacte (SNC), qui n'est pas considérée comme appartenant aux noyaux gris centraux.

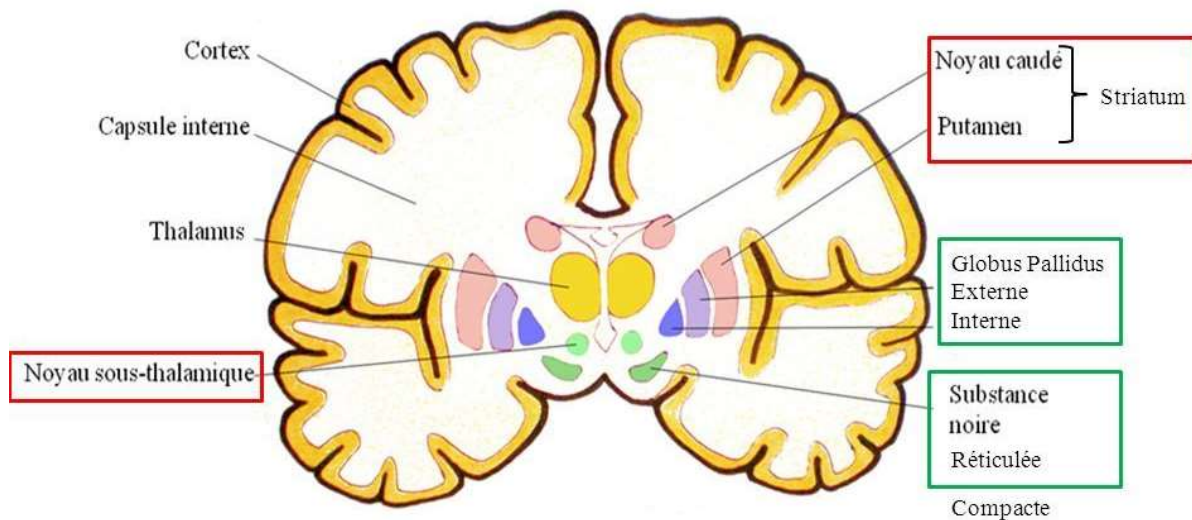


Figure 25: Représentation schématique des différentes structures composant les noyaux gris centraux (site internet 8).

### B. Les noyaux cérébelleux profonds et le cervelet

Le cervelet (étymologiquement « petit cerveau »), bien qu'il ne représente que 10% du volume cérébral total, contient la majorité des neurones du système nerveux central (on estime en effet qu'il y a environ 3,6 fois plus de neurones dans le cervelet que dans le cortex cérébral (Herculano-Houzel, 2010), essentiellement à cause du très grand nombre de **cellules en grain**, décrites plus bas). Il est l'un centre principal de la coordination motrice, de l'apprentissage, de l'exécution cognitive.

Il est divisé anatomiquement en 3 lobes, puis en 10 lobules, selon la nomenclature de Larsell (Larsell, 1972).



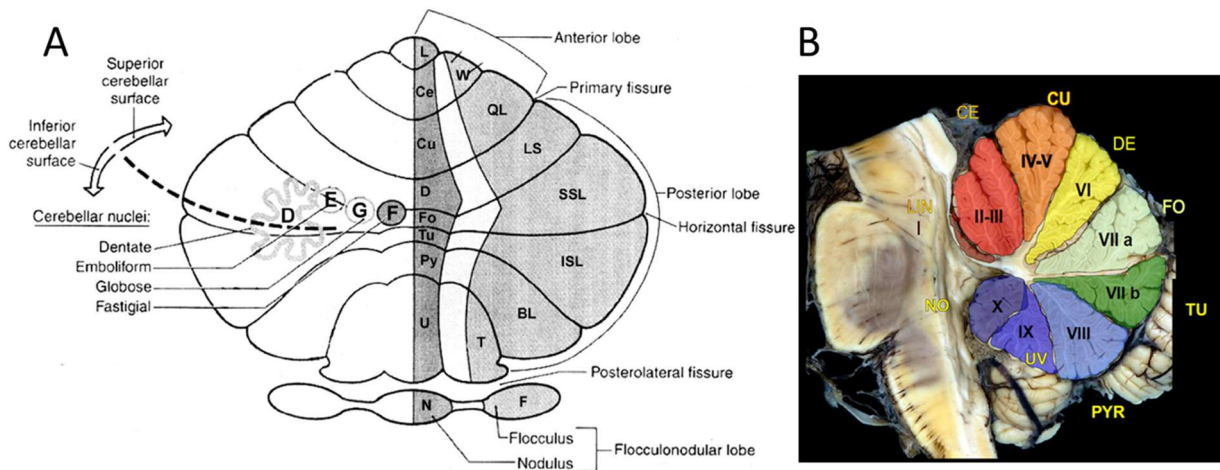


Figure 26 : Décomposition schématique du cervelet en lobules, en coupe axiale avec localisation des noyaux cérébelleux profonds (A), et sagittale sur image anatomique (B). Lobules du vermis, L : lingula ; Ce : lobule central ; Cu : culmen ; D : déclive ; Fo : Folium ; Tu : tuber ; Py : pyramide ; U : Uvula (Cours M Braun, Faculté de Médecine de Nancy Université de Lorraine).

Les noyaux profonds du cervelet (surtout le noyau dentelé chez l'Homme) constituent la deuxième structure principale accumulant le Gd.

Les noyaux cérébelleux profonds (ou « deep cerebellar nuclei » en anglais, DCN) sont les structures qui comprennent l'ensemble des corps cellulaires de la zone sous-corticale du cervelet.

Ils regroupent chez l'Homme 3 ou 4 noyaux (selon la nomenclature employée): le **noyau dentelé** est le plus gros et le plus externe. Lui sont accolés les **noyaux emboliforme** et **globuleux**, souvent regroupés sous le nom de **noyau interposé** ; et enfin le **noyau fastigial**, le plus interne (Figure 27 et Figure 28).

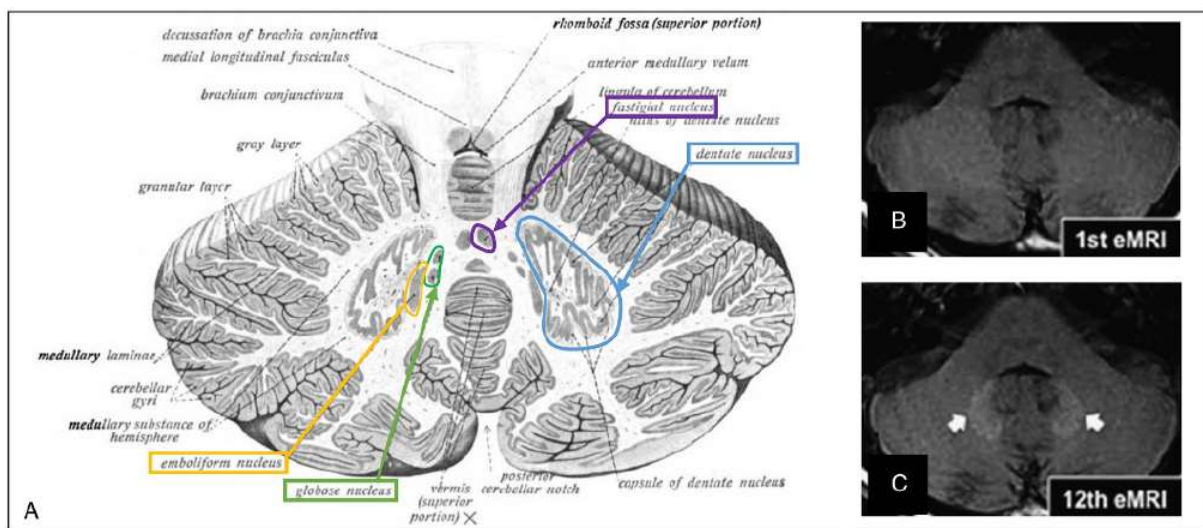


Figure 27 : (A) schéma en coupe axiale du cervelet et de ses noyaux profonds chez l'Homme (Sobotta, 1909). (B) Première IRM d'un patient, et (C) hypersignal T1 du noyau dentelé observé lors de la 12<sup>e</sup> IRM (Errante, 2014) ; (Robert, 2018b). Sur de telles images, il est, en fait, souvent assez difficile de statuer sur le rehaussement du signal du noyau emboliforme, bien plus petit et accolé au noyau dentelé.



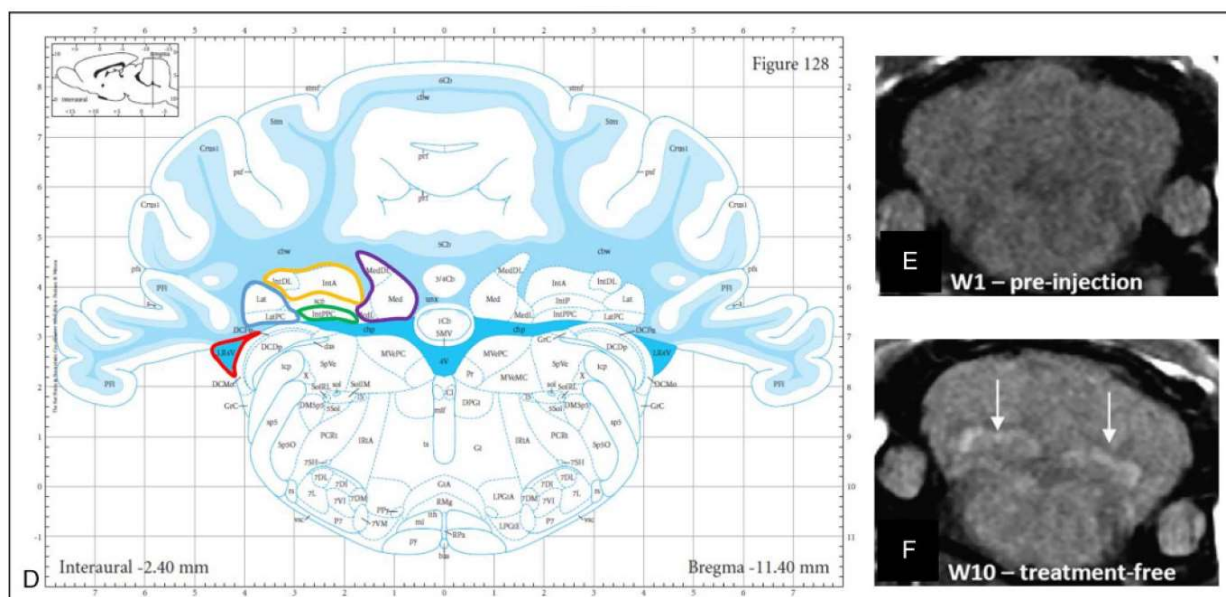


Figure 28 : (D) coupe anatomique du cervelet et du tronc cérébral de Rat (Paxinos, 2007), montrant les noyaux cérébelleux profonds : en bleu le noyau latéral (correspondant au dentelé), en jaune le noyau interposé antérieur, en vert, noyau interposé postérieur, en violet le noyau médian. (E) Apparition d'un rehaussement T1 dans les noyaux cérébelleux profonds chez le Rat, après injections répétées de gadodiamide (Robert, 2016), (Robert, 2018b).

Naturellement, le Rat est lissencéphale alors que l'Homme est gyrencéphale. Chez le Rat, on ne parle pas de noyau dentelé mais de **noyau latéral**. Sa taille relative par rapport aux autres noyaux cérébelleux profonds est plus petite (Paxinos, 2007). Les couches corticales présentes chez l'Homme existent aussi chez le Rat. Les fonctions cérébelleuses sont globalement similaires et les voies fonctionnelles sont proches (Sultan, 2007). Le Rat est généralement considéré comme un modèle translationnel pour les études de la cognition, pour autant, bien entendu, que l'on tienne compte des facteurs éthologiques (Robert, 2018b ; Semple, 2013). Par conséquent, même s'il va de soi que les fonctions cognitives du Rat doivent être distinguées de celles de l'Homme, il semble justifié d'étudier cette espèce et d'essayer d'en tirer des conclusions chez l'Homme.

### C. Des structures riches en métaux endogènes

Les noyaux cérébelleux profonds et les ganglions de la base, en plus d'être globalement impliqués dans les mêmes fonctions (contrôle fin de la coordination motrice, et intégration cognitive), ont pour caractéristique commune supplémentaire leur **richesse en métaux endogènes**.

En effet, le noyau dentelé ainsi que les noyaux gris centraux (*globus pallidus*, *putamen*, substance noire), seraient parmi les structures les plus riches en fer du cerveau (Hallgren, 1958 ; Höck, 1975 ; Hasan, 2012). Jusqu'à 150-200 µg de fer par gramme de protéines ont été dosés dans la substance noire et le *globus pallidus* (Götz, 2004). Les régions cérébrales impliquées dans le contrôle moteur sont en général plus riches en fer (Koeppen, 1995). Les ganglions de la base sont aussi relativement riches en cuivre (Popescu et Nichol, 2011).





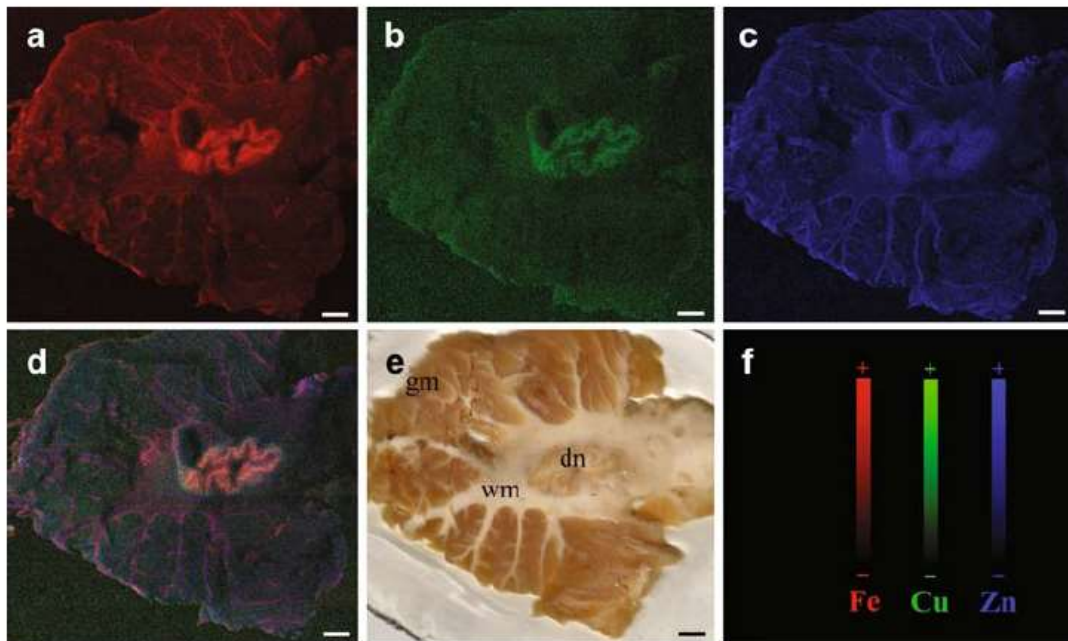


Figure 29 : Cartographie anatomique relative des métaux Fe (a), Cu (b) et Zn (c) et superposition (d) sur une coupe sagittale du cervelet humain, par fluorescence X (échelle : la barre représente 5 mm) (dn : noyau dentelé, gm : matière grise ; wm : matière blanche) (Popescu, 2009).

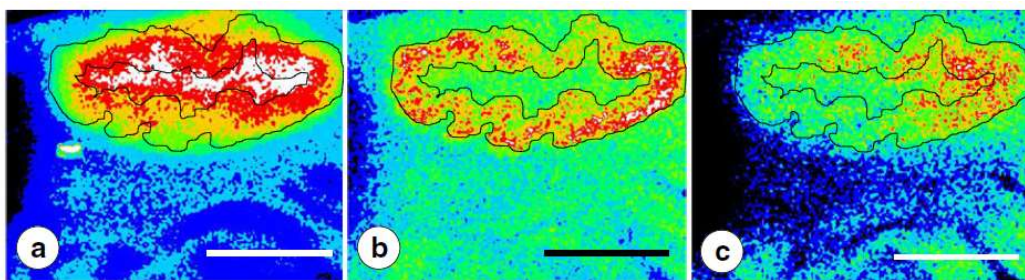


Figure 30 : Cartographie par fluorescence X du fer (a), cuivre (b), et du zinc (c), dans le noyau dentelé chez l'Homme. Le blanc correspond à la plus grande concentration, le bleu foncé la plus faible (échelle : la barre représente 5 mm) (Koeppen, 2012).

On distingue bien, sur les cartographies de Koeppen et coll. (2012) ci-dessus, que le cuivre coïncide parfaitement avec le noyau dentelé (il sert d'ailleurs souvent de repère cartographique pour le délimiter). Le fer est le métal que l'on y trouve en plus grande concentration. Il est, quant à lui, plus concentré dans la zone centrale du noyau dentelé, puis sa teneur diminue de façon concentrique. Le zinc, enfin, est moins concentré en moyenne, et plus diffus, même s'il est plus présent au centre des noyaux dentelés. Le fer serait 10 fois plus concentré que le cuivre et le zinc (Koeppen, 2012).

Le cervelet total lui, est globalement aussi riche en fer qu'en zinc, mais la concentration tissulaire de cuivre est environ 10 fois plus faible. Le fer et le zinc sont, en effet, abondants dans le cortex cérébelleux, contrairement au cuivre (Erikson, 2004 ; Pal et Prasad, 2016).

Le *globus pallidus* est riche en fer et en cuivre, puis, relativement par rapport aux autres structures, en zinc (10 fois moins que le fer) (Figure 31) et en manganèse, environ 50-150 fois moins que le fer, avec des concentrations de l'ordre de 5-8 nmol/g chez l'Homme (Tracqui, 1995 ; Dorman, 2006, Erikson, 2004 ; Pal et Prasad, 2016).



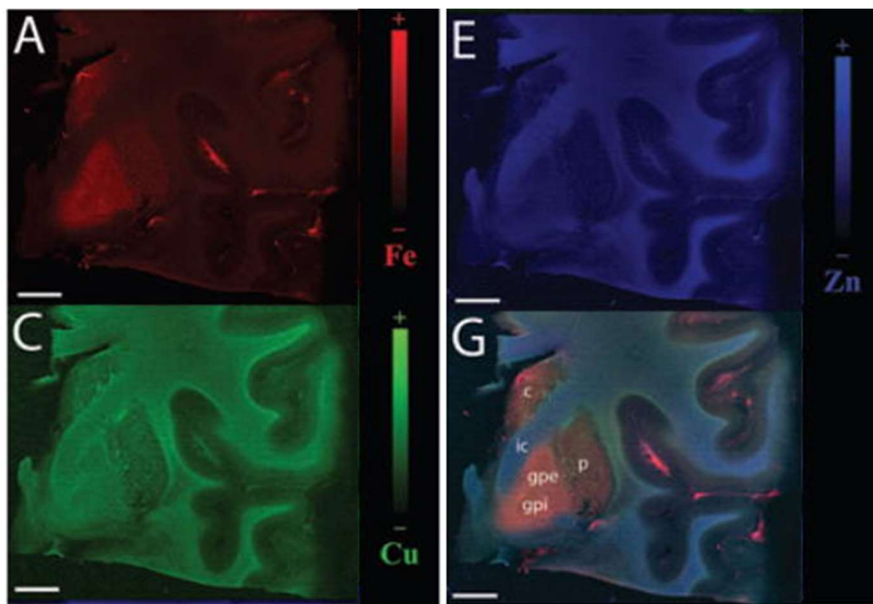


Figure 31 : Distribution des métaux endogènes dans les noyaux gris centraux : fer (A), cuivre (C), zinc (E), et superposition (G). On note une accumulation de fer et de cuivre dans le globus pallidus (gpi et gpe) et de zinc en moindre proportion (d'après Popescu et Nichol, 2011) (échelle : la barre représente 10 mm).

Concernant la possible transmétallation entre le Gd du chélate de Gd et un métal endogène, il faut se rappeler qu'elle est logiquement plus aisée avec le **pool labile** de ces métaux, dont la concentration est bien entendu plus faible que celle du pool total. Une transmétallation du Gd avec le métal lié à un ligand physiologique est possible mais elle dépendra de la concentration du métal et de son affinité pour ce ligand endogène. Le transport et l'homéostasie de ces métaux dans le cerveau seront présentés dans le chapitre suivant.

## Chapitre 2 : Les différentes formes d'accumulations possibles du Gd

Selon l'IUPAC (Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée), **la spéciation** est définie comme étant « l'ensemble des processus qui permettent d'obtenir l'information sur la forme chimique (ionique ou moléculaire) d'un analyte ». Dans le cas présent, il s'agit donc de déterminer sous quelle(s) forme(s) se trouve le gadolinium administré au patient sous forme chélatée et retenu dans les tissus.

Comme évoqué précédemment, les chélates de Gd les moins stables thermodynamiquement peuvent être amenés à libérer l'ion  $Gd^{3+}$ , par exemple lors d'un phénomène de transmétallation, faisant intervenir une compétition avec d'autres métaux d'affinité pour le ligand.

Ainsi, en plus du Gd accumulé sous forme de chélate de Gd, d'autres espèces de Gd sont susceptibles d'être retrouvées dans les tissus.

Différents scénarios sont envisageables :

- Du Gd insoluble peut être retrouvé, sous une forme précipitée, par exemple de phosphate  $GdPO_4$ , d'hydroxyde  $Gd(OH)_3$ , ou de carbonate  $Gd_2(CO_3)_3$ . L'affinité du Gd pour ces anions est en effet très importante (Caldwell, 1998).
- Sous forme soluble, les entités chimiques associées au Gd (de façon non-covalente), peuvent être très nombreuses. Le  $Gd^{3+}$  a en effet une forte affinité pour les anions et les « acides forts » de la classification de Levy, soit les groupes carboxyles et les amines (Sherry, 2009). Ainsi, il n'est pas exclu que l'on retrouve du Gd associé aux anions acétate, citrate, oxalate, ainsi qu'à des certains acides aminés (groupes carboxyles des acides glutamiques et aspartiques par exemple), et donc à des peptides, des protéines ou d'autres macromolécules. Les aminoacides forment des complexes avec les lanthanides et en particulier avec le Gd. L'affinité avec le Gd est liée à la présence d'atome d'azote et d'oxygène du groupe carboxylate chargé dans l'acide aminé. La structure aminoacide est caractérisée par l'existence de 3 liaisons entre l'azote et l'oxygène chargé du groupe carboxylique, propice à la formation des cycles à 5 chaînons stériquement favorables à la complexation du Gd. Cependant, il faut rappeler que le Gd forme des complexes stables principalement avec des ligands hepta-, octa- et nona-dentates. Or, un seul acide aminé (qui est, par définition, bidentate) n'est pas suffisant pour former un complexe thermodynamiquement stable. Par conséquent, la configuration tridimensionnelle de l'enchaînement des acides aminés formant la structure peptidique, est essentielle pour l'obtention de complexes thermodynamiquement stables avec le Gd nécessitant la présence de groupes donneurs d'électrons disponibles et bien orientés à proximité de la sphère de coordination du métal.
- Il n'est, en théorie, pas non plus absolument exclu que le chélate de Gd intact puisse se lier à des macromolécules. Rappelons le cas des chélates de Gd utilisés pour l'imagerie hépatique. Ces molécules comportent un groupe aromatique lipophile favorisant une liaison transitoire avec les protéines dont l'albumine et leur capture hépatocytaire par les peptides OATP1B1 and OATP1B3 (« organic anion transporting polypeptides ») (Port, 2008 ; Jaw, 2012 ; Vilgrain, 2016). Toutefois, la forte hydrophilie des chélates de Gd dits « non spécifiques » rend cette hypothèse très peu probable. Par ailleurs, des travaux de biochimie structurale utilisent fréquemment des sondes paramagnétiques hydrophiles (non spécifiques) linéaires ou macrocycliques (DTPA-BMA-Gd, DTPA-Gd ou HP-DO3A-Gd) pour documenter les structures de surface des protéines et plus particulièrement l'accessi-



bilité des résidus de surface pour les solvants voire pour des molécules hydrosolubles (Petros, 1990 ; Girard, 2002 ; Bernini, 2008). Cette approche est basée sur le postulat que les chélates de Gd ne se lient pas aux protéines (Petros, 1990).



## Chapitre 3 : Etude de l'accumulation de Gd dans les tissus cérébraux : principes physiques d'analyse

Lors d'injections répétées de chélates de Gd, essentiellement de la catégorie linéaire, une certaine proportion de ceux-ci semble s'accumuler dans certaines régions du cerveau et du cervelet, sous une (ou des) forme(s) inconnue(s). Afin de comprendre ce phénomène, il faut dans un premier temps caractériser cette accumulation. Le Gd s'accumule-t-il dès la première injection ou existe-t-il un seuil à atteindre avant qu'il ne s'accumule ? Les molécules macrocycliques sont-elles, aussi associées à la présence de Gd intra-tissulaire sur le long terme ? Si oui, sous quelle forme ? Cette accumulation est-elle réversible ? Quelle en est la cinétique ? Nous devons également décrire plus finement les structures d'accumulation du Gd et la raison pour laquelle il existe une accumulation préférentielle à ce niveau, puis tenter de savoir où il est précisément localisé au niveau subcellulaire. De plus, nous ne savons pas si le Gd est stocké sous sa forme de chélate, ou s'il est déchélaté, et dans ce dernier cas, à quoi il se lie ensuite. Ces informations sont importantes pour aider à la réflexion sur les conséquences biologiques de ce phénomène.

L'analyse de nos échantillons s'apparente à une caractérisation de matériaux ou une l'analyse de surface. Le recours à des méthodes classiques, basées sur des grands principes physiques, et déclinés à travers des techniques complémentaires, constituent les outils clés pour ce genre d'analyse. Ces méthodes utilisent les propriétés physiques caractéristiques des matériaux (molécules, atomes), pour les différencier et les analyser. On peut ainsi les distinguer par leur propriétés intrinsèques telles que leur taille, leur masse, ou caractériser leur interaction avec un « rayonnement » énergétique (électromagnétique ou de particules) résultant en des modes vibrationnels (Raman, infrarouge), des résonances nucléaires, ou des émissions de fluorescence caractéristiques.

### A. Résonance magnétique nucléaire et relaxivité

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une propriété intrinsèque à tous les atomes possédant un spin nucléaire ( $^{31}\text{P}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ...). Soumis à une onde de radiofréquence, ces atomes vont s'exciter, puis relaxer une fois la contrainte disparue. L'étude des phénomènes de relaxation de l'ensemble de ces atomes possédant un spin est utilisée dans différents domaines d'application. On peut par exemple utiliser la relaxation de l'hydrogène présent dans l'ensemble des molécules pour en caractériser leur état, par la spectroscopie RMN du  $^1\text{H}$ . Nous utiliserons notamment cette technique comme outil de recherche d'une éventuelle neurotoxicité. L'imagerie de résonance magnétique classique (présentée au chapitre 1) se limite elle à l'étude du comportement des protons  $^1\text{H}$  des molécules d'eau. Enfin, la quantification de la relaxation de l'atome en elle-même est possible, et permet de documenter les vitesses de relaxation  $R_1$ ,  $R_2$  ou  $R_2^*$  moyennes au niveau de structure d'intérêt. Ces vitesses de relaxation témoignent en partie de la composition endogène des tissus, élémentaire et moléculaire. Les vitesses de relaxation permettent donc de caractériser les tissus dans lesquels elles sont mesurées. Elles sont notamment très sensibles à la présence d'éléments paramagnétiques endogènes ou exogènes, tels que le Fe ou le Gd. En théorie, la vitesse de relaxation mesurée est directement fonction de la concentration de l'élément paramagnétique:  $R_1 = f([\text{Gd}])$  par exemple. L'avantage de L'IRM est qu'étant réalisée *in vivo*, elle permet un suivi temporel du  $R_1$ . Rappelons que la relaxivité  $r_1$  d'un composé paramagnétique X répond à la relation suivante :

$$r_{1,2} = \frac{R_{1,2}}{[X]}$$





Connaissant la relaxivité  $r_1$  des différents chélates de Gd utilisés, cela pourrait ainsi nous permettre d'estimer en temps réel la concentration moyenne de Gd présente dans une structure d'intérêt.

Cependant, selon sa forme, le gadolinium n'interagit pas de la même manière avec les protons de l'eau extracellulaire : la relaxation dépend de la spéciation du Gd. Or, nous n'avons pas l'assurance que le Gd accumulé soit présent sous sa forme injectée intacte en tant que chélate de Gd. Ainsi, la relaxométrie permet un autre champ d'étude : approcher la forme du Gd accumulé, à partir des mesures *in vitro* de la vitesse moyenne de relaxation et de la concentration en Gd. Le principe de cette approche est basé sur le postulat suivant : selon la forme moléculaire du Gd, sa constante de relaxivité  $r_1$  est différente. Des études *in vitro* ont permis d'établir que :

- la relaxivité  $r_1$  du Gd sous forme complexée à son ligand est connue et de l'ordre de  $4\text{-}6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  à 1,5 T dans du plasma à 37°C (Rohrer, 2005) ;
- la relaxivité  $r_1$  d'une espèce de Gd dissociée de son chélate, s'associant à une autre entité grâce à ces 9 sites de coordinations, mais restant soluble, serait de l'ordre de  $15 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  (plasma, 37°C, 1,47 T) (Fretellier, 2011b)
- enfin, une espèce de Gd dissociée et insoluble (ayant précipité sous forme de  $\text{GdPO}_4$  par exemple), ne participerait plus à la relaxivité globale, est son  $r_1$  serait proche de  $0 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  (Fretellier, 2011b)

Ainsi, en déterminant à l'aide d'un relaxomètre la vitesse de relaxation  $R_1$  d'un tissu *ex vivo*, et d'autre part en dosant la concentration de Gd total dans ce tissu, on peut accéder à la relaxivité  $r_1$  globale du tissu et ainsi en déduire la principale catégorie des espèces d'accumulation du Gd.

Lorsque le Gd est sous forme libre et soluble, une augmentation de la valeur de  $r_1$  est observée. Cette augmentation de  $r_1$ , par rapport à une valeur de référence (déterminée par « spiking » *in vitro* de la matrice) indiquerait la présence de Gd dissocié et soluble. Inversement, une diminution de la valeur de  $r_1$  par rapport à la valeur de référence correspondrait à la présence de Gd sous forme dissociée et insoluble (donc sous forme « muette » pour les protons de l'eau extracellulaire) (Fretellier, 2011b).

## B. La spectrométrie de masse

Le principe de la spectrométrie de masse (MS) consiste en la séparation des éléments ou molécules selon leur masse, en vue de leur (semi-)quantification. Selon l'information recherchée, la spectrométrie de masse caractérisera la masse de fragments moléculaires, ou d'atomes.

L'approche peut donc être moléculaire, ou élémentaire/isotopique, réalisée après rupture complète des liaisons existant entre les atomes. On peut également étudier la fragmentation de molécules sous l'application de certaines contraintes, afin d'obtenir des informations structurales de ces molécules. Les molécules ainsi étudiées peuvent avoir des masses moléculaires allant jusqu'à plusieurs centaines de kDa.

Classiquement, pour pouvoir séparer les masses, on les accélère dans un champ électrique. Pour cela, on a besoin d'ioniser la matière. Le mode d'ionisation peut être réalisé par un plasma, un bombardement de particules, ou encore par l'intermédiaire de l'application d'une matrice qui sera excitée par un laser (MALDI). La séparation des molécules chargées selon leur rapport masse/charge peut être réalisée par des analyseurs reposant sur différentes méthodes (champ électrodynamique (quadripôle), secteur magnétique, ou encore temps de vol). Un détecteur permet ensuite de traduire les ions en signal électrique, d'amplifier ce dernier de façon proportionnelle à leur abondance, et ainsi d'obtenir une information d'intensité aux masses d'intérêt.



En fonction de ce que l'on recherche, on analysera des grands volumes de matière, ou bien des petits volumes localement à l'aide de microsondes (ionique, laser), atteignant des résolutions jusqu'à une cinquantaine de nm, correspondant à des volumes de l'ordre de  $10^{-15}$   $\mu$ L. Avec ces microsondes, on a la possibilité de balayer progressivement la surface de l'échantillon et d'obtenir ainsi une cartographie de la distribution moléculaire ou élémentaire/isotopique. Il s'agit par exemple des techniques d'ablation laser (LA-ICP-MS), spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS), désorption-ionisation laser assistée par une matrice (MALDI).

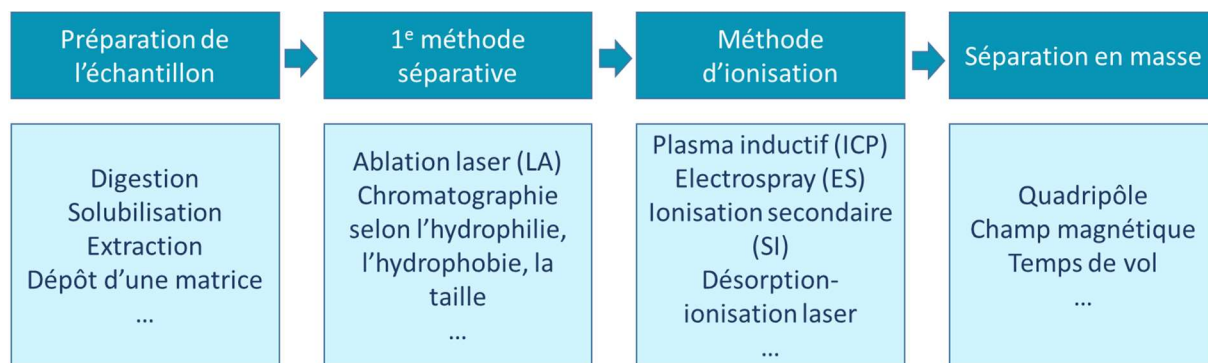


Figure 32 : Résumé des différentes étapes précédant généralement la spectrométrie de masse, et leurs différents modes.

### C. Interaction d'un faisceau d'énergie avec la matière

La caractérisation de la matière peut être approchée par ses interactions avec un faisceau de particules (électrons ou particules plus lourdes) ou un faisceau électromagnétique (lumière visible ou invisible, infrarouge, X). Alors que la transmission du faisceau est utilisée pour générer une image de transmission en microscopie électronique par exemple, la caractérisation de la matière avec ce faisceau peut être réalisée par deux modes :

- Soit par l'analyse de la **perte d'énergie** de ce faisceau, initialement bien défini. On pourra ainsi analyser la perte d'énergie (absorbé par la matière), d'ordre atomique, ou vibrationnel (Raman, infrarouge).
- Soit par l'analyse de l'**émission de fluorescence** de la matière, dans le domaine du visible ou dans le domaine du rayonnement X.

Nous nous intéresserons particulièrement à la fluorescence X, dans le cadre d'un faisceau d'électrons en microscopie électronique ou d'un faisceau de rayonnement synchrotron ; ainsi qu'à la perte d'énergie en microscope électronique.

Si l'on prend l'exemple de la microscopie électronique, et donc d'une source primaire d'électrons, une interaction de l'électron primaire avec le noyau d'un atome provoquera une déviation de cet électron, tout en conservant son énergie (**diffusion élastique**). L'angle de déviation dépendra de l'atome : plus celui-ci aura un numéro atomique élevé, plus la déviation sera importante.

Si en revanche l'électron primaire entre en collision avec un électron d'un des atomes de l'échantillon, cela provoque une légère déviation et une perte d'énergie de l'électron primaire. Cette énergie a pour effet l'éjection d'un électron secondaire à partir du nuage électronique de l'atome. L'atome ne restant pas naturellement sous cet état excité, cet électron est remplacé par un autre d'une couche supérieure.



Lors de ce réarrangement électronique, un photon X est émis. Il est possible d'analyser la composition chimique de l'échantillon en utilisant ces informations de **collision inélastique**.

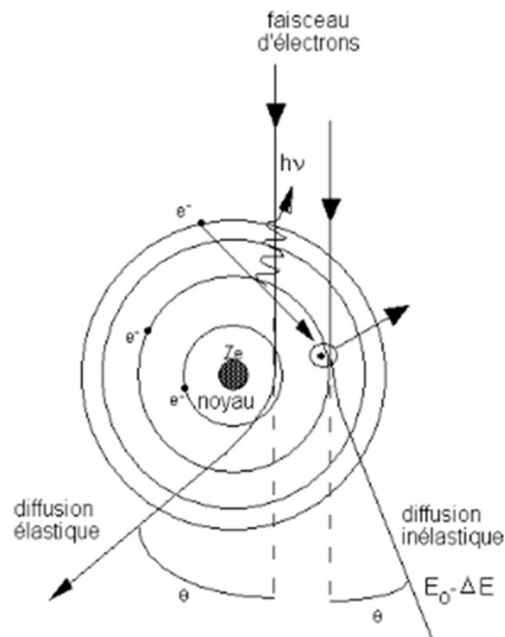


Figure 33 : Diffusions élastique et inélastique des interactions électrons – atome (site internet 9).

## 1. Analyse de la perte d'énergie

La perte d'énergie de l'électron primaire (en cas de diffusion inélastique) est caractéristique de la couche électronique de l'atome avec laquelle il y a eu interaction. En microscopie électronique, l'utilisation d'un filtre « en perte d'énergie », qui fonctionne comme un prisme magnétique, permet de disperser les électrons en fonction de leur énergie. En fonction du réglage du système d'optique électronique, il est ainsi possible soit de récupérer le **spectre de dispersion en énergie** (EELS pour « electron energy loss spectroscopy », ou spectroscopie en perte d'énergie) de la totalité de la zone de l'échantillon irradiée, soit de récupérer une image ne contenant que les électrons ayant perdu une énergie spécifique (EFTEM pour « energy filtered transmission electron microscopy ») en ajoutant une fenêtre de sélection en sortie du filtre. L'analyse du spectre permet alors la **détection** fine de la présence de l'élément chimique analysé et sa **caractérisation**.

## 2. Analyse de la fluorescence X

Les photons X, émis lors de la désexcitation par transitions électroniques des atomes excités, sont également caractéristiques de ces derniers, et peuvent être détectés pour une **microanalyse X**. En microscopie électronique, il existe deux méthodes de microanalyse X :

a) la **spectroscopie à dispersion de longueur d'onde** (ou WDS pour « wavelength dispersive spectrometry »), et

b) la **spectrométrie à sélection d'énergie** (EDS pour « energy dispersive spectrometry » ou analyse de la fluorescence X par sonde électronique, EP-XRF pour « electron probe X-ray fluorescence »). L'avantage de ces méthodes est qu'elles sont **quantitatives**. Cependant la surface couverte par les détecteurs reste faible comparé à l'ensemble des orientations d'émission.



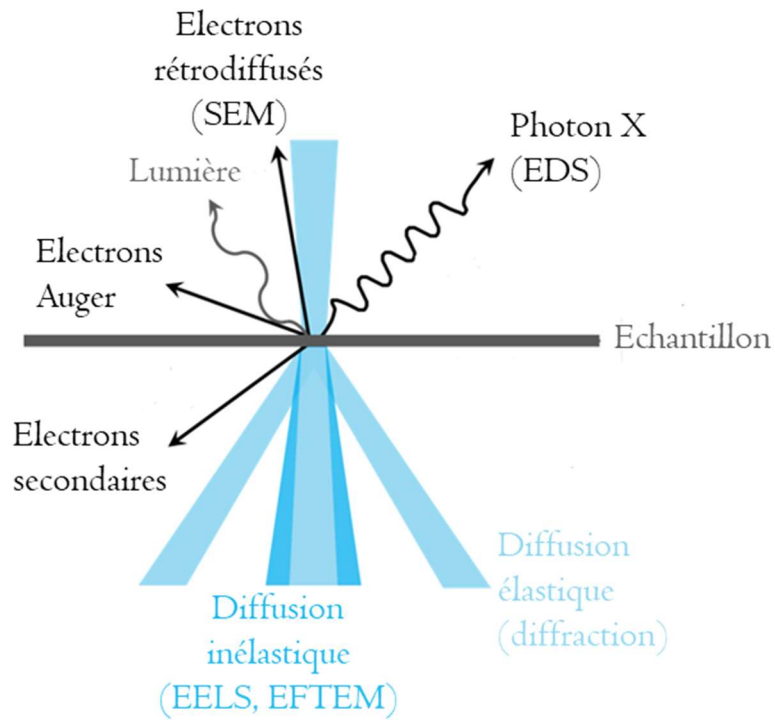


Figure 34 : Les différents types d'interactions entre le faisceau d'électrons et l'échantillon. Les électrons de diffusion élastique sont utilisés pour la microscopie électronique en transmission, tandis que la microscopie électronique à balayage (SEM) utilise les électrons rétrodiffusés. L'analyse de la composition chimique par spectroscopie de perte d'énergie d'électrons (EELS) et la TEM par filtration d'énergie (EFTEM) repose sur l'analyse des électrons de diffusion inélastique. Enfin, la spectroscopie de dispersion d'énergie (EDS) analyse les photons X émis (site internet 10).



### A. Comparaison de la capture cérébrale de gadolinium chez le Rat sain et le Rat insuffisant rénal (Publication 1)

#### 1. Analyse rationnelle

Il s'agit ici d'une étude sur un modèle préclinique mimant une population potentiellement à risque : les patients souffrant d'une insuffisance rénale modérée (c'est-à-dire jusqu'au stade 3 inclus). En effet, l'insuffisance rénale (IR) augmente la durée de résidence des produits de contraste dans l'organisme, menant jusqu'à la survenue de la fibrose systémique néphrogénique (FSN) dans les stades d'IR les plus sévères. L'insuffisance rénale modérée touche la majorité des patients âgés (Duru, 2009), qui représentent une proportion non négligeable des patients examinés quotidiennement en radiologie. L'**hypothèse** posée était que l'**accumulation cérébrale de Gd** chez cette catégorie de patient serait **plus importante**. Cela fait par ailleurs l'objet d'une des questions posées aux industries par les autorités de santé (FDA, 2015). Si les patients insuffisants rénaux s'avèrent plus concernés par l'accumulation cérébrale par rapport à des sujets sains, le modèle d'insuffisance rénale chez le Rat constituera un **modèle sensibilisé** cliniquement pertinent, ce qui pourrait permettre d'étudier plus facilement un phénomène amplifié (toxicité, discrimination de produits aux profils proches, etc.)

L'insuffisance rénale modérée a été induite par une **néphrectomie des 5/6<sup>e</sup>**. Ce mode d'induction de l'insuffisance rénale par réduction néphronique, très classique (Gretz, 1993), conduit à une chute de la fonction rénale plus stable et moins sévère que celle résultant d'un autre modèle fréquent, basé sur une alimentation enrichie en adénine, comme ont pu le démontrer des études préalables, réalisées au laboratoire dans le contexte de la FSN (Fretellier, 2013).

Dans un premier temps, nous avons étudié les effets du **gadodiamide, produit de contraste linéaire non-ionique**, le moins thermodynamiquement stable du marché, chez une population saine, dite « sham » (c'est-à-dire ayant subi une laparotomie suivie de la manipulation des reins, mais sans excision de ceux-ci, pour mimer l'acte chirurgical subi par les rats néphrectomisés) comparée à des rats en insuffisance rénale modérée. Des rats témoins néphrectomisés recevant des injections de sérum physiologique ont été inclus afin de renseigner les effets directement imputables à l'insuffisance rénale. La dose unitaire injectée a été choisie comme équivalente à la dose clinique, adaptée au Rat (sur la base de la surface corporelle). Un total de 20 injections ont été administrées, réparties sur 5 semaines (correspondant à plusieurs mois chez l'Homme) selon le protocole de l'étude préclinique *princeps* (Robert, 2015).

Notre objectif était l'approfondissement de nos connaissances sur l'accumulation cérébrale de Gd. Les modèles précliniques permettent de ne pas se limiter à l'étude indirecte de l'accumulation de Gd par le seul rehaussement T1. Il a alors été décidé de suivre l'**accumulation progressive du phénomène**, au cours des injections, **par examens IRM hebdomadaires**, mais également, à l'issue de l'étude (une semaine après la fin des injections), de collecter **différentes régions cérébrales** et cérébelleuses, afin de **documenter la répartition du Gd**, par dosage élémentaire. Il a notamment été décidé de mettre au point la **dissection des noyaux cérébelleux profonds**. Des prélèvements sanguins ont aussi été réalisés au cours de l'étude et à l'issue de celle-ci. Le dosage du Gd total ainsi que du Gd dissocié et soluble (par LC-ICP-MS) étant possible sur des matrices liquides, une première étude de la **spéciation du Gd a été réalisée sur du plasma**. Une autre approche de la **spéciation du Gd dans les matrices cérébrales** a également été testée *ex vivo*, par **relaxométrie** (non présentée dans la publication).



L'étude de la rétention tissulaire du Gd a ici été étendue à l'os. En effet, ce tissu est reconnu comme étant un compartiment important pour l'accumulation du Gd, et il a été avancé qu'il pourrait constituer un compartiment profond dit « réservoir » de cet élément (Hirano, 1996 ; Lancelot, 2016), qu'il pourrait ensuite libérer progressivement dans la circulation sanguine. Certains auteurs avancent un stockage préférentiel du Gd dans l'os cortical (Vidaud, 2012 ; Thakral, 2007), d'autres dans la moelle osseuse (Lancelot, 2016 ; Drel, 2016). Dans le cadre de l'accumulation cérébrale de Gd, l'os pourrait ainsi participer au phénomène, surtout après l'arrêt des injections de chélate de Gd. L'intégration de ce paramètre nous est donc apparue nécessaire lors de la conception du protocole. Le prélèvement de deux types d'os (os compact et os spongieux) a ainsi été prévu, afin de documenter une **potentielle accumulation préférentielle du Gd dans le tissu osseux** et d'en définir le type.

Plusieurs rapports d'encéphalopathies, ou encore de pertes de connaissance et d'amnésie rétrograde chez des patients, souvent insuffisants rénaux, après administration unique d'un chélate de Gd ont été publiés (Rai, 2001; Bozzao, 2003; Hui et Mullins, 2009; Naganawa, 2014; Maramattom, 2005). Ils étaient associés à un rehaussement du LCR. Un lien avec la toxicité du Gd a été évoqué mais pas formellement établi. Néanmoins, chez un de ces patients, une concentration élevée (23  $\mu\text{mol/L}$ ) de Gd total a été mesurée dans le LCR (Hui et Mullins, 2009). Bien qu'il s'agisse là d'effets aigus, la recherche d'un **hypersignal au niveau des ventricules cérébraux**, ainsi que le **dosage de Gd dans le liquide céphalorachidien** prélevé à l'issue de l'étude nous sont apparus nécessaires. En effet, les informations tirées devraient permettre de renseigner la voie d'accès du Gd au tissu cérébral, cette dernière pouvant être différente chez l'insuffisant rénal, visiblement plus sensible au passage du Gd dans le LCR (sur la base des données cliniques citées plus haut).

Ces travaux ont fait l'objet de la publication suivante :

Rasschaert M, Idée JM, Robert P, Fretellier N, Vives V, Violas X, Ballet S, Corot C. Moderate renal failure accentuates T1 signal enhancement in the deep cerebellar nuclei of gadodiamide-treated rats. *Invest Radiol.* 2017; **52**:255-264.



## 2. Méthodes

Pour quantifier le Gd dans un échantillon, les méthodes sont essentiellement basées sur la spectrométrie de masse. Nous décrivons ici les techniques analytiques utilisées dans cette étude. La première consiste simplement à ioniser l'échantillon pour une analyse élémentaire. On peut y adjoindre des techniques de séparation, comme la chromatographie, afin de quantifier la part de Gd soluble et dissociée de son chélate.

### *A. Spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS)*

L'ICP est une méthode d'ionisation de l'échantillon, préalablement à la spectrométrie de masse.

La technique consiste en l'atomisation et l'ionisation d'un échantillon biologique par un plasma d'argon chauffé à plus de 6000°C. En effet, l'argon, soumis à un champ électromagnétique par une bobine d'induction, subit des transitions électroniques, à l'origine de collisions, d'excitations et réactions d'ionisation en chaîne au sein de l'échantillon. Cette méthode nécessite l'introduction de l'échantillon sous forme d'aérosol, par nébulisation, dans une torche à plasma d'argon. Les échantillons solides doivent donc au préalable être soit minéralisés (par l'acide nitrique par exemple), soit broyés dans un solvant afin d'en extraire les éléments d'intérêt dans la fraction soluble.

Comme son nom l'indique, la minéralisation consiste en la décomposition de la matière organique en matière minérale. C'est une étape essentielle de la préparation des échantillons biologiques, préalablement à l'analyse élémentaire.

### *B. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-ICP-MS)*

La LC-ICP-MS, ou chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, permet dans notre cas de renseigner la fraction dissociée et soluble de l'élément d'intérêt. La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est ici associée à l'ICP-MS. Les molécules à séparer sont entraînées par la phase mobile liquide du chromatographe. Pour cela, l'échantillon ne doit pas être minéralisé, mais il doit être sous forme liquide. Cela limite donc l'analyse aux **fluides biologiques** (plasma, sérum, urine, liquide céphalorachidien...), ou bien nécessite la préparation préalable de l'échantillon solide, visant à l'extraction d'une fraction soluble analysable.



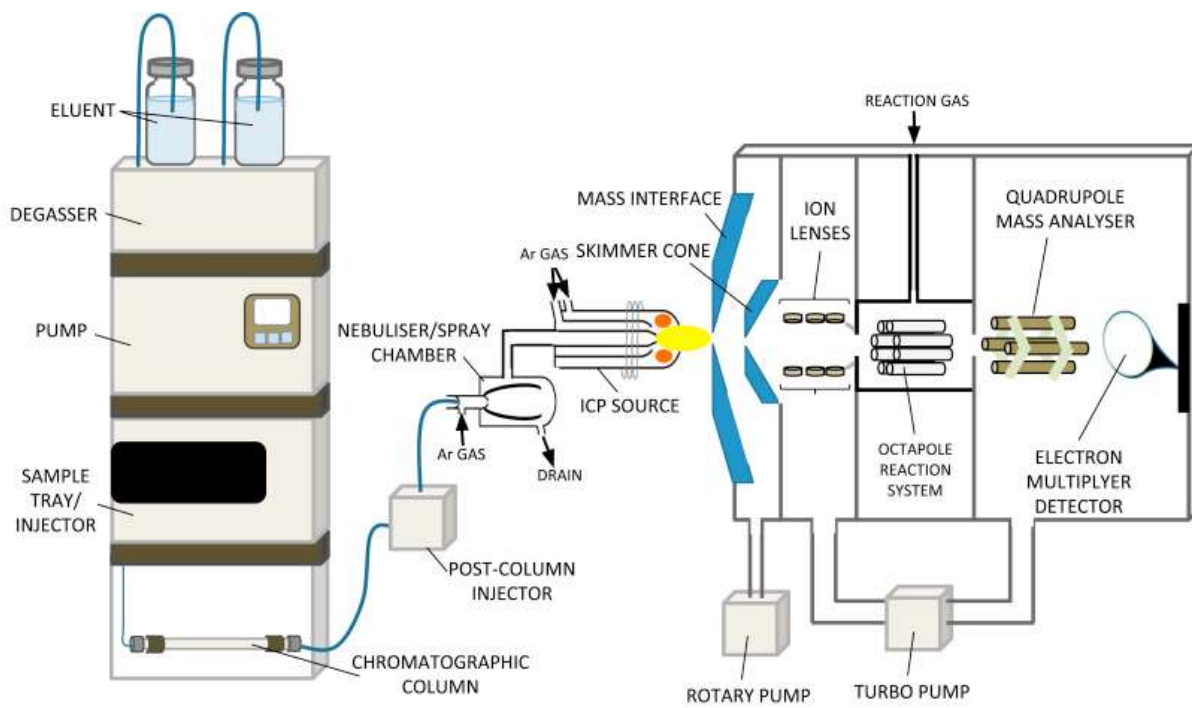


Figure 35 : Principe de l'ICP-MS couplée à l'HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) (Delafiori, 2016).



## OPEN

# Moderate Renal Failure Accentuates T1 Signal Enhancement in the Deep Cerebellar Nuclei of Gadodiamide-Treated Rats

Marlène Rasschaert, MS,\*†‡ Jean-Marc Idée, PharmD, MS,\* Philippe Robert, PhD,\*  
Nathalie Fretellier, PhD,\* Véronique Vives, BS,\* Xavier Violas, BS,\*  
Sébastien Ballet, PhD,\* and Claire Corot, PharmD, PhD\*

**Objectives:** The purpose of this preclinical study was to investigate whether moderate chronic kidney disease is a factor in potentiating gadolinium (Gd) uptake in the brain.

**Materials and Methods:** A comparative study was performed on renally impaired (subtotal nephrectomy) rats versus rats with normal renal function. The animals received 4 daily injections of 0.6 mmol Gd/kg a week for 5 weeks (cumulative dose of 12 mmol Gd/kg) of gadodiamide or saline solution. The MR signal enhancement in the deep cerebellar nuclei was monitored by weekly magnetic resonance imaging examinations. One week after the final injection, the total Gd concentration was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry in different regions of the brain including the cerebellum, plasma, cerebrospinal fluid, parietal bone, and femur.

**Results:** After the administration of gadodiamide, the subtotal nephrectomy group presented a significantly higher T1 signal enhancement in the deep cerebellar nuclei and a major increase in the total Gd concentration in all the studied structures, compared with the normal renal function group receiving the same linear Gd-based contrast agent. Those potentiated animals also showed a pronounced hypersignal in the choroid plexus, still persistent 6 days after the last injection, whereas low concentration of Gd was found in the cerebrospinal fluid (<0.05  $\mu\text{mol/L}$ ) at this time point. Plasma Gd concentration was then around 1  $\mu\text{mol/L}$ . Interestingly, plasma Gd was predominantly in a dissociated and soluble form (around 90% of total Gd). Total Gd concentrations in the brain, cerebellum, plasma, and bones correlated with creatinine clearance in both the gadodiamide-treated groups.

**Conclusions:** Renal insufficiency in rats potentiates Gd uptake in the cerebellum, brain, and bones.

**Key Words:** deep cerebellar nuclei, choroid plexus, bone, magnetic resonance imaging, gadolinium uptake, renal failure, gadodiamide

(*Invest Radiol* 2017;52: 255–264)

Gadolinium (Gd) brain uptake after repeated administration of Gd-based contrast agents (GBCAs) is becoming a prominent issue. Indeed, it has clearly been shown that repeated administrations of linear GBCA (LGBCA) lead to T1 signal enhancement in specific brain structures, in particular, the globus pallidus (GP) and dentate nuclei (DN).<sup>1–4</sup> Although it was previously thought that GBCAs do not cross a healthy blood-brain barrier,<sup>5</sup> the presence of Gd has

been demonstrated in these structures, and puncture Gd deposits have even been found within brain endothelial cells and the interstitium of DN of postmortem specimens.<sup>6</sup> This is raising important questions concerning the potential neurotoxic consequences of such accumulation. The Food and Drug Administration and European Medicines Agency have therefore requested marketing authorization holders to investigate this phenomenon in-depth.<sup>7,8</sup> Because clinical studies are currently limited by their retrospective study design and lack of access to brain tissue, a preclinical model on rats has been developed to standardize and better evaluate the mechanism and the GBCAs comparison. Robert et al<sup>9,10</sup> demonstrated similar T1 signal enhancement in the deep cerebellar nuclei (DCN), and this model is now being used to carry out more in-depth investigations.

A causal link between nephrogenic systemic fibrosis (NSF, a pathology characterized by fibrosis of skin and connective tissues, leading to disabling contracture of the joints) and prior administrations of linear GBCAs was demonstrated in patients with severe renal impairment in 2006.<sup>11</sup> Since then, health authorities have recommended that renal function should be systematically checked before considering the injection of a linear and thermodynamically less stable GBCA (ie, gadodiamide,<sup>12–14</sup> gadopentetate dimeglumine, and gadoversetamide) and contraindicated the use of such agents in patients with stage 4 and 5 chronic kidney disease (CKD), that is, glomerular filtration rate (GFR) equal to or lower than 30 mL/min per 1.73 m<sup>2</sup> or with acute kidney injury.<sup>15,16</sup>

Nowadays, many magnetic resonance imaging (MRI) examinations are performed in elderly patients. In a US series, stage 1 to 3 CKD was detected in 42% of patients aged 65 to 74 years and in 59% of patients aged 75 to 84 years.<sup>17</sup> Poor renal function could sensitize patients to exposure to these LGBCAs.<sup>18,19</sup> Therefore, it is of major importance to investigate Gd brain uptake in a relevant nonclinical model with moderate renal insufficiency to investigate whether reduced excretion and, as a consequence, increased systemic exposure to an LGBCA may favor the accumulation of Gd in the DCN. To test this hypothesis, we studied a population of subtotally nephrectomized (SNx) rats who received 20 injections of a clinical dose of an LGBCA, gadodiamide, or saline, over 5 weeks, and which were compared with a population of rats with normal renal function.

## MATERIALS AND METHODS

All experimental procedures and animal care were carried out according to French regulations and in compliance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. All experiments (injections, MRIs, image analyses, and Gd measurements) were carried out blindly.

### Animal Model and Administration Protocol

The general scheme of the protocol is illustrated in Figure 1. The study was carried out on SNx or sham female Sprague-Dawley rats (SPF/OFA female rats, Charles River, L'Arbresle, France) aged 10 weeks and weighing 232  $\pm$  14 g for sham-operated rats and 217  $\pm$  9 g for SNx rats at the beginning of the study. A subtotal nephrectomy (5/6 SNx) was performed at Charles River Laboratories: a first

Received for publication September 23, 2016; and accepted for publication, after revision, October 6, 2016.

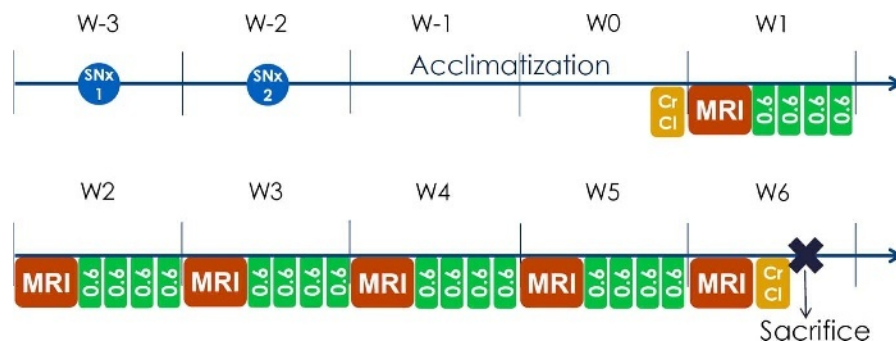
From the \*Guerbet Research and Innovation Department, Aulnay-sous-Bois; †Institut Curie, Centre de Recherche, PSL Research University; and ‡Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, CNRS, UMR-9187, INSERM, U1196, F-91405, Orsay, France.

Conflicts of interest and sources of funding: All authors are employees of Guerbet. Correspondence to: Marlène Rasschaert, MS, Guerbet Research and Innovation Department, Guerbet, BP57400, 95943 Roissy CDG Cedex, France. E-mail: marlene.rasschaert@guerbet-group.com.

Copyright © 2016 The Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

ISSN: 0020-9996/17/5205-0255

DOI: 10.1097/RLI.0000000000000339



**FIGURE 1.** Protocol scheme of the study. SNx, subtotal nephrectomy of the 5/6 or sham operation; SNx 1 indicates first part of the surgery; SNx 2, second part of the surgery; CrCl, creatinine clearance. MRI was performed before the first injection, and then once a week (W). Twenty injections of gadodiamide, 0.6 mmol Gd/kg/injection, were distributed over 5 weeks, leading to a cumulative dose of 12 mmol Gd/kg. Killing was performed 6 days after the last injection.

operation was performed when the rats were 6 weeks old to excise 1 kidney, and a second operation was performed 1 week later to remove the upper and lower poles of the remaining kidney. Similar surgery was performed at the same time in sham-operated control rats, but without kidney excision. After 1 week of recovery, and 1 additional week of acclimatization, the animals were randomized ( $n = 10/\text{group}$ ). The rats were housed 2 per cage, at an ambient temperature of  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , hygrometry of  $45\% \pm 10\%$ , in a room with 12/12 light/dark cycles. The animals had access to water and food ad libitum.

The animals received 20 injections of 0.6 mmol Gd/kg (1.2 mL/kg) of gadodiamide (linear and nonionic GBCA, Omniscan, 500 mmol Gd/L; GE Healthcare, Chalfont St Giles, United Kingdom, batches 12691428 and 12824340) or 0.9% saline solution (CDM Lavoisier, Paris, France) (1.2 mL/kg) in control groups. The injections were intravenous performed in the tail vein once a day, 4 days a week for 5 weeks, under isoflurane anesthesia (IsoFlo; Axience, Pantin, France). The 0.6 mmol Gd/kg dose corresponds to the clinical dose (0.1 mmol Gd/kg) adjusted for the body surface area of the rat species, as specified in Food and Drug Administration guidelines.<sup>20</sup> Endogenous creatinine clearance (CrCl) was calculated at the beginning (ie, 3 days before the first administration) and end of the study (ie, 5 days after the last injection) as according to the following formula:

$$\text{CrCl (mL/min/100 g bw)} = \frac{([\text{Gd}]_{\text{urine}} \times \text{Urinary output (mL/min)})}{([\text{Gd}]_{\text{plasma}}) \times 100/\text{body weight (g)}}$$

Plasma and urine creatinine measurements were performed using an enzymatic technique on an Abbott Architect ci8200 automated analyzer (Abbott, Rungis, France).

#### 4.7 T MRI Protocol

Magnetic resonance imaging procedures were run once a week, using a dedicated phased-array quadrature head coil in a gradient/shims insert B-GA 12S HP (660 mT/m intensity and 4570 T/m/s maximum slew rate) on a 4.7 T preclinical magnet (Biospec 47/40, Bruker, Ettlingen, Germany). The first MRI was performed before the first injection, and subsequent MRI examinations were performed once a week (just before the first injection of the week, ie, 72 hours after the last injection of the previous week). An MRI examination consisted of a T1-weighted 2D FLASH (repetition time/echo time, 50/1.782 milliseconds; 48 averages; in-plane resolution,  $164 \times 164 \mu\text{m}^2$ ; slice thickness, 700  $\mu\text{m}$ ; acquisition time, 6 minutes 36 seconds; targeted only on the cerebellum [11 slices], and T1 mapping on the slice displaying the DCN), using a FAIR-RARE (flow-sensitive alternating inversion recovery–rapid acquisition with relaxation enhancement) sequence (repetition time/effective echo time, 36.9/2079.9 milliseconds; 4 averages; in-plane resolution,  $164 \times 164 \mu\text{m}^2$ ; slice thickness,

700  $\mu\text{m}$ ; acquisition time, 11 minutes 5 seconds), with 8 inversion times (0, 100, 200, 400, 600, 800, 1200, 2000 milliseconds).

#### Tissue Collection

Two days after the last MRI examination and the day after the last CrCl measurement (in week 6), an Irwin test was performed on the animals to check for substantial behavioral abnormalities. The animals were then anesthetized with a mix of ketamine-xylazine (67.5 mg/kg ketamine [Imalgene; Merial SAS, Lyon, France], 6.36 mg/kg xylazine [Rompun; Bayer Healthcare, Loos, France]) by intraperitoneal injection. The cerebrospinal fluid (CSF) was collected from the cisterna magna using a catheter according to Zarghami et al.<sup>21</sup> Sublingual venous blood collection was performed, and the rats were then killed by exsanguination via the abdominal aorta, under isoflurane (overdose) anesthesia. The arterial blood was collected in 10 mL tubes with heparin, and the forebrain, cerebellum, parietal bone, and femur (epiphyses) were harvested and frozen at  $-20^\circ\text{C}$ . The different brain structures were then dissected: the forebrain was divided into the cortical brain and the subcortical brain. Coronal sections through the cerebellum at 1 mm intervals were performed using a Brain Slicer Matrix (Stoelting Co, Wood Dale, IL). The DCN were carefully dissected from the cerebellar parenchyma (visually on cerebellum slices of 1 mm thick, with the help of the anatomic reference on the rat brain atlas).<sup>22</sup> The brain stem was also collected.

#### Image Analysis

All image analyses were performed under blinded (for groups and time points) and randomized conditions. Both qualitative and quantitative evaluations of the DCN and the fourth ventricle (including the choroid plexus [CP]) T1 signal intensity were performed.

#### Qualitative Analysis of MR Examination Images

A blinded, qualitative evaluation of DCN enhancement was carried out by 4 different readers, blinded for the rat, group, and time point. A 3-point scoring scale for the DCN relative to adjacent areas was applied. A score of 0 was given for no enhancement in the DCN, 1 for doubtful enhancement, and 2 for definite enhancement. The mean score value was subsequently plotted for each reader.

#### Quantitative Analysis of MR Examination Images

Blinded quantitative analysis of the signal on randomized images was performed by positioning regions of interest (ROIs) in the different cerebellar structures: cerebellar parenchyma, brain stem, left and right DCN, and CP in the fourth ventricle.

Signal intensity was calculated as a ratio of the most visible of the 2 DCN zones a) to the cerebellar parenchyma signal (DCN-cerebellar parenchyma ratio) and b) to the brain stem signal (DCN-brain stem ratio).

Signal intensity in the CP was calculated as a ratio of the lateral part of the CP of the fourth ventricle signal (the most visible) to the cerebellar parenchyma signal (CP-cerebellar parenchyma ratio).

## R1 Mapping

R1 mapping was calculated on a pixel-by-pixel basis using an in-house developed software coded in MATLAB (The Mathworks Inc, Natick, MA), as described elsewhere.<sup>10</sup>

## Determination of Total Gd Tissue Concentrations

Total Gd concentrations in the cortical brain, subcortical brain, cerebellar parenchyma, DCN, brain stem, CSF, plasma, femur, and parietal bone were determined by ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry) (7700x; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) as described elsewhere,<sup>9</sup> after sample mineralization in 65% nitric acid at 80°C for 8 hours. The lower limit of quantification (LLOQ) of Gd was 0.02 nmol/mL in plasma and CSF, 0.02 nmol/g in brain matrix, and 0.10 nmol/g in bone matrix. In the case of plasma, concentrations of Gd dissociated from its chelate ( $Gd^{3+}$ ) were determined according to Frenzel et al,<sup>23</sup> by high pressure liquid chromatography (1260 Infinity Bioinerte; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with a 1-mL Chelating Sepharose column (Hi-Trap, GE-Healthcare, Uppsala, Sweden), coupled to the ICP-MS system. The signal intensity of the <sup>158</sup>Gd isotope was recorded and presented as a chromatogram. Dissociated  $Gd^{3+}$  was quantified against a calibration curve obtained with Gd nitrate ranging from 0.05 to 10  $\mu$ M in rat plasma.

To calculate the means, standard deviations (SDs), and to run statistical tests, values less than LLOQ were arbitrarily replaced with LLOQ/2, and values less than limit of detection were replaced with 0. To have a sufficient amount of material for total Gd measurement, the DCN were pooled for each test group.

## Statistical Analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Normality was assessed with the Shapiro-Wilk test or the Kolmogorov-Smirnov test, and homoscedasticity with Bartlett method.

## Characterization of Renal Function

The Kruskal-Wallis test by ranks was performed, followed by Dunn multiple comparisons.

## Qualitative Evaluation of T1 Enhancement in the DCN

A multinomial model was created, without 3-way interaction (group  $\times$  reader  $\times$  week). In case of significant 2-way interaction, pairwise comparisons were performed in both ways. *P* values were corrected with a Bonferroni-Holm adjustment, to control the family-wise error rate.

## T1-Signal Changes in the Fourth Ventricle Including the CP

A 2-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures was then performed. If significant, Bonferroni method post-tests were applied on time for each group, and further unpaired *t* tests were used to compare the 2 groups in the same week.

## Quantitative Evaluation of T1 Enhancement in the DCN

For each ratio, a mixed model was built with the factors group and week, and the interaction of both, to look for a potential significant difference between the groups. In the event of significant interaction, parameters were studied with pairwise comparisons, using a Tukey adjustment on generated *P* values.

## R1 Mapping

A 1-way ANOVA was performed. If the effect was significant, Bonferroni multiple comparisons were performed.

## Determination of Total Gd Concentrations in the Brain, Bones, and Plasma

A 1-way ANOVA was performed for each matrix. If the group effect was significant, pairwise comparisons were performed on all groups, with a Tukey adjustment on generated *P* values.

## Correlation Between Tissue Gd Concentrations and Renal Function

A linear regression analysis was performed on all gadodiamide-treated rats, taken together or separated, with a logarithmic transformation if it fitted better, to find the best model.

All statistical tests were bilateral with a significance level equal to 5%, except for normality (1%). Analyses were performed either with SAS v9.4 (SAS, Cary, NC) or GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA).

## RESULTS

At the beginning of the study, the body weight of SNx rats was significantly lower than that of sham rats ( $217 \pm 9$  g vs  $232 \pm 14$ ,  $P < 0.01$ ). Two animals did not complete the whole study. One rat from the saline + SNx group died during anesthesia at the first MRI examination, and one of the gadodiamide + SNx group died after 2 weeks of injections. In another rat from the gadodiamide + SNx group, skin lesions (a few localized scabs on the back skin) were observed.

## Characterization of Renal Function

Figure 2 shows the mean of the CrCl values (determined before and after the injection period). A slight but statistically significant recovery in CrCl was observed in both SNx groups between the beginning and end of the study (respectively, saline + SNx:  $0.19 \pm 0.02$  mL/min/100 g vs  $0.24 \pm 0.05$  mL/min/100 g,  $P = 0.02$ ; gadodiamide + SNx:  $0.20 \pm 0.08$  mL/min/100 g vs  $0.26 \pm 0.09$  mL/min/100 g,  $P = 0.002$ ), whereas the CrCl of animals with normal renal function remained stable (saline sham:  $0.49 \pm 0.13$  mL/min/100 g vs  $0.51 \pm 0.07$  mL/min/100 g,  $P = 0.71$  not significant [NS]; gadodiamide sham:  $0.51 \pm 0.18$  mL/min/100 g vs  $0.51 \pm 0.20$  mL/min/100 g,  $P = 0.85$  [NS]). Subtotal nephrectomy resulted in a decrease in renal function by  $63\% \pm 11\%$  compared with the animals with normal renal function at the start of the study, the gap reduced to  $53\% \pm 13\%$  at the end of the study (week 6). Gadodiamide did not significantly impact CrCl compared with saline, in both the sham-operated ( $P = 0.35$ ) and SNx groups ( $P = 0.47$ ).

## Qualitative Evaluation of T1 Enhancement in the DCN

Figure 3 shows typical images of the different groups at week 6 (last MRI examination). The 4 different blinded readers individually

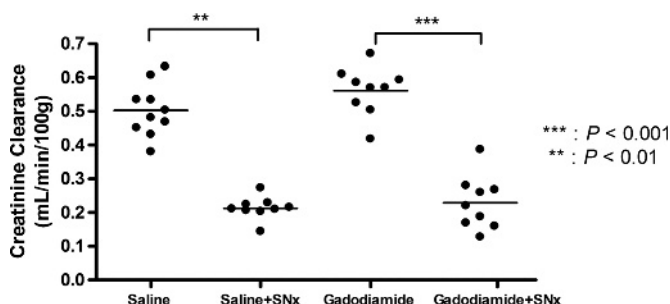
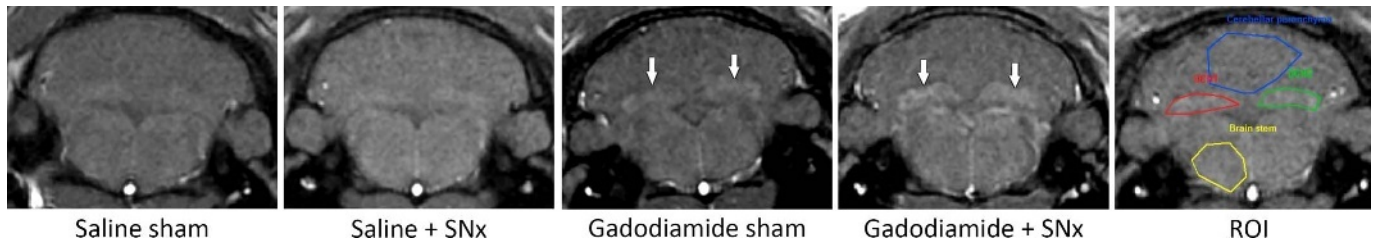


FIGURE 2. Individual CrCl values (mean of the 2 determinations) of the 4 different groups.





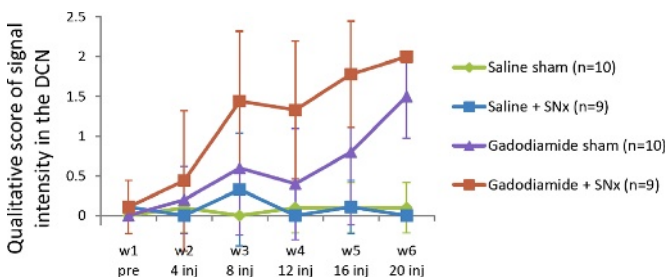
**FIGURE 3.** Typical T1w MR images obtained at week 6 (1 rat per group). DCN T1 hypersignal was observed in the 2 gadodiamide groups (white arrows). ROI refer to DCN (green and red), cerebellar parenchyma (blue), and brain stem (yellow).

scored 228 randomized images (38 rats × 6 MRI examinations/rat). As an example, 1 qualitative scoring is presented in Figure 4. Overall, repeated administration of gadodiamide resulted in a significant score increase in the sham group compared with the saline sham group from week 5 ( $P < 0.01$ ). In SNx rats, gadodiamide injections induced a significant score increase compared with saline from week 3 ( $P < 0.001$ ). The score for the gadodiamide + SNx group was significantly increased compared with the gadodiamide sham group in weeks 4 and 5 ( $P < 0.01$ ). Therefore, T1 signal enhancement was evidenced visually in the DCN of all gadodiamide-treated rats, and this effect was more obvious in SNx rats (from only 8 injections, corresponding to a cumulative dose of 4.8 mmol Gd/kg).

### Quantitative T1-Signal Changes in the Fourth Ventricle Including the CP

Eight of 9 animals from the gadodiamide + SNx group presented T1-enhancement in the fourth ventricle and the CP, occurring from 2 weeks of injections. Typical images of this specific enhancement are shown in Figure 5. The CP-brain stem and CP-cerebellar parenchyma ratios calculated at week 1 and 6 (ie, before and after the treatment period) for the gadodiamide + SNx and gadodiamide sham groups are presented in Figure 6. While before injection of gadodiamide, the CP-brain stem ratio was  $0.82 \pm 0.10$  in SNx rats versus  $0.84 \pm 0.05$  in sham rats (NS), this ratio increased after the injection period ( $P < 0.05$  for the gadodiamide sham group,  $P < 0.001$  for the gadodiamide + SNx rats). However, CP enhancement was significantly higher in SNx rats compared with sham rats after gadodiamide injections (ratio of  $1.13 \pm 0.10$  vs  $0.92 \pm 0.06$ ,  $P < 0.001$ ). A similar observation was made in the CP-cerebellar parenchyma ratio, although there was no significant increase between week 1 and week 6 in sham rats ( $0.93 \pm 0.05$  vs  $0.99 \pm 0.06$  [NS], compared with  $0.91 \pm 0.10$  versus  $1.25 \pm 0.12$  in SNx rats [ $P < 0.001$ ]).

It should be noted that, in the SNx rat receiving gadodiamide which was found dead, the T1 hypersignal in the DCN and CP was visually evidenced after only 1 week of injection.



**FIGURE 4.** Typical qualitative blinded evaluation: temporal changes in T1w signal enhancement between the DCN and surrounding cerebellar parenchyma, over the course of the injections (week 1: before the first injection; week 6: after 20 injections) (values are mean ± SD).

### Quantitative Analysis of T1 Enhancement in the DCN

Quantitatively, no significant T1 signal changes were observed in both saline groups. In the gadodiamide-treated groups, a significant increase in the DCN-brain stem T1 signal ratio was shown after 3 weeks of injections in the gadodiamide sham group (W1 vs W4 to W6:  $P < 0.001$ ; W2 vs W5 and W6:  $P < 0.001$ ; W3 vs W5 and W6:  $P < 0.05$ ) and after only 2 weeks of injections (ie, 1 week earlier) in the gadodiamide + SNx group (W1 vs W3 to W6:  $P < 0.001$ ; W2 vs W3:  $P < 0.05$ ; W2 vs W4 to W6:  $P < 0.001$ ) (Fig. 7A). A similar effect was seen with the DCN/cerebellar parenchyma ratio (Fig. 7B) for the gadodiamide sham group from 3 weeks of injections, and for the gadodiamide + SNx group, leading to a higher ratio for this group compared with the other groups from 2 weeks of injections (because no significant effect was found for the interaction group × week, no further statistical tests were performed). Therefore, renal failure was associated with an earlier and greater increase in both ratios after gadodiamide administration.

### R1 Mapping

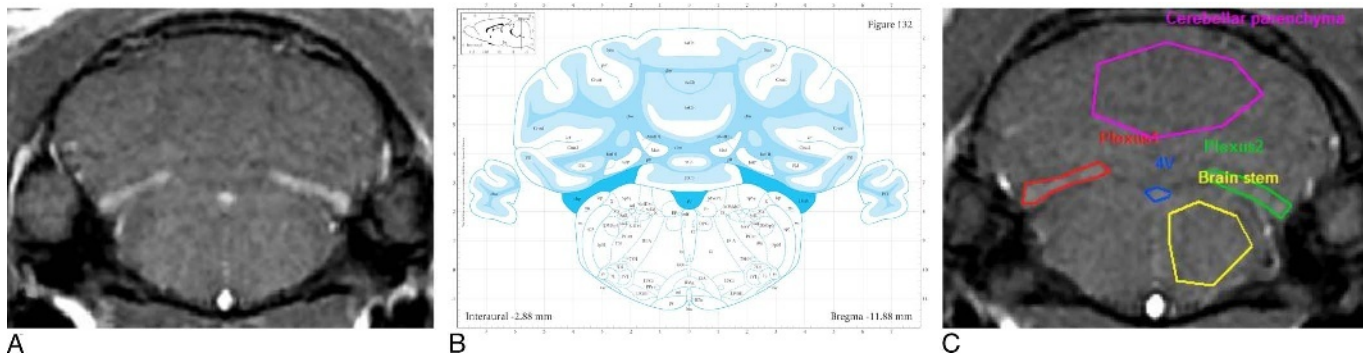
Typical images of cerebellum and DCN R1 mapping are shown in Figure 8. At the end of the injection period, the R1 value in the DCN was significantly higher in the gadodiamide + SNx group compared with the saline sham and SNx group (Fig. 9): gadodiamide + SNx ( $1.39 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ ) compared with the controls: saline sham ( $1.33 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ ) and saline + SNx ( $1.34 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ ) ( $P < 0.01$ ); gadodiamide sham ( $1.37 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$ ) (NS vs all groups).

### Determination of Total Gd Concentrations in the Brain, Bones, and Plasma

For gadodiamide-treated rats, renal insufficiency resulted in increased total Gd concentrations in all the brain areas compared with the sham-operated control rats (cortical brain:  $5.6 \pm 1.5$  vs  $2.5 \pm 0.3 \text{ nmol/g}$  [ $P < 0.001$ ]; subcortical brain:  $7.5 \pm 2.3$  vs  $3.4 \pm 0.5 \text{ nmol/g}$  [ $P < 0.001$ ]; cerebellar parenchyma:  $10 \pm 2.8$  vs  $4.7 \pm 0.5 \text{ nmol/g}$  [ $P < 0.001$ ]; brain stem:  $5.1 \pm 1.2$  vs  $2.6 \pm 0.9 \text{ nmol/g}$  [ $P < 0.001$ ], and pooled DCN:  $19.9$  vs  $12.3 \text{ nmol/g}$ ) (Fig. 10).

Total Gd concentration was determined in 2 different bones (femur and parietal bone) (Fig. 11). Renal insufficiency considerably increased the total Gd concentration in both bones (2.6 times in the parietal bone ( $134 \pm 43 \text{ nmol/g}$  vs  $351 \pm 97 \text{ nmol/g}$ ), and 2.8 times in the femur ( $185 \pm 26 \text{ nmol/g}$  vs  $546 \pm 171 \text{ nmol/g}$ ). No statistical test was performed versus the saline sham group because the total Gd concentrations were always below the limit of detection.

Circulating Gd (determined in plasma) was still present 6 days after the last gadodiamide administration, in relatively low concentrations for animals with normal renal function ( $0.11 \pm 0.04 \text{ nmol/mL}$ ) ( $P < 0.001$  vs saline + SNx group), but at a higher concentration in SNx rats ( $0.85 \pm 0.60 \text{ nmol/mL}$ ) ( $P < 0.001$  vs all groups). Liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry measurements indicated that, in both gadodiamide-treated groups, 93.6% ± 18% of the circulating Gd in sham rats + gadodiamide



**FIGURE 5.** A, Hypersignal in the choroid plexus (3 distinct areas) in the fourth ventricle of gadodiamide + SNx rats, in T1w MRI examinations performed in week 6, and (B) darkest blue areas are referred as choroid plexus (“chp”) of the fourth ventricle (“4V”) in the Paxinos and Watson atlas, 2007 (Bregma, -11.88 mm). (Reproduced with permission from<sup>22</sup>.) C, ROI refer to choroid plexus of the fourth ventricle (red, blue, and green), cerebellar parenchyma (pink), and brain stem (yellow).

and  $85.0\% \pm 23\%$  of the circulating Gd in SNx + gadodiamide were in soluble dissociated form (Fig. 12).

For the CSF, in all samples that were not contaminated with blood (ie, 24 of 38 samples), a total Gd concentration lower than 0.05 nmol/mL was found. In blood-contaminated samples from gadodiamide treated groups, a total Gd concentration of up to 1.14 nmol/L was found.

### Correlation Between Tissue Gd Concentrations and Renal Function

Correlations between CrCl (mean between W1 and W6) and tissue total Gd concentrations (Fig. 13) were determined in the gadodiamide-treated groups.

In all cases, a significant correlation was found with renal function. The best regression model was obtained after logarithmic transformation of the data, according to the formula:

$$[Gd] = a - b \cdot \log_{10}(CrCl).$$

The lower the CrCl, the higher the total Gd concentration in all tested tissues.

### DISCUSSION

Under the conditions of the present study, repeated injections of a linear GBCA in rats with poor renal function significantly potentiated Gd brain uptake and T1 hypersignal in the DCN.

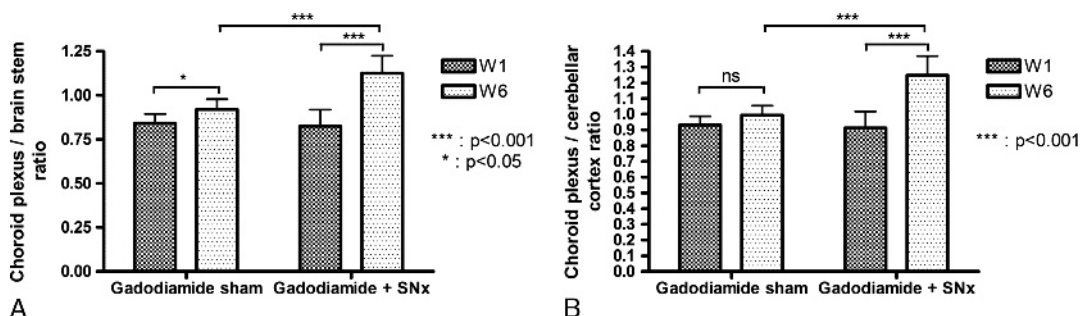
### Impact of Renal Function on T1 Hypersignal

While prevented from contracting NSF due to health authorities' recommendations, the specific population with stage 1 to 3 CKD is widely represented in everyday clinical practice and is therefore worth studying.

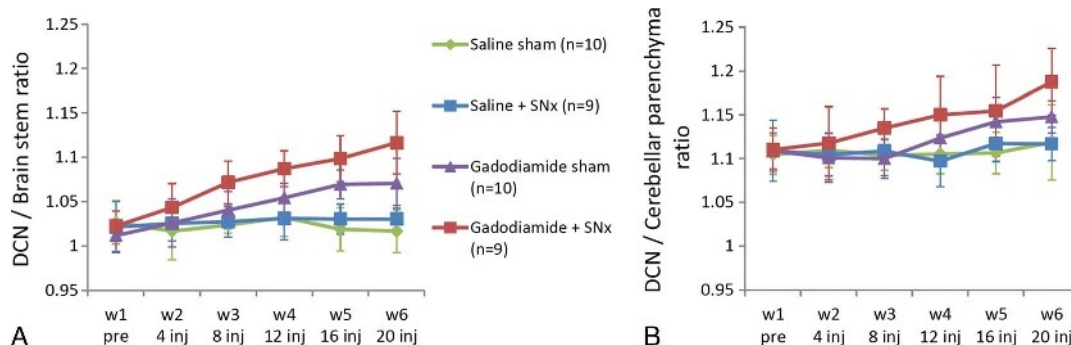
With our model of subtotal nephrectomy, a mean decrease in CrCl of  $58\% \pm 13\%$  (which would roughly correspond to stage 3 CKD in humans) was found. However, CrCl values ranged from 0.39 mL/min/100 g (similar to normal renal function) to 0.13 mL/min/100 g (75% decrease compared with  $0.56 \pm 0.07$  mL/min/100 g in the sham gadodiamide group). In our study, this wide range of CrCls allowed a realistic link to be established between renal function and brain uptake of Gd and also T1 signal enhancement.

Unlike another rat model of renal failure involving the addition of adenine in the diet,<sup>24</sup> subtotal nephrectomy represents a consistent model for studying moderated CKD. On exactly the same model of subtotal nephrectomy, Pietsch et al<sup>25</sup> determined Gd exposure after gadodiamide injection to be 3 times longer compared with healthy rats (area under the curve,  $962.9 \pm 245.4$  mmol/L min in SNx rats vs  $321.7 \pm 53.9$  mmol/L min in sham rats).

In both gadodiamide-treated groups, a significant T1 enhancement in the DCN was observed. This effect was significantly higher in the renally impaired group. The T1 effect in the gadodiamide sham group was significantly higher than that of the saline groups after 4 weeks of injections, whereas in the gadodiamide + SNx group, the effect was observed 2 weeks earlier. Quantitatively (for both the DCN-cerebellar parenchyma and DCN-brain stem T1 signal ratio), the same time evolution of T1-enhancement was observed.



**FIGURE 6.** Change in the choroid plexus/cerebellar parenchyma signal ratio and choroid plexus/brain stem signal ratio between week 1 and week 6 for gadodiamide sham (n = 10) and gadodiamide + SNx (n = 9) rats (mean + SD).



**FIGURE 7.** Evolution of DCN/cerebellar parenchyma and DCN/brain stem T1w signal ratio, over the course of the injections (mean ± SD). Statistical comparisons are described in the Results section.

We could speculate that the delay in T1 effect observed in the gadodiamide sham group versus the gadodiamide + SNx group reflects a delay in DCN Gd concentration. The 2-week interval in DCN T1 signal enhancement observed between gadodiamide + SNx and gadodiamide sham groups is also consistent with the pharmacokinetic profiles of gadodiamide in sham and SNx rats.<sup>25</sup> For the gadodiamide + SNx group, a wide variance was measured, but this value is assumed to be the result of the CrCl heterogeneity in this group.

**Reference Tissue for T1 Enhancement**

The relevance of the T1 DCN ratio versus the cerebellar parenchyma or the brain stem could be disputed owing to the nonnegligible concentrations of total Gd found in these areas. However, none of the measured tissues was found to be Gd-free, therefore there was no rigorous reference structure. Under our conditions, a slightly higher increase in the T1 signal was observed in both gadodiamide-treated groups over time in the cerebellar parenchyma compared with the brain stem (data not shown). Therefore, the DCN-brain stem and CP-brain stem ratios may be more reliable. Total Gd concentrations found in the gadodiamide sham group were consistent with those reported by Robert et al,<sup>9,10</sup> whereas in these studies, the killing was performed 3 weeks later, suggesting no washout effect during this 3-week period. Overall, total Gd concentrations are doubled in the case of renal failure (ratios of 1.6 in the DCN, 1.9 in the brain stem, 2.1 in the cerebellar parenchyma, 2.3 in the cortical and subcortical brain), suggesting that Gd exposure in moderately renally impaired rats is twice that of a healthy control population, for the same GBCA dose. Furthermore, in our study, the pooled DCN-brain stem Gd concentration ratio was 4.7 in gadodiamide sham rats compared with 4.1 in gadodiamide + SNx rats, that is, a similar ratio. The total Gd

concentration ratios for the pooled DCN-cerebellar parenchyma were, respectively, 2.6 and 2.1. This is consistent with a similar relative distribution of total Gd respective to these brain structures.

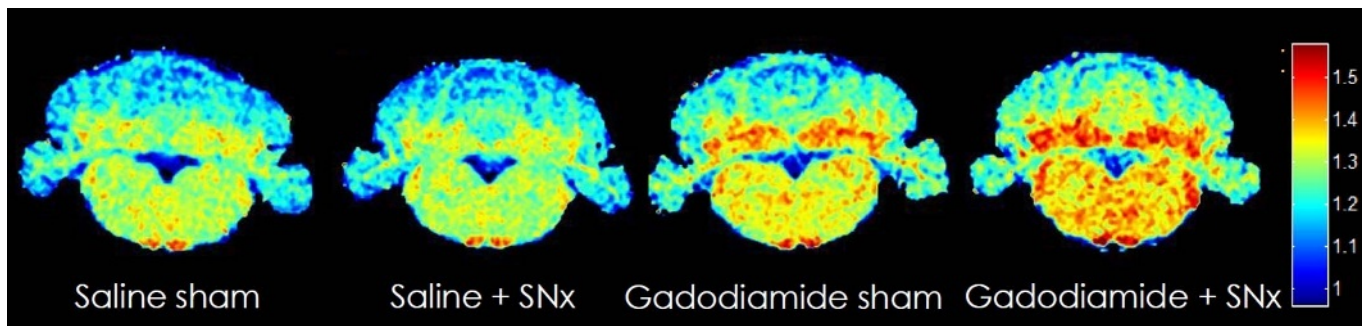
The quantification of the R1 relaxation rate in DCN (Fig. 9) prevents from standardization by a reference region, potentially containing Gd, to calculate the signal intensity ratio. This analysis confirms the aforementioned observations.

Interestingly, circulating Gd was still found 6 days after the last administration, notably in the renally impaired group. It is worth noting that almost all circulating Gd was in dissociated form (Fig. 12), which supports the hypothesis of in vivo dissociation of the nonionic LGBCA gadodiamide. A similar effect has already been reported in renally impaired rats treated with the same compound.<sup>14</sup>

**Impact of Renal Function on Gd Concentration**

For gadodiamide-treated rats, renal insufficiency resulted in a 2-fold increased total Gd concentration in the brain structures compared with those from sham rats. A longer washout period after completion of GBCAs administration would allow investigating whether the large difference in the Gd tissue concentration between healthy and 5/6 nephrectomized rats subsists.

Renal failure also substantially increased the total Gd concentration in bone tissue. The concentration ratio between SNx and sham gadodiamide-treated rats was 2.6 in the parietal bone and 3.0 in the femoral bone. It is widely acknowledged that bone tissue is a deep compartment for Gd storage.<sup>26-28</sup> The form in which Gd is stored in bone tissue remains unclear. Some authors suggest that Gd binds to hydroxyapatite,<sup>27,29</sup> a major component of the cortical bone tissue. Alternatively, Gd may be preferentially trapped in the bone marrow.<sup>28,30</sup> In our study, the Gd concentration was found to be higher in the femoral bone than in the tested flat bone, the latter being rich in bone marrow. However, we



**FIGURE 8.** Typical R1 mapping in week 6. An important R1 increase is evidenced in the DCN of gadodiamide-treated rats. However, a diffuse increase in R1 value is also observed in the cerebellar parenchyma and the brain stem.



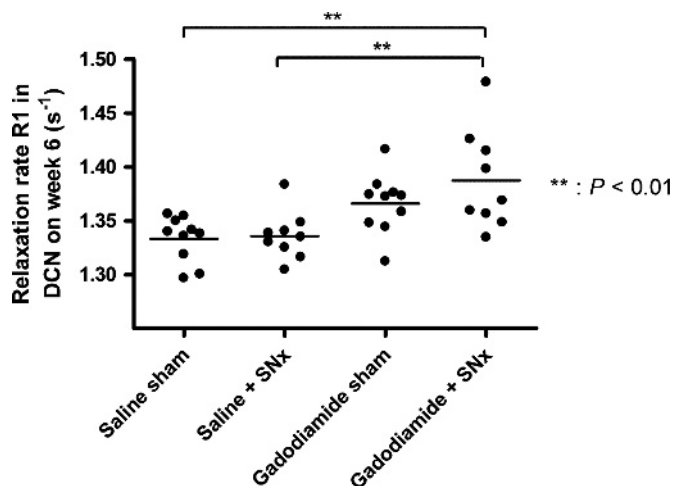


FIGURE 9. Relaxation rate R1 (s<sup>-1</sup>) determined in the DCN from T1 mapping performed at week 6.

cannot conclude that there is preferential storage in the cortical bone because only femoral epiphyses were sampled.

### Discrepancy Between Gd Concentration in the Cerebellar Parenchyma and T1w MR Signal

Basically, several hypotheses can be proposed after gadodiamide administration: (a) Gd remains in chelated form and gadodiamide is sequestered in the tissue; (b) gadodiamide releases dissociated and soluble Gd. In such case, Gd would be associated with a macromolecule, inducing an even greater T1 effect<sup>31</sup>; or (c) Gd is in a dissociated, insoluble form. In the latter case, no obvious T1 effect would be expected.<sup>14,32</sup> Of course, these possibilities are qualitatively not self-excluding. However, in the DCN, the insoluble Gd form is unlikely to be the predominant form.

The presence of Gd in the cerebellar parenchyma (notably the granular layer) at a similar concentration to the DCN has recently been found using LA-ICP-MS.<sup>33</sup> In our study, total Gd concentrations in the cerebellar parenchyma were 4.7 ± 0.5 nmol/g and 10.0 ± 2.8 nmol/g in the sham and SNx gadodiamide-treated groups, respectively. However, no T1 enhancement was observed, unlike in the DCN. This may suggest

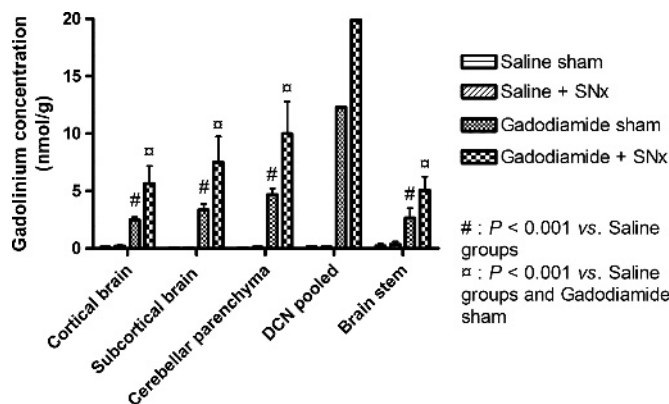


FIGURE 10. Gadolinium concentration determined by ICP-MS in the cortical and subcortical brain, cerebellar parenchyma, DCN (pooled by groups), and brain stem (mean ± SD). The Gd concentration in the gadodiamide + SNx group was significantly greater in all structures compared with the other groups ( $P < 0.001$ ).

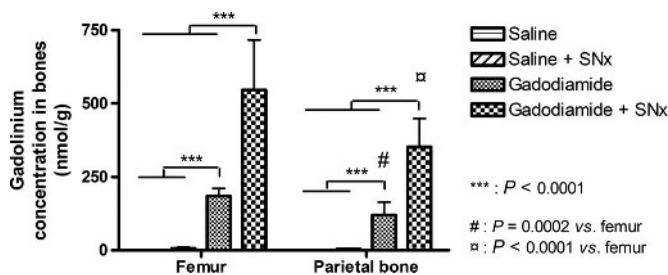


FIGURE 11. Gadolinium concentration in 2 different bones (mean ± SD).

that intratissue Gd is sequestered in the cerebellar parenchyma in a different form, without associated T1 effect.

### Location of Hypersignal in the CP

When the CSF was not contaminated by blood during the sampling procedure (ie, 24 of 38 samples), total Gd concentrations were lower than 0.05 μmol/L, 6 days after the last injection, whereas T1 enhancement was still evident in the fourth ventricle 4 days after the last injection. This suggests that the T1 enhancement was associated with the CP, and not the CSF itself. Furthermore, CSF turnover in rats is very short: it is renewed 11 times a day in 3-month-old rats compared with 3 to 4 times a day in humans.<sup>34</sup> T1 enhancement in the CP (in addition to GP and DN enhancement) was recently observed in hemodialyzed patients.<sup>19</sup> Our data strengthen the possibility that, with renal failure (ie, in the case of an increased exposure to LGBCA), Gd may also be trapped in the CP, in a form that leads to a T1 effect. This tissue is well known for sequestering toxic heavy metals and metalloid ions.<sup>35</sup> It is therefore assumed that Gd can cross the blood-cerebrospinal barrier, which would represent a passageway to the adjacent interstitium, as seen for “general toxicants” such as mercury, cadmium, or arsenic.<sup>35</sup> Indeed, tight junctions of the blood-CSF barrier are more permeable than those of the blood-brain barrier.<sup>36,37</sup> Moreover, Jost et al<sup>38</sup> recently demonstrated T1 enhancement in the CSF 1 minute after a single injection of all categories of GBCAs in rats, and Naganawa et al<sup>39</sup> reported T1 enhancement in the CSF after injection of a single dose of gadoteridol in healthy volunteers, from 1.5 hours postinjection, increasing until 3 hours postinjection, and then slowly decreasing. The DCN are adjacent to the CP of the fourth ventricle and are particularly rich in metals such as iron, copper, and zinc.<sup>40,41</sup> It could be speculated that, because GBCAs (all of them) may enter to the CSF through a transportation from CP, the local accumulation in the DCN (which are in the vicinity of the CP) in the case of LGBCAs with poor thermodynamic

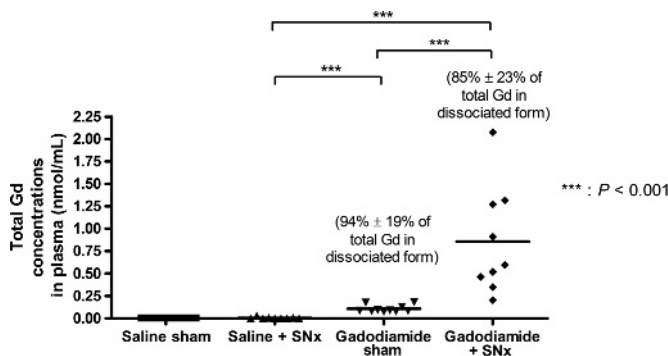


FIGURE 12. Total gadolinium concentration determined by ICP-MS in plasma collected 6 days after the last injection. Percentages (± SD) represent the proportion of dissociated Gd, determined by liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry.



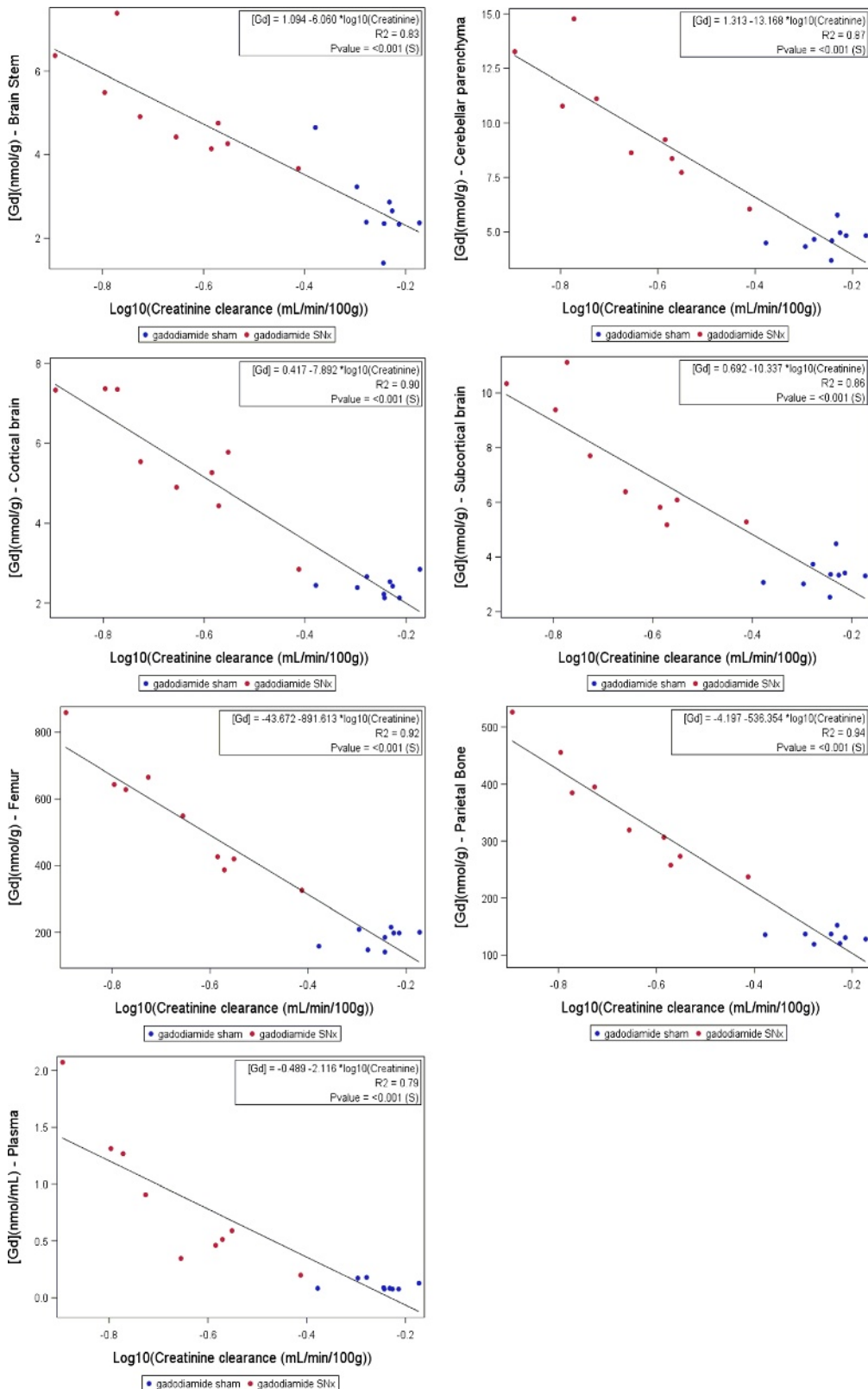


FIGURE 13. Logarithmic correlations between total Gd concentration in the studied tissues and CrCl.

stabilities, would be the result of a competition between local endogenous metals and Gd.<sup>12</sup>

Alternatively, renal impairment has been shown to increase the permeability of and active transports across the blood-brain barrier, including the blood-cerebrospinal fluid barrier.<sup>42,43</sup> It may therefore be speculated that this phenomenon plays a role by potentiating the GBCA access to the brain interstitium.

### Clinical Consequences of Brain Gd Retention

In the case of severe kidney disease, T1 enhancement in the CSF has been found to be associated with confusion and cognitive disorders.<sup>44–46</sup> In 3 patients with impaired renal function and vascular calcification (2 with confirmed NSF), unenhanced T1-weighted MRIs showed a high signal intensity in the dentate nucleus and the GP after they had been repeatedly exposed to LGBCAs. Interestingly, all 3 patients had transient signs of neurological disorders of undetermined cause.<sup>18</sup>

The cerebellum is an important target for many toxicants, including metals.<sup>47</sup> No overt behavioral abnormalities were observed under our experimental conditions. It is worth noting that no in-depth neurocognitive investigation was performed in this study and that the animals were killed shortly after the last administration. Because total Gd measurements were performed in the brain areas, no tissue was available for histological analysis. In-depth neurotoxicological studies are therefore warranted to investigate the risk associated with brain GBCA uptake.

Interestingly, the animal that died after only 2 weeks of injections presented the worst renal function at the beginning of the study (0.09 mL/min/100 g), and barely gained any bodyweight compared with the others. In this case, death could be the result of excessive renal insufficiency, independent from the gadodiamide injections. Indeed, the MRI examination performed after 1 week of injections already showed T1 signal enhancement in the DCN and CP. Furthermore, the animal that had skin lesions at the end of the study had the second worst renal function.

When the CrCl values of both gadodiamide-treated groups were analyzed together as a continuum, the total Gd concentrations in the brain structures were correlated to the renal function. The poorer the renal function, the more sensitized the subject, suggesting an accelerated Gd uptake in the tissues. A recent study in renally impaired mice concluded that renal failure, while increasing short-term retention of Gd in most organs (such as the liver, spleen, bones, and kidneys), did not affect brain retention.<sup>48</sup> These results are not consistent with our data. The discrepancy may be ascribed to differences in the experimental models. Notably, an 8-fold higher cumulated dose was administered compared with our study. Taking into account the body surface area normalization for converting doses (rat: x6, mouse: x12 compared with the human dose),<sup>20</sup> this would correspond to a 4-fold higher cumulated dose. This may attenuate the impact of renal failure on Gd brain concentrations. In a subsequent study with the same protocol, the same team demonstrated that, in the various brain areas of both renally impaired and naive mice treated with gadodiamide, the Gd clearance was limited over the time.<sup>49</sup>

It is generally reported that T1 signal enhancement may occur in the DCN and GP of patients who received repeated administrations of LGBCAs and have normal renal function.<sup>2</sup> Few studies have focused on patients with renal failure. Daily clinical practice sees a substantial population of patients with moderate renal failure.<sup>17</sup> Health authorities guidelines strictly contraindicate gadodiamide in patients with an estimated GFR below 30 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> and recommend that estimated GFR must be systematically measured in all gadodiamide-treated patients.<sup>15,16</sup> It may be speculated that these rules are not systematically followed in daily practice, as shown in recent studies.<sup>50,51</sup>

Future studies will compare the various molecular categories of GBCAs in renally impaired rats. In-depth neurotoxicological studies

are also needed to identify the clinical consequences of Gd deposits in the brain.

In conclusion, our results indicate that renal impairment substantially increases T1 signal enhancement in the DCN and tissue total Gd concentrations in gadodiamide chronically treated rats. Our data suggest that underlying poor renal function may increase the risk of brain (and other tissues) uptake of Gd in a form that remains to be elucidated. Our results advocate for a special warning in patients with moderate CKD treated with gadodiamide.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Cecile Factor, PhD, G  lle Jestin-Meyer, BS, and Izabela Strzeminska, MS, for the Gd determination in tissues; Claire Delannoy, PhD, Soladis for the statistical study; and Sonya Mountford-Jones, PhD, for reviewing the English language. The authors are grateful to Jean-Sebastien Raynaud, PhD, Mario Manto, MD, PhD, Jean-Luc Guerquin-Kern, PhD, and Sergio Marco, PhD, for the helpful discussions.

### REFERENCES

- Kanda T, Ishii K, Kawaguchi H, et al. 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*. 2014;270:834–841.
- Errante Y, Cirimele V, Mallio CA, et al. 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*. 2014;49:685–690.
- Weberling LD, Kieslich PJ, Kickingereder P, et al. Increased signal intensity in the dentate nucleus on unenhanced T1-weighted images after gadobenate dimeglumine administration. *Invest Radiol*. 2015;50:743–748.
- Runge VM. Safety of the gadolinium-based contrast agents for magnetic resonance imaging, focusing in part on their accumulation in the brain and especially the dentate nucleus. *Invest Radiol*. 2016;51:273–279.
- Geenen RWF, Krestin GP. Non-tissue specific MR contrast media. In: Thomsen HS, ed. *Contrast Media. Safety Issues and ESUR Guidelines*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2006:107–120.
- McDonald RJ, McDonald JS, Kallmes DF, et al. Intracranial gadolinium deposition after contrast-enhanced MR imaging. *Radiology*. 2015;275:772–782.
- Food and Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: FDA evaluating the risk of brain deposits with repeated use of gadolinium-based contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI). July 27, 2015. Available at: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm455386.htm>. Accessed July 14, 2016.
- European Medicine Agency. PRAC List of Questions. Procedure No. EMEA/H/A-31/1437. Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Referrals\\_document/gadolinium\\_contrast\\_agents\\_31/Procedure\\_started/WC500203485.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/gadolinium_contrast_agents_31/Procedure_started/WC500203485.pdf). Accessed July 14, 2016.
- Robert P, Lehericy S, Grand S, et al. 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*. 2015;50:473–480.
- Robert P, Violas X, Grand S, et al. Linear gadolinium-based contrast agents are associated with brain gadolinium retention in healthy rats. *Invest Radiol*. 2016; 51:73–82.
- Grobner T. Gadolinium—a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing demyelopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21:1104–1108.
- Port M, Idée JM, Medina C, et al. Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: a critical review. *Biometals*. 2008;21:469–490.
- Idée JM, Port M, Dencausse A, et al. Involvement of gadolinium chelates in the mechanism of nephrogenic systemic fibrosis: an update. *Radiol Clin North Am*. 2009;47:855–869.
- Fretellier N, Idée JM, Dencausse A, et al. Comparative in vivo dissociation of gadolinium chelates in renally impaired rats: a relaxometry study. *Invest Radiol*. 2011;46:292–300.
- European Medicine Agency. Assessment report for Gadolinium-containing contrast agents. Procedure No. EMEA/H/A-31/1097. July 1, 2010. Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Referrals\\_document/gadolinium\\_31/WC500099538.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/gadolinium_31/WC500099538.pdf). Accessed July 14, 2016.

16. Food and Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: New warnings for using gadolinium based contrast agents in patients with kidney dysfunction. October 9, 2010. Available at: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm223966.htm>. Accessed July 14, 2016.
17. Duru OK, Vargas RB, Kermah D, et al. High prevalence of stage 3 chronic kidney disease in older adults despite normal serum creatinine. *J Gen Intern Med.* 2009;24:86–92.
18. Barbieri S, Schroeder C, Froehlich JM, et al. High signal intensity in dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted MR images in three patients with impaired renal function and vascular calcification. *Contrast Media Mol Imaging.* 2016;11:245–250.
19. Cao Y, Zhang Y, Shih G, et al. Effect of renal function on gadolinium-related signal increases on unenhanced T1-weighted brain magnetic resonance imaging. *Invest Radiol.* 2016;51:677–682.
20. Food and Drug Administration. US Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry. Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. July 6, 2005. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM078932.pdf>. Accessed October 3, 2016.
21. Zarghami A, Alinezhad F, Pandamooz S, et al. A modified method for cerebrospinal fluid collection in anesthetized rat and evaluation of the efficacy. *Int J Mol Cell Med.* 2013;2:97–98.
22. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press. 2007.
23. Frenzel T, Lengsfeld P, Schirmer H, et al. Stability of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents in human serum at 37 degrees C. *Invest Radiol.* 2008;43:817–828.
24. Fretellier N, Bouzian N, Parmentier N, et al. Nephrogenic systemic fibrosis-like effects of magnetic resonance imaging contrast agents in rats with adenine-induced renal failure. *Toxicol Sci.* 2013;131:259–270.
25. Pietsch H, Lengsfeld P, Steger-Hartmann T, et al. Impact of renal impairment on long-term retention of gadolinium in the rodent skin following the administration of gadolinium-based contrast agents. *Invest Radiol.* 2009;44:226–233.
26. Hirano S, Suzuki KT. Exposure, metabolism, and toxicity of rare earths and related compounds. *Environ Health Perspect.* 1996;104(suppl 1):85–95.
27. Vidaud C, Bourgeois D, Meyer D. Bone as target organ for metals: the case of f-elements. *Chem Res Toxicol.* 2012;25:1161–1175.
28. Lancelot E. Revisiting the pharmacokinetic profiles of gadolinium-based contrast agents: differences in long-term biodistribution and excretion. *Invest Radiol.* 2016;51:691–700.
29. Thakral C, Alhariri J, Abraham JL. Long-term retention of gadolinium in tissues from nephrogenic systemic fibrosis patient after multiple gadolinium-enhanced MRI scans: case report and implications. *Contrast Media Mol Imaging.* 2007;2:199–205.
30. Drel VR, Tan C, Barnes JL, et al. Centrality of bone marrow in the severity of gadolinium-based contrast-induced systemic fibrosis. *FASEB J.* 2016;30:3026–3038.
31. Rowe PS, Zelenchuk LV, Laurence JS, et al. Do ASARM peptides play a role in nephrogenic systemic fibrosis? *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015;309:F764–F769.
32. Laurent S, Elst LV, Copoix F, et al. Stability of MRI paramagnetic contrast media: a proton relaxometric protocol for transmetallation assessment. *Invest Radiol.* 2001;36:115–122.
33. Lohrke J, Frisk AL, Frenzel T, et al. Gadolinium deposition in skin and brain after multiple, extended doses of linear and macrocyclic gadolinium chelates in rats. *RSNA (Radiological Society of North America); 101th Scientific Assembly and Annual Meeting; Chicago November 29th–December 4th 2015; abstract n.NR338-SD-TUA7.*
34. Johanson CE, Duncan JA 3rd, Klinge PM, et al. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2008;5:10.
35. Zheng W. Toxicology of choroid plexus: special reference to metal-induced neurotoxicities. *Microsc Res Tech.* 2001;52:89–103.
36. Nau R, Sörgel F, Eiffert H. Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:858–883.
37. Liddelow SA. Development of the choroid plexus and blood-CSF barrier. *Front Neurosci.* 2015;9:32.
38. Jost G, Lenhard DC, Sieber MA, et al. Signal increase on unenhanced T1-weighted images in the rat brain after repeated, extended doses of gadolinium-based contrast agents: comparison of linear and macrocyclic agents. *Invest Radiol.* 2016;51:83–89.
39. Naganawa S, Suzuki K, Yamazaki M, et al. Serial scans in healthy volunteers following intravenous administration of gadoteridol: time course of contrast enhancement in various cranial fluid spaces. *Magn Reson Med Sci.* 2014;13:7–13.
40. Popescu BF, Robinson CA, Rajput A, et al. Iron, copper, and zinc distribution of the cerebellum. *Cerebellum.* 2009;8:74–79.
41. Koeppe AH, Ramirez RL, Yu D, et al. Friedreich's ataxia causes redistribution of iron, copper, and zinc in the dentate nucleus. *Cerebellum.* 2012;11:845–860.
42. Fishman RA. Permeability changes in experimental uremic encephalopathy. *Arch Intern Med.* 1970;126:835–837.
43. Hosoya K, Tachikawa M. Roles of organic anion/cation transporters at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers involving uremic toxins. *Clin Exp Nephrol.* 2011;15:478–485.
44. Rai AT, Hogg JP. Persistence of gadolinium in CSF: a diagnostic pitfall in patients with end-stage renal disease. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2001;22:1357–1361.
45. Maramattom BV, Manno EM, Wijdicks EF, et al. Gadolinium encephalopathy in a patient with renal failure. *Neurology.* 2005;64:1276–1278.
46. Hui FK, Mullins M. Persistence of gadolinium contrast enhancement in CSF: a possible harbinger of gadolinium neurotoxicity? *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009;30:E1.
47. Manto M. Toxic agents causing cerebellar ataxia. In: Subramony SH, Dürr A, eds. *Handbook of Clinical Neurology. Ataxic Disorders.* Vol. 103 3rd Series. Edinburgh, Scotland. Elsevier BV. 2012;201–213.
48. Kartamihardja AA, Nakajima T, Kameo S, et al. Impact of impaired renal function on gadolinium retention after administration of gadolinium-based contrast agents in a mouse model. *Invest Radiol.* 2016;51:655–660.
49. Kartamihardja AA, Nakajima T, Kameo S, et al. Distribution and clearance of retained gadolinium in the brain: differences between linear and macrocyclic gadolinium based contrast agents in a mouse model. *Br J Radiol.* 2016;89:20160509.
50. Rees O, Agarwal SK. Nephrogenic systemic fibrosis: UK survey of the use of gadolinium-based contrast media. *Clin Radiol.* 2010;65:636–641.
51. Snaith B, Harris MA, Clarke R. Screening prior to gadolinium base contrast agent administration: a UK survey of guideline implementation and adherence. *Radiography.* 2016. [Epub ahead of print].

### 3. Synthèse des résultats

Le modèle d'insuffisance rénale par néphrectomie des 5/6<sup>e</sup> chez le Rat a permis l'obtention d'une diminution de la clairance de la créatinine endogène de  $58 \pm 13$  % en moyenne, correspondant chez l'Homme à une **insuffisance rénale modérée de stade 3**, stable au cours de l'étude.

**Chez les rats insuffisants rénaux** recevant des injections de gadodiamide, un **rehaussement T1 des DCN** (évalué par le rapport de signal T1 DCN/tronc cérébral) est apparu de façon **plus précoce et plus marquée** que chez les rats témoins. Les vitesses de relaxation R1 se sont aussi avérées augmentées chez les animaux insuffisants rénaux. Malheureusement, le calcul de la relaxivité  $r_1$ , correspondant au R1 rapporté à la concentration en Gd, n'a pas été exploitable (valeurs calculées aberrantes, proches de zéro ; les valeurs de R1 doivent donc être interprétées plus qualitativement que quantitativement), ce qui ne permet donc pas l'appréciation de la forme du Gd stocké.

Les **concentrations de Gd total** dans les différentes structures cérébrales analysées (cerveau cortical et sous-cortical, tronc cérébral, parenchyme cérébelleux, qui comprend le cortex du cervelet et la substance blanche, et DCN) se sont révélées être **deux fois plus élevées** chez les rats insuffisants rénaux que chez les rats témoins « sham ».

De plus, la variabilité de l'insuffisance rénale fournie par le modèle de néphrectomie a permis de mettre en évidence une **corrélation négative significative entre clairance de la créatinine et la concentration de Gd total accumulé**, et cela pour toutes les structures étudiées.

**L'insuffisance rénale** modérée semble donc **potentialiser l'accumulation cérébrale de Gd**, suggérant ainsi que cette population est potentiellement à risque, ce qui a été observé dans une étude clinique rétrospective (Cao, 2016). Notre modèle est donc « sensibilisé » et semble cliniquement pertinent.

Un **rehaussement T1 du 4<sup>e</sup> ventricule** a été observé chez les rats insuffisants rénaux, à partir de 2 semaines d'injections (soit après 8 administrations de gadodiamide). Il a persisté jusqu'à la fin de l'étude. Cependant, le dosage du liquide céphalorachidien prélevé lors de l'euthanasie (6 jours après la dernière injection) n'a pas révélé la présence de Gd. Cela suggère que, dans nos conditions expérimentales, le rehaussement et donc **l'accumulation de Gd** a lieu dans les **plexus choroïdes**, et non dans le liquide céphalorachidien. Cela ne permet cependant pas de conclure sur la barrière traversée lors du passage des chélates de Gd dans le compartiment liquidien du parenchyme cérébral.

Après injection de gadodiamide, nous avons observé une **accumulation de Gd plus importante dans les épiphyses du fémur** (idéalement, la diaphyse aurait dû être prélevée car elle correspond à une plus grande proportion d'os cortical), par rapport à l'os pariétal spongieux qui est, en proportion, moins riche en cristaux d'hydroxyapatite et en glycosaminoglycane sulfatés. Des concentrations de Gd total 2,6 à 3 fois plus importantes ont été dosées dans les os des animaux insuffisants rénaux par rapport aux rats sains. Là aussi, la concentration de Gd total était d'autant plus élevée que la fonction rénale estimée était plus faible.

Le dosage de Gd « libre » (dissocié) et total dans le plasma, six jours après la fin des injections, a révélé des concentrations totales de Gd total plus importantes chez les rats insuffisants rénaux (variables, mais dans un rapport de 4 en moyenne). Dans les deux cas (rats insuffisants rénaux ou sain), une grande **majorité du Gd circulant était présent sous forme libre et soluble (> 85%)**, indiquant une déchélation *in vivo* du gadodiamide.



L'étude relaxométrique à un champ de 1,42 T (60 MHz) (selon Fretellier, 2011b) d'une éventuelle déchélation (non mentionnée dans l'article) ne s'est pas révélée suffisamment sensible pour conclure sur la spéciation du Gd dans les structures cérébrales (les temps de relaxation T1 mesurés étaient trop proches de ceux des échantillons témoins (T1 diamagnétique), pour permettre le calcul des valeurs de  $r_1$ ).



## B. Comparaison de l'accumulation de chélates de Gd chez le Rat insuffisant rénal (Publication 2)

### 1. Analyse rationnelle

L'article précédent ayant établi que le modèle d'insuffisance rénale modérée par néphrectomie des 5/6<sup>e</sup> potentialise la capture cérébrale (et même systémique) de Gd après injections répétées de chélates de Gd, nous avons décidé de poursuivre nos travaux sur ce modèle expérimental. Nous avons posé l'hypothèse que ce modèle sensibilisé (et, qui plus est, cliniquement pertinent), devrait amplifier les différences d'effets entre les produits, sur une étude comparative de 3 agents de contraste.

L'étude a donc consisté en la comparaison du comportement de 3 chélates de Gd, de catégories structurales distinctes : le **gadotérate** (ligand macrocyclique ionique), le **gadobénate** (linéaire ionique), le **gadodiamide** (linéaire non-ionique, étudié dans la publication 1). Le protocole d'injection utilisé précédemment a été conservé, afin de permettre une comparaison entre les études. Cependant, nous avons ici ajouté un délai d'un mois après la dernière injection et avant le sacrifice, pour assurer un **suivi à plus long terme de l'accumulation du Gd**. On pourra ainsi documenter une éventuelle stabilisation, baisse ou augmentation du signal T1 en IRM, indiquant la réversibilité du phénomène, ou encore un changement de la forme du Gd accumulé. La comparaison des concentrations tissulaires de Gd total dosées à l'issue de l'étude, par rapport à celles de la première étude, permettra également de renseigner le phénomène de point de vue de la cinétique d'élimination.

Afin d'approfondir l'étude de la **distribution du Gd**, une dissection plus fine du cerveau a été réalisée. Différentes structures ont ainsi été prélevées : les DCN, le parenchyme cérébelleux, le tronc cérébral, le mésencéphale, le cortex cérébral, l'hypophyse, l'hippocampe, le thalamus, l'hypothalamus, le *striatum*, ainsi que les bulbes olfactifs. Les chélates de Gd étant susceptibles de se déchélater en présence de métaux endogènes et le Gd pouvant éventuellement accéder au compartiment liquidien du parenchyme cérébral par les voies de transport des métaux décrites plus haut, il nous est apparu nécessaire d'évaluer le **rôle des métaux endogènes** dans le phénomène d'accumulation cérébrale. Par conséquent, un dosage **multi-élémentaire de trois métaux endogènes**, le **fer**, le **cuivre** et le **zinc**, a été réalisé dans ces structures. L'excrétion urinaire des métaux a également été étudiée, notamment dans les heures suivant une injection de chélate de Gd.

Concernant la **capture osseuse** de Gd, soupçonnée de participer indirectement à la capture cérébrale, deux types d'os ont été prélevés (un os long, le fémur, et un os plat, l'os pariétal), ainsi que la moelle osseuse du fémur. Un suivi de la concentration du Gd total plasmatique, reflet potentiel d'un relargage d'un compartiment profond, a été effectué. L'insuffisance rénale ayant des effets connus sur la biochimie et la composition de l'os (Wei, 2016) une analyse histopathologique et un examen au microscanner X de l'os ont été réalisés chez 4 rats. Ces travaux sur la structure de l'os n'ont pas été inclus dans la publication.

Ces travaux ont fait l'objet de la publication suivante :

Rasschaert M, Emerit A, Fretellier N, Factor C, Robert P, Idée JM, Corot C. Gadolinium retention, brain T1 hyperintensity, and endogenous metals: A comparative study of macrocyclic versus linear gadolinium chelates in renally sensitized rats. *Invest Radiol.* 2018; **53**:328-337.





OPEN

# Gadolinium Retention, Brain T1 Hyperintensity, and Endogenous Metals

## A Comparative Study of Macrocyclic Versus Linear Gadolinium Chelates in Renally Sensitized Rats

Marlène Rasschaert, MS,\*†‡§¶||¶¶ Andréa Emerit, MS,\* Nathalie Fretellier, PhD,\* Cécile Factor, PhD,\* Philippe Robert, PhD,\* Jean-Marc Idée, PharmD, MS,\* and Claire Corot, PharmD, PhD\*

**Objectives:** This preclinical study was designed to compare gadolinium (Gd) brain uptake after repeated injections of a macrocyclic Gd-based contrast agent (GBCA) (gadoterate meglumine) or 2 linear GBCAs (L-GBCAs) (gadobenate dimeglumine or gadodiamide) on a translational model of moderate renal impairment in rats.

**Methods:** The study was carried out in subtotally nephrectomized rats. Animals received 4 intravenous injections per week of GBCA (gadoterate meglumine, gadobenate dimeglumine, or gadodiamide) for 5 weeks, resulting in a cumulative dose of 12 mmol/kg, followed by a 1-month injection-free period. T1 hyperintensity in the deep cerebellar nuclei (DCNs) was investigated, and brain structures were carefully dissected to determine elemental Gd, iron (Fe), copper (Cu), and zinc (Zn) distribution by mass spectrometry. Urinary excretion of endogenous metals was also investigated soon after GBCA administration and several days later in order to assess a potential transmetalation phenomenon.

**Results:** Unlike gadoterate, repeated injections of L-GBCAs gadobenate and gadodiamide both induced T1 hyperintensity in the DCNs. Fine dissection of cerebral and cerebellar structures demonstrated very low levels or absence of Gd after repeated injections of gadoterate, in contrast to the two L-GBCAs, for which the highest total Gd concentration was demonstrated in the DCNs (Gd concentration in DCNs after 4.5 weeks of injection-free period:  $27.1 \pm 6.5$  nmol/g for gadodiamide [ $P < 0.01$  vs saline and  $P < 0.05$  vs gadoterate];  $12.0 \pm 2.6$  nmol/g for gadobenate [ $P < 0.09$  vs saline]; compared with  $1.4 \pm 0.2$  nmol/g for gadoterate [ns vs saline]). The distribution of Gd concentration among the various brain structures dissected was also well correlated with the Fe distribution in these structures. No difference in endogenous metal levels in brain structures was observed. However, injection of gadobenate or gadodiamide resulted in an increase in urinary Zn excretion (urinary Zn concentrations:  $57.9 \pm 20.5$  nmol/mL with gadobenate [ $P < 0.01$  vs gadoterate and saline] and  $221.6 \pm 83.3$  nmol/L with gadodiamide [ $P < 0.0001$  vs all other treatments] vs  $8.1 \pm 2.3$  nmol/L with saline and  $10.6 \pm 4.8$  nmol/L with gadoterate]).

**Conclusions:** In a model of renally impaired rats, only traces of gadoterate meglumine were detected in the brain with no T1 hyperintensity of the DCNs, whereas marked Gd retention was observed in almost all brain areas after injections of the L-GBCAs, gadobenate dimeglumine and gadodiamide. Brain structures with higher Gd uptake corresponded to those structures containing more

Fe. Urinary Zn excretion was significantly increased after a single injection of L-GBCAs.

**Key Words:** cerebellum, endogenous metals, gadobenate dimeglumine, gadodiamide, gadolinium uptake, gadoterate meglumine, magnetic resonance imaging, renal impairment

(*Invest Radiol* 2018;53: 328–337)

The recent findings of gadolinium (Gd) accumulation in the brain following repeated injections of Gd-based contrast agents (GBCAs) have raised considerable interest in the scientific community, and this accumulation could potentially represent a major concern for patients. Health authorities, especially the US Food and Drug Administration and the European Medicines Agency, have urged marketing authorization holders to elucidate this phenomenon, which may require reevaluation of the safety of GBCAs in everyday use.

It is generally accepted that Gd accumulation in tissues is much higher with linear GBCAs (L-GBCAs) than macrocyclic agents and is inversely proportional to their thermodynamic conditional stability constant  $\log K_{\text{cond}}$ , calculated for pH 7.4 and kinetic stabilities for L-GBCAs and driven by the high kinetic stabilities (ie, very low dissociation kinetics) of macrocyclic GBCAs (M-GBCAs),<sup>1</sup> as demonstrated in nonclinical models<sup>2,3</sup> and in humans.<sup>4–10</sup> Gadolinium accumulation in the central nervous system depends on the cumulative dose,<sup>7</sup> with heterogeneous cerebral Gd distribution.<sup>11,12</sup>

The detection of at-risk populations is of critical clinical importance, and recent clinical studies have focused on potentially sensitized populations such as pediatric patients,<sup>13–15</sup> newborns after potential exposure by injection to the mother during pregnancy,<sup>16–18</sup> or renally impaired subjects.<sup>19,20</sup>

Almost all preclinical studies are performed in rodent species, which constitute a relevant translational model,<sup>21,22</sup> reproducing the T1 effect and Gd accumulation in the deep cerebellar nuclei (DCNs).

A previous study demonstrated that moderate renal impairment induced by subtotal nephrectomy constituted a sensitive model to study brain Gd uptake in the rat. Indeed, it amplified the brain Gd retention and T1 hyperintensity for an identical injected dose of gadodiamide compared with animals with normal renal function.<sup>23</sup> Gadolinium uptake was positively correlated with the severity of renal impairment.<sup>24</sup> We therefore decided to compare the behavior of different molecular categories of GBCAs in this same model.

This model seems to be translationally and clinically relevant, as the estimated prevalence of chronic kidney disease (CKD) in patients 70 years or older in the United States (estimated with the CKD-EPI equation) is 46.8%,<sup>24</sup> and the vast majority of these patients present stage 3 CKD, that is, moderate renal failure (glomerular filtration rate between 30 and 59 mL/min per 1.73 m<sup>2</sup>).<sup>24,25</sup>

Older people represent a population of major concern, in which contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI) examinations are commonly performed. This population of patients may be repeatedly

Received for publication November 22, 2017; and accepted for publication, after revision, December 5, 2017.

From the \*Guerbet Research and Innovation Department, Aulnay-sous-Bois; and †INSERM, U1196; ‡Institut Curie, PSL Research University; §Université Paris Sud; ¶Université Paris-Saclay; and ¶CNRS, UMR 9187, Orsay, France.

Correspondence to: Marlène Rasschaert, MS, Guerbet Research and Innovation Department, Guerbet, BP57400, 95943 Roissy CDG Cedex, France. E-mail: marlene.rasschaert@guerbet-group.com.

Copyright © 2018 The Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

ISSN: 0020-9996/18/5306-0328

DOI: 10.1097/RLI.0000000000000447



exposed to linear Gd chelates, which are not contraindicated for patients with stage 3 CKD.<sup>26,27</sup>

The purpose of this study was therefore to compare all categories of GBCAs, that is, a linear ionic GBCA (gadobenate), a linear nonionic GBCA (gadodiamide), and an M-GBCA (gadoterate), in a rat model of moderate renal failure mimicking a substantial population of patients exposed to GBCAs.

### MATERIALS AND METHODS

All experimental procedures and animal care were carried out according to French regulations and in compliance with European Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. All experiments (administrations, imaging, image analyses, and total Gd concentration measurements) were carried out blindly.

#### Animal Model and Administration Protocol

The study was carried out on 5/6th subtotaly nephrectomized female Sprague-Dawley rats (SPF/OFA rats; Charles River, L'Arbresle, France) aged 10 weeks and weighing 246 ± 15 g at the beginning of the study. Subtotal nephrectomy was performed at Charles River Laboratories: a first surgical procedure was performed when the rats were 6 weeks old to excise 1 kidney, and a second procedure was performed 1 week later to remove the 2 poles of the remaining kidney. After 2 weeks of recovery and acclimatization, the animals were randomized (n = 10/group, except for the saline group, which included 9 rats). The rats were housed 2 per cage, at an ambient temperature of 22°C ± 2°C, hygrometry of 45% ± 10%, in a room with 12:12-hour light-dark cycles. Rats had access to water and food ad libitum.

The animals received 20 injections of 0.6 mmol Gd/kg per injection (1.2 mL/kg) of meglumine gadoterate (macrocytic ionic GBCA, Dotarem 500 mmol Gd/L [Guerbet, France], batches 14GD107A and 16GD091A), dimeglumine gadobenate (linear ionic GBCA, MultiHance 500 mmol Gd/L [Bracco, Italy], batch SP6251H), or gadodiamide (linear nonionic GBCA, Omniscan 500 mmol Gd/L [GE Healthcare, Chalfont St Giles, United Kingdom], batch 12965458), and the control group received 0.9% saline solution (CDM Lavoisier, Paris, France) (1.2 mL/kg). Intravenous injections

were performed in the tail once a day, 4 days a week for 5 weeks, under isoflurane anesthesia (IsoFlo; Axience, Pantin, France). The 0.6-mmol Gd/kg dose corresponds to the clinical dose (0.1 mmol Gd/kg) adjusted to the body surface area of the rat according to the US Food and Drug Administration guidelines.<sup>28</sup> A 4.5-week injection-free period was observed after the last injection. The study protocol is shown in Figure 1.

#### Creatinine Clearance

Endogenous creatinine clearance (CrCl) was determined from plasma and 24-hour urine collected at the beginning (ie, the week before the first administration) of the study, after the administration period (the week after the last administration), and at completion of the study (ie, 4 weeks after the last administration). Plasma and urine creatinine concentrations were assayed by an enzymatic technique on an Abbott Architect ci8200 automated analyzer (Abbott, Rungis, France).

#### Magnetic Resonance Imaging Protocol

Magnetic resonance imaging procedures were performed once a week, using a dedicated phased-array quadrature head coil in a gradient/shims insert B-GA 12S HP (660 mT/m intensity and 4570 T/m/s maximum slew rate) on a 4.7 T preclinical magnet (Biospec 47/40; Bruker, Ettlingen, Germany). The first MRI was performed before the first injection, and subsequent MRI examinations were performed once a week (just before the first injection of the week, ie, 72 hours after the last injection of the previous week). An MRI examination consisted of a T1-weighted 2-dimensional FLASH (fast low-angle shot) sequence (repetition time/echo time, 50/1.78 milliseconds; 48 averages; in-plane resolution, 164 × 164 μm<sup>2</sup>; slice thickness, 700 μm; acquisition time 6 minutes 36 seconds), targeted exclusively on the cerebellum (11 slices), and T1 mapping on the slice displaying the DCNs, using a FAIR (flow-sensitive alternating inversion recovery)-RARE (rapid acquisition with relaxation enhancement) sequence with 8 inversion times (0, 100, 200, 400, 600, 800, 1200, 2000 milliseconds; repetition time/effective echo time, 36.9/2079.9 milliseconds; 4 averages; in-plane resolution 164 × 164 μm<sup>2</sup>; slice thickness, 700 μm; and acquisition time, 11 minutes 5 seconds).

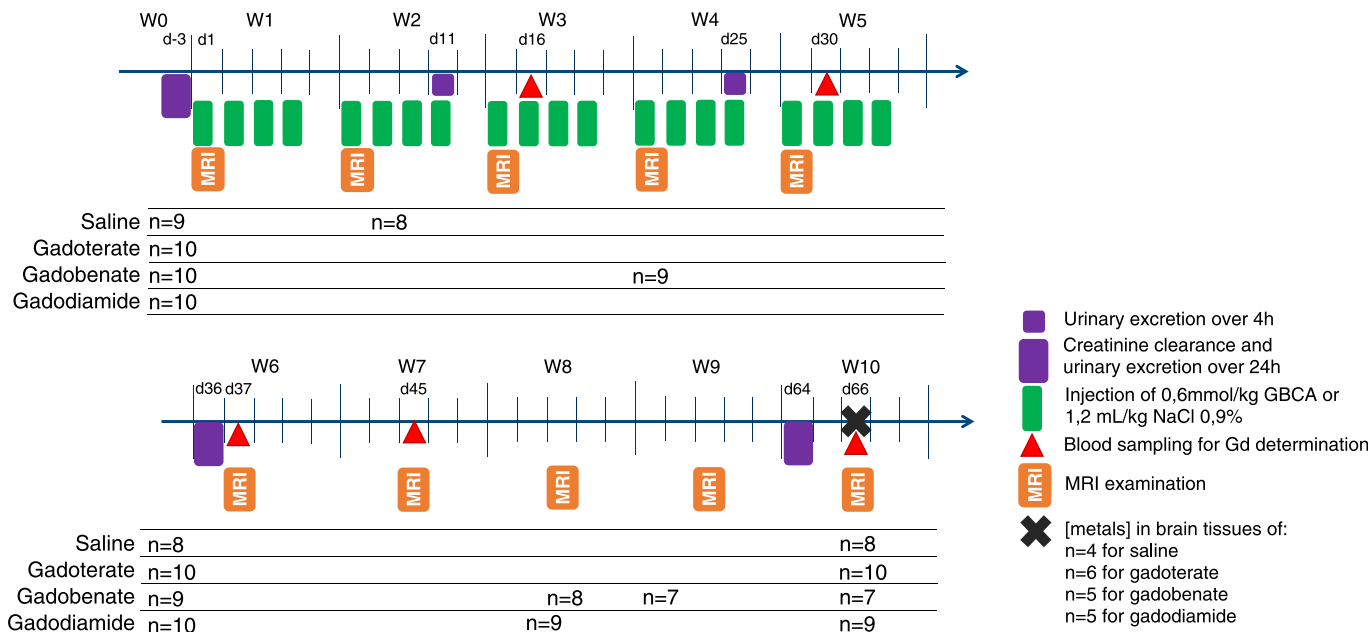


FIGURE 1. Study protocol. Subtotally nephrectomized rats received 20 injections of 0.6 mmol/kg over 5 weeks (cumulative dose of 12 mmol Gd/kg).

## Blood and Tissue Collection

On days 16, 30 (before the daily injection), 37, and 45 (before the weekly MRI examination), rats were anesthetized with isoflurane, and a 600- $\mu$ L sublingual blood sample was drawn. Plasma was harvested after centrifugation and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for subsequent determination of Gd concentrations. At completion of the study, on week 10 (day 66), the animals were anesthetized with 5% isoflurane in oxygen. Sublingual venous blood was collected in heparinized tubes, and the rats were subsequently killed by exsanguination via the abdominal aorta. Venous plasma was collected after centrifugation and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . For 4 to 6 rats per group (Fig. 1) (the other rats were used for other experiments), the forebrain was carefully harvested, and the following structures: cortical forebrain, amygdala, olfactory bulbs, mid-brain, hippocampus, hypothalamus, thalamus, and striatum, were dissected.<sup>29,30</sup> The frozen cerebellum was sliced using a Brain Slicer Matrix (Stoelting Co, Wood Dale, Ill), and the DCNs, cerebellum except the DCNs (called “cerebellum\*”), and brain stem were carefully dissected. The DCNs were clearly distinguishable on 1-mm slices of fresh tissue as shown in Figure 2. Tissues were then frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for determination of total Gd concentrations.

## Image Analysis

All image analyses were performed under blinded (for both test groups and all time points) and randomized conditions. Both qualitative and quantitative evaluations of the DCN T1 signal intensity were performed.

## Qualitative Analysis of MRI Scans

Qualitative evaluation of T1 signal enhancement in the DCNs was performed under blinded conditions for the rat, group, and time point. A 3-point scoring scale for the DCNs relative to adjacent areas was applied: a score of 0 was attributed for no enhancement in the DCNs, 1 for doubtful enhancement, and 2 for definite enhancement.

## Quantitative Analysis of MRI Scans

Blinded quantitative analysis of signal intensity on randomized images was performed by positioning regions of interest in the various cerebellar structures: cerebellar parenchyma, brain stem, and left and right DCNs. Signal intensity was calculated as the ratio of the DCNs with the highest signal to the brain stem signal (DCN<sub>max</sub>-to-brain stem ratio).

## R1 Mapping and Determination

R1 mapping was calculated from the FAIR-RARE acquisition on a pixel-by-pixel basis using in-house software written in MATLAB (The Mathworks Inc, Natick, Mass). The same regions of interest as those used for the FLASH sequence were positioned, and the R1 value was extracted.

## Determination of Tissue Total Gd, Iron, Copper, and Zinc Concentrations

Total Gd concentrations in the various tissues collected were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (7700x; Agilent Technologies, Santa Clara, Calif) after sample mineralization in 65% nitric acid for 8 hours at a temperature of

$80^{\circ}\text{C}$ . The lower limits of quantification (LLOQs) of Gd were 0.02 nmol/mL in plasma, 0.14 nmol/g in DCNs, 0.03 nmol/g in hypothalamus, and 0.02 nmol/g in other brain matrices. The LLOQs in urine were 0.07 nmol/mL for Gd, 8 nmol/mL for iron (Fe), and 7 nmol/mL for copper (Cu) and zinc (Zn).

For calculation of means, SDs, and for statistical tests, values less than the LLOQ were arbitrarily replaced by LLOQ, and values less than the limit of detection were arbitrarily replaced by 0.

## Urinary Excretion of Gd and Endogenous Metals

In addition to the 24-hour urine collection performed for determination of CrCl (before any injection [day 3], 4 days [day 36], and 1 month [day 64] after the last injection), rats were also placed in a metabolism cage for 4 hours, starting 1 hour after the daily GBCA injection, at weeks 2 and 4 (days 11 and 25), in order to determine the urinary excretion of endogenous metals (Fe, Zn, Cu) and total Gd following a GBCA injection.

## Statistical Analysis

Values are shown as individual data, or mean  $\pm$  SD. Dixon exclusion test was used to exclude aberrant values at a 5% risk. Normality was verified by the Shapiro-Wilk test.<sup>31</sup> A 2-way analysis of variance with repeated measures was performed for CrCl and plasma Gd concentrations. When 1 or several parameters (time or group) were significant, Tukey post hoc tests were applied to compare values for these parameters. Two-way analysis of variance and Tukey post hoc tests were also applied for quantification of T1 signal enhancement in DCNs, R1 mapping, and urinary excretion of metals. Kruskal-Wallis test and Dunn post hoc test, when required, were used for simple comparison of total Gd concentrations in the various brain tissues between groups. Pearson correlation coefficient was calculated for correlations between metals. Graphs present the values for all rats, but repeated-measure statistics were performed only on values from rats that completed the study. A significance level of 5% was adopted.

## RESULTS

During the second MRI examination, 1 rat in the saline group died of anesthesia, and 3 rats in the gadobenate group and 1 rat in the gadodiamide group died during the study (2 rats in the gadobenate group lost between 17% and 19% of body weight and were killed for ethical reasons on days 21 and 52; the others were found dead, 1 in the gadodiamide group on day 51 with a body weight loss of 23% and 1 in the gadobenate group on day 57 with a body weight loss of 12%). Consequently, on completion of the study, the numbers of rats per group were 10 for gadoterate, 9 for gadodiamide, 8 for saline, and 7 for gadobenate.

## Creatinine Clearance

Subtotal nephrectomy resulted in moderate renal impairment (CrCl of tested rats was  $0.21 \pm 0.05$  mL/min per 100 g prior to administration of the test compounds). A transient improvement in renal function was observed after the injection period (CrCl of  $0.31 \pm 0.09$  mL/min per 100 g), independently of the group ( $P < 0.0001$  for all groups). After the injection-free period, CrCl decreased ( $P < 0.0001$  for all groups vs post-injection), reaching an intermediate value (CrCl of  $0.25 \pm 0.05$  mL/min



**FIGURE 2.** Fresh cerebellar slices of 1 mm, starting (left) from the caudal extremity, obtained with the Brain Slicer Matrix. Coronal plane. Deep cerebellar nuclei (red arrows) appear in light pink, surrounded by white matter.

per 100 g) between the first 2 CrCl measurements. The rats in the gadobenate and gadodiamide groups that died during the study had severely impaired renal function: 0.09, 0.10, and 0.14 mL/min per 100 g for the rats in the gadobenate group and 0.13 mL/min per 100 g for the rat in the gadodiamide group at the last CrCl estimation.

### Qualitative Evaluation of T1 Enhancement of DCNs on T1-Weighted MRI Examinations

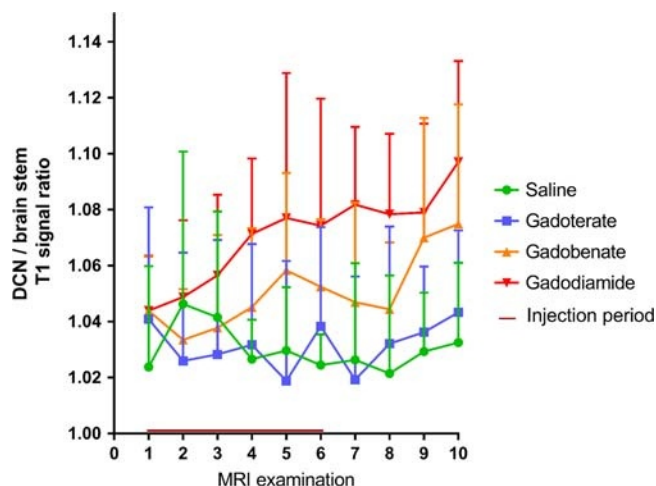
Typical images at week 10 are shown in Figure 3A. A progressive and lasting increase in T1 enhancement of the DCNs compared with surrounding areas was found in both the gadobenate and gadodiamide groups from week 4, whereas no T1 enhancement was observed with gadoterate or for the control group (score <0.5). The T1 enhancement effect was higher in the gadodiamide group than in the gadobenate group (Fig. 3B).

### Quantitative Evaluation of T1 Enhancement in the DCNs

Quantitatively, significant T1 enhancement was confirmed in the gadodiamide group, from the third week of injections ( $P < 0.05$ ) until the end of the injection-free period ( $P < 0.01$  vs the control group), compared with the saline and gadoterate groups. The T1 enhancement in the gadobenate group seemed to be intermediate (on completion of the injection-free period,  $P = 0.074$  compared with saline) (Fig. 4).

### R1 Mapping

A trend toward an increase in R1 relaxation rate was observed after injections for gadobenate ( $P = 0.107$  vs the control group), and a significant increase in R1 relaxation rate was observed for gadodiamide ( $P < 0.0001$ ) compared with the control and gadoterate groups, whereas the R1 relaxation rate in DCNs in the gadoterate group remained similar to that of the saline group, regardless of the time point. R1 enhancement was maintained after the injection-free period in the gadodiamide group ( $P < 0.01$  vs saline,  $P < 0.001$  vs gadoterate) (Fig. 5).

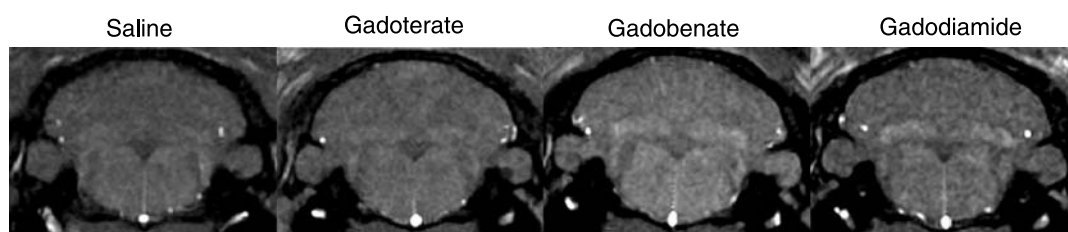


**FIGURE 4.** Quantitative follow-up of T1 enhancement in the DCNs on weekly T1-weighted sequences. T1 enhancement is described by the DCN-to-brain stem ratio of T1 signal intensity. First MRI after the injection period is MRI 6. Gadodiamide versus saline and gadodiamide versus gadoterate:  $P < 0.05$  from the fourth MRI examination. All values are expressed as mean + SD.

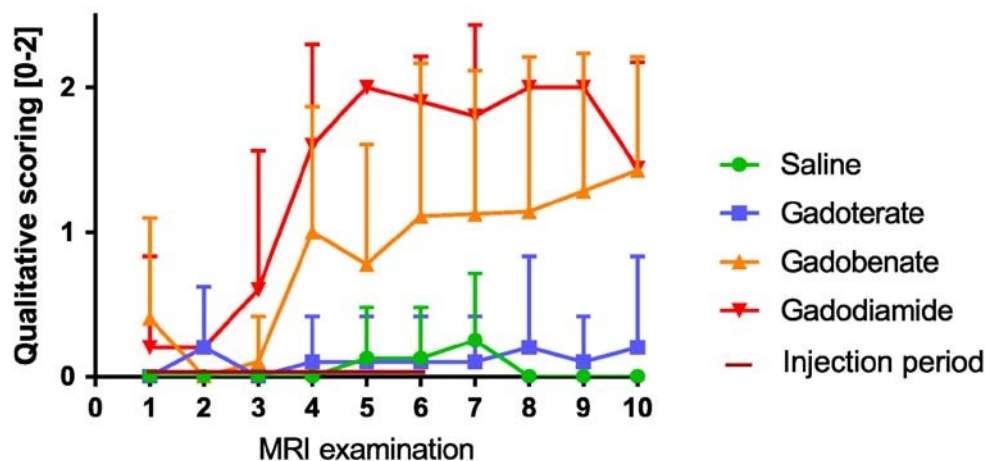
### Total Gd Concentrations Determined by ICP-MS in the Dissected Brain Areas

The highest total Gd concentrations were observed with gadodiamide in the DCNs, olfactory bulbs, striatum, thalamus, and cerebellar parenchyma (Fig. 6).

Some of the dissected brain areas presented a high total Gd concentration ratio for gadodiamide versus gadoterate (>7) and

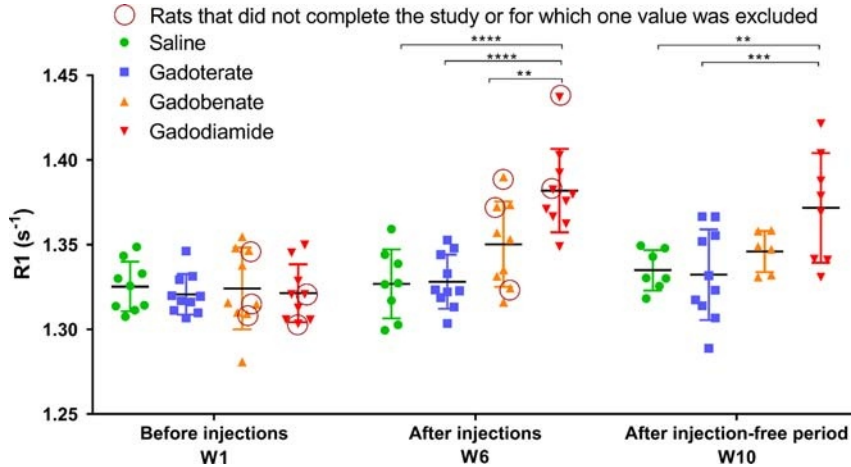


**A**



**B**

**FIGURE 3.** A, Typical T1-weighted MR images (4.7 T) of all treated groups, at study completion (week 10). B, Qualitative scoring of T1 enhancement in DCNs on weekly T1-weighted sequences (blinded). The DCN scores were attributed as follows: 0 = no T1 enhancement, 1 = doubtful T1 enhancement, 2 = definite T1 enhancement. All values are expressed as mean + SD.



**FIGURE 5.** Relaxation rate  $R_1$  ( $s^{-1}$ ) determined in the DCNs from T1 mapping sequences performed at the beginning of the study, after 5 weeks of injections, and at completion of the study (4 weeks after the last injection). Circles: values for rats that did not complete the study. Individual values are given, as well as mean  $\pm$  SD. According to the Dixon exclusion test at a 5% risk, 1 value in gadobenate and gadodiamide groups at week 1 was excluded, as well as 1 value in saline, gadobenate, and gadodiamide groups at week 10.

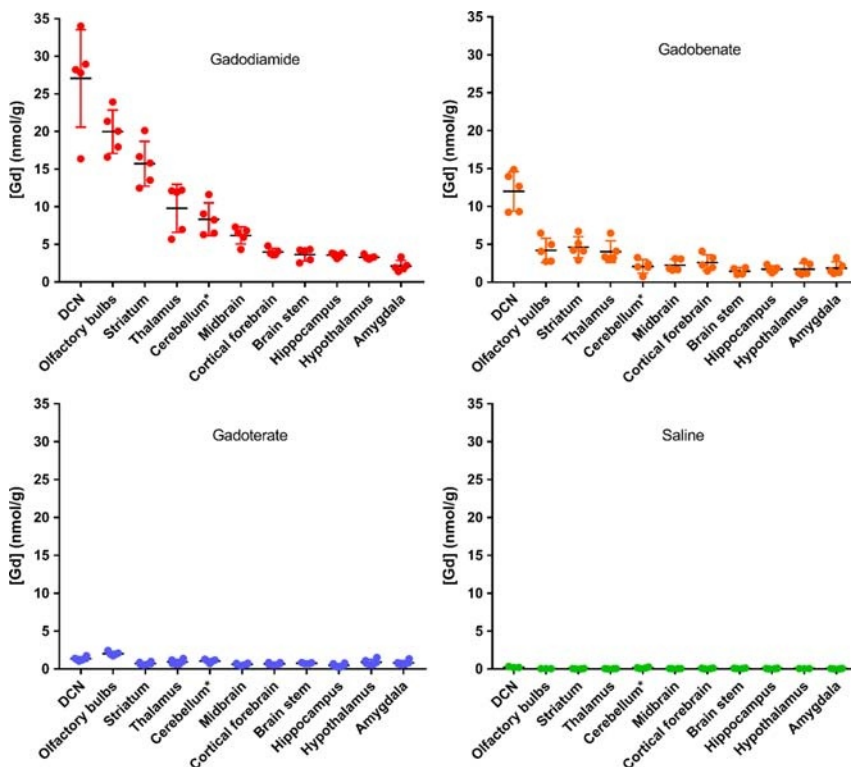
for gadodiamide versus gadobenate ( $>3.5$ ), whereas this ratio was close to 2 for the other structures. Statistical analyses comparing the test groups for the structures more prone to store Gd are shown in Figure 7.

No significant difference in terms of endogenous metal concentrations was observed between the test groups (data not shown). However, a good correlation was observed between tissue total Gd and total Fe concentrations for the gadodiamide and gadobenate groups: higher Fe concentrations in brain structures were correlated with higher total Gd concentrations (Fig. 8, A and B). No correlation was observed

between Fe and total Gd concentrations in the gadoterate group (Fig. 8C). Furthermore, total Gd concentration did not correlate with tissue copper or Zn concentrations (Cu-Gd correlation:  $r = 0.6$ ,  $r = 0.35$ ,  $r = 0.53$ ; and Zn-Gd correlation:  $r = 0.15$ ,  $r = 0.41$ , and  $r = -0.23$ , for gadodiamide, gadobenate, and gadoterate, respectively).

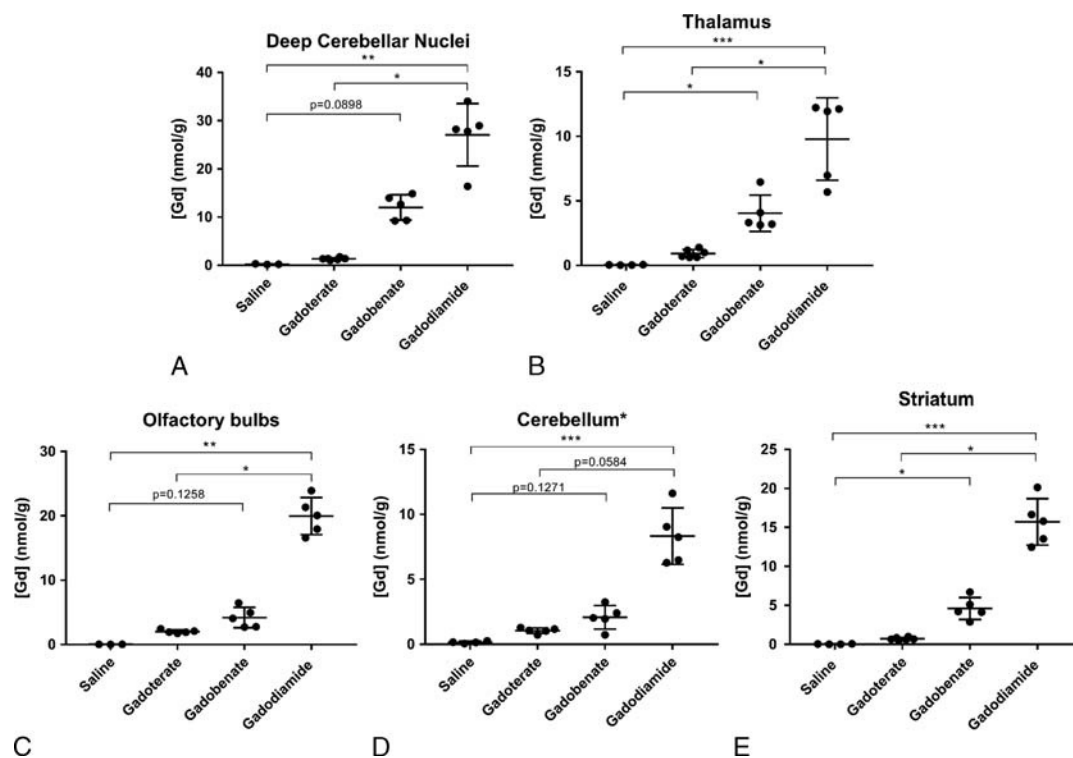
### Plasma Total Gd Concentrations

After the injection period, plasma total Gd concentrations progressively decreased, but still remained above the lower limit of quantification on day 66, that is, 1 month after the last injection. Overall,



**FIGURE 6.** Total Gd concentrations determined by ICP-MS in the various dissected brain areas (cerebellum\*: except for DCNs) 4½ weeks after the last injection ( $20 \times 0.6$  mmol Gd/kg body weight). Individual values are given, as well as mean  $\pm$  SD.





**FIGURE 7.** Total Gd concentration in the main brain structures that accumulate Gd (cerebellum\*: all parenchyma except for the DCNs). Individual values are given, as well as mean  $\pm$  SD. According to the Dixon exclusion test at a 5% risk, 1 saline-treated rat was excluded for DCNs, 1 saline and 1 gadoterate-treated rats for olfactory bulbs, and 1 gadoterate-treated rat for the cerebellum\* ( $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ ).

plasma Gd curves were similar between gadoterate and gadodiamide. However, plasma total Gd concentrations in the gadobenate group were significantly lower ( $P < 0.01$  until day 30 compared with gadodiamide and  $P < 0.05$  until day 37 compared with gadoterate) (Fig. 9).

### Urinary Excretion of Gd and Endogenous Metals

Immediately after injection of GBCAs at days 11 and 25 (Fig. 1), the urinary excretion of Gd was significantly increased ( $P < 0.0001$  for all vs saline) (Fig. 10). However, the Gd excretion was reduced by a factor of 3 to 4 in the case of gadobenate compared with the other GBCA-treated groups ( $P < 0.0001$ ). A nonsignificant increase in endogenous urinary Fe excretion was observed on day 25 in the gadodiamide group compared with the other 3 groups, whereas no difference in endogenous urinary copper excretion was observed between the groups (group effect:  $P = 0.66$ ) (Fig. 10).

At both days 11 and 25, a substantial increase in endogenous urinary Zn excretion was observed after injection of gadobenate (7-fold increase,  $P < 0.01$  vs saline and gadoterate), and an even greater increase was observed after injection of gadodiamide (27-fold increase,  $P < 0.0001$  vs other groups), whereas urinary Zn excretion after gadoterate was increased only 1.3-fold compared with saline (not statistically significant).

## DISCUSSION

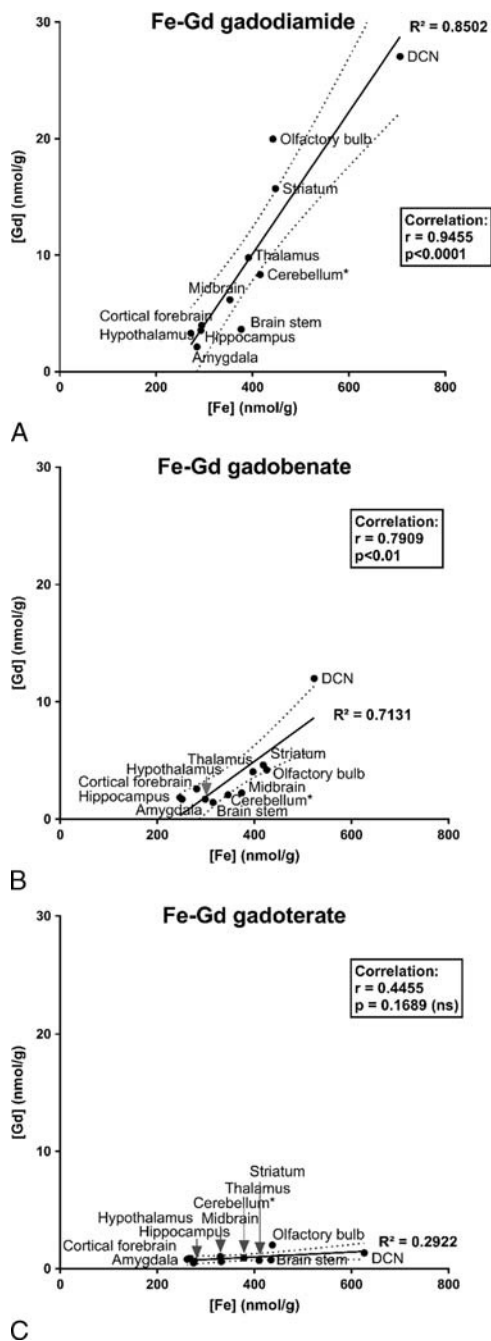
Moderate renal impairment has been shown to represent a translational model of potentiation of brain Gd uptake, which is proportional to baseline renal function.<sup>23</sup> Baseline CrCl measured at the beginning of the study was  $0.21 \pm 0.05$  mL/min per 100 g, comparable to the value reported by Rasschaert et al<sup>23</sup> ( $0.19 \pm 0.06$  mL/min per 100 g), corresponding to stage 3 CKD. The use of a nonclinical model of moderate renal impairment would seem to be clinically relevant, because stage 3

CKD is very common in the elderly population, more prone to undergo MRI examinations.<sup>24,25</sup>

Three rats treated with gadobenate and 1 rat treated with gadodiamide that were killed for ethical reasons or that were found dead presented the lowest CrCl values in their respective groups (CrCl values between 0.09 and 0.15 mL/min per 100 g), suggesting that poor baseline renal function compromises the safety of these L-GBCAs.

### Qualitative and Quantitative Assessment of T1 Enhancement in the DCNs

T1 signal enhancement in the DCNs was monitored weekly by T1-weighted MRI sequences on a 4.7 T nonclinical magnet. T1 signal intensity in the DCNs was quantified with respect to brain stem signal intensity, as classically assessed in both clinical and nonclinical studies, although this area also accumulates Gd (total Gd concentrations of  $1.4 \pm 0.5$  nmol/g for gadobenate,  $3.6 \pm 0.8$  nmol/g for gadodiamide, and  $0.7 \pm 0.09$  nmol/g for gadoterate) and may consequently underestimate T1 signal enhancement in the DCNs. Images were scored qualitatively under blinded conditions. Scoring of T1 signal intensity, starting after 3 weeks of injections (ie, a cumulative dose of 7.2 mmol Gd/kg body weight), revealed doubtful T1 signal enhancement in the DCNs after gadobenate administrations and definite T1 signal enhancement after gadodiamide administrations, whereas no effect was observed in the gadoterate group. Analysis of the DCN-to-brain stem ratio clearly distinguished between the group treated with gadodiamide for 3 weeks and the saline and gadoterate groups, and this ratio continued to slightly increase, even during the injection-free period. Regarding the gadobenate-treated group, intermediate T1 signal enhancement was observed in the DCNs (mean,  $55\% \pm 16\%$  increase of the signal ratio compared with the signal ratio observed with gadodiamide). No



**FIGURE 8.** Correlations between mean brain tissue total Gd and Fe concentrations measured in brain areas for the various GBCAs (cerebellum\*: all cerebellar parenchyma except for the DCNs). A, Tissue Fe versus total Gd concentrations in gadodiamide-treated rats. B, Tissue Fe versus total Gd concentrations in gadobenate-treated rats. C, Tissue Fe versus total Gd concentrations in gadoterate-treated rats.

effects on the T1 signal of the DCNs were demonstrated in the gadoterate group, regardless of the time point.

R1 mapping confirmed T1 signal enhancement in the DCNs with gadobenate and gadodiamide, even after the administration-free period for gadodiamide (ie, at week 10).

Persistence of T1 signal enhancement throughout the study, despite reports that Gd is partially cleared from the tissues,<sup>11,32</sup> suggests a change in the form of Gd stored in brain tissues. The total Gd

concentration would be expected to be lower on day 66 than on day 45, but the T1 signal ratio actually increased or remained relatively stable, suggesting that residual Gd is transformed into a storage form that enhances the T1 effect, or that Gd is cleared more rapidly from the brain stem than from the DCNs. It can be hypothesized that Gd dissociated from L-GBCAs progressively binds to (yet unidentified) macromolecules, as recently shown.<sup>33</sup> Gianolio et al<sup>34</sup> suggested that this form of Gd could be responsible for the majority of the T1 signal enhancement.

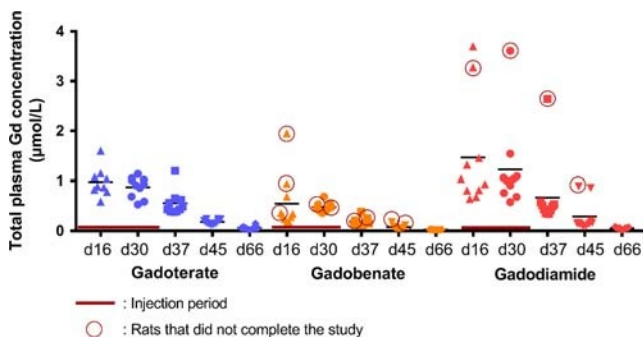
**Total Gd Concentrations in Brain Structures**

The highest Gd concentration in the DCNs was observed with the 2 L-GBCAs:  $27.1 \pm 6.5$  nmol/g for gadodiamide and  $12.0 \pm 2.6$  nmol/g for gadobenate, that is, 20- and 9-fold higher than the total Gd concentration measured in the DCNs with gadoterate, respectively. Furthermore, high Gd accumulation in the olfactory bulbs was observed after administration of L-GBCAs (consistent with the results observed in mice),<sup>11</sup> and interestingly, the olfactory bulbs are also the major area of storage of manganese after exposure reported in both rodents (oral exposure)<sup>35</sup> and humans (respiratory exposure).<sup>36</sup>

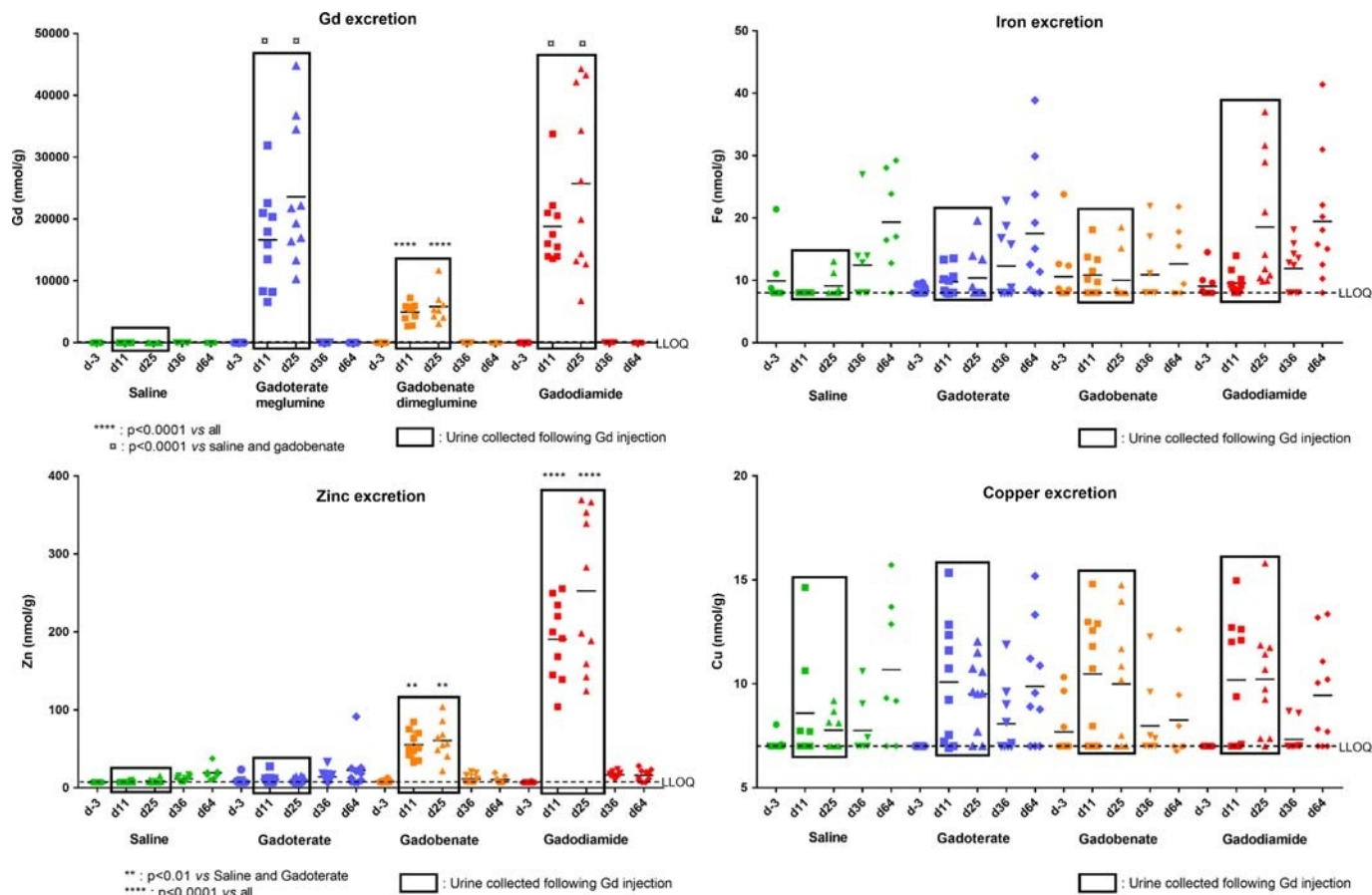
While total Gd concentration ratios for many brain structures (amygdala, cortical forebrain, hippocampus, hypothalamus, brain stem, midbrain) were equal to approximately 2 between gadodiamide and gadobenate and between gadobenate and gadoterate, some structures seemed to store higher proportions of Gd after gadodiamide injections compared with gadobenate injections: olfactory bulb (ratio of 4.8 between gadodiamide and gadobenate), cerebellar cortex (ratio of 4.0), and striatum (ratio of 3.4). As gadodiamide is the GBCA more prone to dissociate in vivo and release free  $Gd^{3+}$ ,<sup>33</sup> we can speculate that these structures are more likely to accumulate Gd in a dissociated form than the other structures.

Total Gd concentrations observed in brain areas in our study were 1.5-2-fold higher than those reported by Kartamihardja et al,<sup>11</sup> but with generally the same order of distribution between brain structures. These authors studied the distribution and washout of gadodiamide and gadoterate in renally impaired mice. These discrepancies in total Gd concentration could be explained by differences in the species studied (rat vs mouse), the renal impairment model (subtotal nephrectomy vs electrocoagulation), the washout time in the present study, and the cumulative dose (100 mmol Gd/kg in mice, which would be equivalent to 50 mmol/kg for rats, after adjustment for body surface area, versus 12 mmol Gd/kg in our study).<sup>28</sup>

Total Gd concentrations observed in the various brain structures after administration of L-GBCAs were correlated with Fe concentration, but not with Zn and Cu concentrations. These results support the possibility of Gd versus Fe transmetalation for L-GBCAs. The thermodynamic constants are much higher for  $Fe^{3+}$  (eg, for Fe-BOPTA:



**FIGURE 9.** Time course of plasma total Gd concentration over the entire study. During the injection period (days 16 and 30), plasma was collected just before the second injection of the week (24 hours after the 9th injection and 24 hours after the 17th injection).



**FIGURE 10.** Urinary excretion of endogenous Zn, Fe, and Cu (measured by ICP-MS) at various time points (day –3: before injection period; day 36: after the injection period; day 64: after injection-free period), and 1 to 5 hours after injection of GBCAs (at day 11 and day 25). Individual values are given, as well as mean.

$\log K_{\text{cond}} = 23.4$ ) than for  $\text{Cu}^{2+}$  or  $\text{Zn}^{2+}$  ( $\log K_{\text{cond}}$  of Cu-BOPTA = 17.3 and  $\log K_{\text{cond}}$  of Zn-BOPTA = 13.9),<sup>1</sup> and Fe concentrations are higher. However, it should be noted that only the labile fraction of the Fe pool (mainly in the  $\text{Fe}^{2+}$  form) is susceptible to transmetalation. No difference in total endogenous metal concentrations in brain structures was observed between the various groups, which can be explained by the fact that ICP-MS is an elemental technique that does not take into account the labile fraction of the metals. Another possible explanation for the Gd-Fe correlation could be that Gd and Fe access brain areas such as the DCNs, olfactory bulb, or striatum via the same pathways.

Interestingly, it has been reported that the brain areas associated with T1 signal enhancement after more than 35 administrations of L-GBCAs to patients were the posterior thalamus, substantia nigra, red nucleus, cerebellar peduncle, colliculi, dentate nucleus, and globus pallidus,<sup>37</sup> that is, the brain structures associated with the highest Fe concentrations.<sup>38</sup>

### Plasma Gd Concentration

A classic pharmacokinetic profile was observed for plasma total Gd concentrations during the study. However, plasma Gd was still detected 1 month after the last injection. Plasma total Gd concentrations were lower following administration of gadobenate at all time points compared with the other GBCA groups, which could be attributed to specific biliary excretion of this GBCA related to its aromatic moiety, especially in the context of renal impairment and in the rat species.<sup>39–41</sup> This excretion pattern has been previously described in renally impaired rats.<sup>42</sup> In the case of gadobenate, the rat model may underestimate the

Gd concentrations, because of a different pharmacokinetics profile and excretion pathway in this species compared with the human species. Indeed, only 3% to 5% of gadobenate is taken up by the hepatocytes in humans, while this phenomenon accounts for approximately 50% of the molecule in the rat with normal renal function.<sup>39</sup>

### Urinary Excretion of Gd and Endogenous Metals

Urinary excretion of Gd and endogenous metals (Fe, Zn, Cu) was determined immediately after GBCA injection, at days 11 and 25 and on days 36 and 64, in a context of tissue Gd retention. As found in the plasma Gd concentrations, Gd urinary excretion was reduced in gadobenate in comparison with gadoterate and gadodiamide, because of the specific hepatic excretion of this molecule. The Gd urinary excretion is reduced by a factor of 3 to 4. In this model, the hepatic excretion would then represent approximately 70% of gadobenate excretion. Regarding endogenous metals, a substantial increase in urinary Zn concentrations was observed immediately after injections of gadodiamide and gadobenate. Urinary Zn excretion occurring immediately after GBCA injection has been described in patients receiving a single administration of the L-GBCA gadodiamide and, to a lesser extent, gadopentetate, but not with gadoterate.<sup>43</sup> In the case of gadodiamide, the excess free ligand caldiameter (5% wt/vol) can chelate endogenous metals, and by extrapolating from data in humans, a significant proportion of plasma total and labile Zn could be available for chelation compared with plasma Fe or copper.<sup>43–46</sup>

The affinity constant ( $\log K_{\text{therm}}$ ) for Zn-DTPA-BMA is 12.04 versus 7.17 for Ca-DTPA-BMA.<sup>37</sup> However, although the pharmaceutical



solution of gadobenate does not contain any added free ligand in the pharmaceutical solution,<sup>47</sup> it induced a significant increase in urinary excretion of endogenous Zn. Therefore, the most plausible explanation for this phenomenon is a transmetalation phenomenon occurring between  $Gd^{3+}$  and  $Zn^{2+}$ , possibly facilitated by the presence of elements capable of binding  $Gd^{3+}$ , such as proteins and  $PO_4^{3-}$ , displacing the equilibrium.<sup>48–51</sup> Gadolinium versus Zn transmetalation may therefore also be responsible for part of the Zn excretion observed with gadodiamide.

Overall, clinical and nonclinical studies published over recent years have clearly demonstrated that less thermodynamically and kinetically stable GBCAs are associated with higher Gd accumulation in brain and body tissues, with a tropism for certain structures, such as the DCNs. Although all GBCAs enter cerebrospinal fluid and brain tissue via the choroid plexus, M-GBCAs remain chelated and return to the circulation to be subsequently eliminated in urine, whereas less stable L-GBCAs rapidly dissociate in the tissues, and Gd is therefore trapped in the brain. Gianolio et al<sup>34</sup> recently showed that, after 22 injections of 0.6 mmol/kg of gadodiamide in the rat, the tissues studied only 3 days after the last injection mostly contained dissociated Gd (<20% of chelated Gd in the cerebellum and 4% in the cerebrum). In contrast, only very low levels of the M-GBCA, gadoteridol, were observed and entirely in its original chelated form. Frenzel et al<sup>53</sup> reported fairly similar results, with a decreasing proportion of chelated Gd over time (3-day injection-free period vs 24-day injection-free period).

According to one hypothesis of dechelation, chelated Gd could form a ternary complex with  $PO_4^{3-}$ , which would then allow dechelation of an intermediate state  $Gd^{3+}(PO_4^{3-})$  from the ligand.<sup>51–53</sup> Once dechelated, Gd either remains in this precipitated form or is immediately bound to macromolecules (thereby leading to T1 hyperintensity), either peptides or proteins.<sup>33,54</sup> The coexistence or predominance of these various forms would putatively lead to different levels and forms of toxicity.

In conclusion, in a sensitive translational model of a common at-risk population, only traces of Gd were observed in the brain following injections of gadoterate, in contrast to the linear Gd chelates gadobenate and gadodiamide. Gadolinium brain uptake from L-GBCAs is associated with T1 hyperintensity in the DCNs, which could be due to binding of dissociated and soluble Gd derived from L-GBCAs to macromolecules. Furthermore, the global distribution of Gd after administration of L-GBCAs (but not the macrocyclic gadoterate) in brain areas was correlated with the local tissue distribution of Fe, which supports the possibility of Gd versus Fe transmetalation or is a hint for the same pathway to access the brain. The precise localization of Gd tissue storage and identification of the Gd-binding macromolecules have yet to be documented, as well as long-term putative neurotoxic effects associated with repeated administration of L-GBCAs.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Evangeline M'Boumba, MS, for the Gd determination in tissues, and Anthony Saul, PhD, and Hélène Poenaru, for reviewing the English language. The authors also thank Jean-Luc Guerquin-Kern, PhD; Sergio Marco, PhD; and Jean-Pierre Laissy, MD, PhD, for helpful discussions.

#### REFERENCES

- Port M, Idée JM, Medina C, et al. Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: a critical review. *Biometals*. 2008;21:469–490.
- Robert P, Violas X, Grand S, et al. Linear gadolinium-based contrast agents are associated with brain gadolinium retention in healthy rats. *Invest Radiol*. 2016;51:73–82.
- Jost G, Lenhard DC, Sieber MA, et al. Signal increase on unenhanced T1-weighted images in the rat brain after repeated, extended doses of gadolinium-based contrast agents: comparison of linear and macrocyclic agents. *Invest Radiol*. 2016;51:83–89.
- White GW, Gibby WA, Tweedle MF. Comparison of Gd(DTPA-BMA) (Omniscan) versus Gd(HP-DO3A) (ProHance) relative to gadolinium retention in human bone tissue by inductively coupled plasma mass spectroscopy. *Invest Radiol*. 2006;41:272–278.
- Errante Y, Cirimele V, Mallio CA, et al. 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*. 2014;49:685–690.
- Weberling LD, Kieslich PJ, Kickingereder P, et al. Increased signal intensity in the dentate nucleus on unenhanced T1-weighted images after gadobenate dimeglumine administration. *Invest Radiol*. 2015;50:743–748.
- McDonald RJ, McDonald JS, Kallmes DF, et al. Intracranial gadolinium deposition after contrast-enhanced MR imaging. *Radiology*. 2015;275:772–782.
- Radbruch A, Weberling LD, Kieslich PJ, et al. Gadolinium retention in the dentate nucleus and globus pallidus is dependent on the class of contrast agent. *Radiology*. 2015;275:783–791.
- Kanda T, Ishii K, Kawaguchi H, et al. 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*. 2014;270:834–841.
- Radbruch A, Weberling LD, Kieslich PJ, et al. Intraindividual analysis of signal intensity changes in the dentate nucleus after consecutive serial applications of linear and macrocyclic gadolinium-based contrast agents. *Invest Radiol*. 2016;51:683–690.
- Kartamihardja AA, Nakajima T, Kameo S, et al. Distribution and clearance of retained gadolinium in the brain: differences between linear and macrocyclic gadolinium based contrast agents in a mouse model. *Br J Radiol*. 2016;89:20160509.
- Lohrke J, Frisk AL, Frenzel T, et al. 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*. 2017;52:324–333.
- Scala M, Koob M, de Buttet S, et al. A Pharmacokinetics, efficacy, and safety study of gadoterate meglumine in pediatric subjects aged younger than 2 years. *Invest Radiol*. 2018;53:70–79.
- Roberts DR, Chatterjee AR, Yazdani M, et al. Pediatric patients demonstrate progressive T1-weighted hyperintensity in the dentate nucleus following multiple doses of gadolinium-based contrast agent. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016;37:2340–2347.
- Renz DM, Kümpel S, Böttcher J, et al. Comparison of unenhanced T1-weighted signal intensities within the dentate nucleus and the globus pallidus after serial applications of gadopentetate dimeglumine versus gadobutrol in a pediatric population. *Invest Radiol*. 2018;53:119–127.
- Prola-Netto J, Woods M, Roberts VHJ, et al. Gadolinium chelate safety in pregnancy: barely detectable gadolinium levels in the juvenile nonhuman primate after in utero exposure. *Radiology*. 2018;286:122–128.
- Erdene K, Nakajima T, Kameo S, et al. Organ retention of gadolinium in mother and pup mice: effect of pregnancy and type of gadolinium-based contrast agents. *Jpn J Radiol*. 2017;35:568–573.
- Khairinisa MA, Takatsuru Y, Amano I, et al. The effect of perinatal gadolinium-based contrast agents on adult mice behavior. *Invest Radiol*. 2018;53:110–118.
- Barbieri S, Schroeder C, Froehlich JM, et al. High signal intensity in dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted MR images in three patients with impaired renal function and vascular calcification. *Contrast Media Mol Imaging*. 2016;11:245–250.
- Cao Y, Zhang Y, Shih G, et al. Effect of renal function on gadolinium-related signal increases on unenhanced T1-weighted brain magnetic resonance imaging. *Invest Radiol*. 2016;51:677–682.
- Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci*. 2002;3:574–579.
- Shah A, Garzon-Muvdi T, Mahajan R, et al. Animal models of neurological disease. *Adv Exp Med Biol*. 2010;671:23–40.
- Rasschaert M, Idée JM, Robert P, et al. Moderate renal failure accentuates T1 signal enhancement in the deep cerebellar nuclei of gadodiamide-treated rats. *Invest Radiol*. 2017;52:255–264.
- Stevens LA, Viswanathan G, Weiner DE. Chronic kidney disease and end-stage renal disease in the elderly population: current prevalence, future projections, and clinical significance. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2010;17:293–301.
- Duru OK, Vargas RB, Kermah D, et al. High prevalence of stage 3 chronic kidney disease in older adults despite normal serum creatinine. *J Gen Intern Med*. 2009;24:86–92.
- European Medicine Agency. Assessment report for gadolinium-containing contrast agents. Procedure No. EMEA/H/A-31/1097. July 1, 2010. Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Referrals\\_document/gadolinium\\_31/WC500099538.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/gadolinium_31/WC500099538.pdf). Accessed 14 July, 2017.

27. Food and Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: new warnings for using gadolinium based contrast agents in patients with kidney dysfunction. October 9, 2010. Available at: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm223966.htm>. Accessed 14 July, 2017.
28. Food and Drug Administration. US Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry. Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. July 6, 2005. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM078932.pdf>. Accessed June 15, 2017.
29. Tissue prep and protein assay 2012. Available at: <https://fr.scribd.com/document/317128344/Tissue-Prep-and-Protein-Assay-2012>. Accessed 5 December, 2017.
30. Spijker S. Dissection of rodent brain regions. In: Li KW, ed. *Neuroproteomics (Neuromethods, Volume 57)*. New York, NY: Humana Press; 2011:13–26.
31. Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*. 1965;52:591–611.
32. Smith AP, Marino M, Roberts J, et al. Clearance of gadolinium from the brain with no pathologic effect after repeated administration of gadodiamide in healthy rats: an analytical and histologic study. *Radiology*. 2017;282:743–751.
33. Frenzel T, Apte C, Jost G, et al. 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*. 2017;52:396–404.
34. Gianolio E, Bardini P, Arena F, et al. Gadolinium retention in the rat brain: assessment of the amounts of insoluble gadolinium-containing species and intact gadolinium complexes after repeated administration of gadolinium-based contrast agents. *Radiology*. 2017;285:839–849.
35. O'Neal SL, Hong L, Fu X, et al. Manganese accumulation in bone following chronic exposure in rats: steady-state concentration and half-life in bone. *Toxicol Lett*. 2014;229:93–100.
36. Sen S, Flynn MR, Du G, et al. Manganese accumulation in the olfactory bulbs and other brain regions of “asymptomatic” welders. *Toxicol Sci*. 2011;121:160–167.
37. Zhang Y, Cao Y, Shih GL, et al. Extent of signal hyperintensity on unenhanced T1-weighted brain MR images after more than 35 administrations of linear gadolinium-based contrast agents. *Radiology*. 2017;282:516–525.
38. Hallgren B, Sourander P. The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J Neurochem*. 1958;3:41–51.
39. Lorusso V, Arbughi T, Tirone P, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution in animals of gadobenatate ion, the magnetic resonance imaging contrast enhancing component of gadobenatate dimeglumine 0.5 M solution for injection (MultiHance). *J Comput Assist Tomogr*. 1999;23 suppl 1:S181–S194.
40. Kirchin MA, Lorusso V, Pirovano G. Compensatory biliary and urinary excretion of gadobenatate ion after administration of gadobenatate dimeglumine (MultiHance (®)) in cases of impaired hepatic or renal function: a mechanism that may aid in the prevention of nephrogenic systemic fibrosis? *Br J Radiol*. 2015;88:20140526.
41. Ersoy H, Rybicki FJ. Biochemical safety profiles of gadolinium-based extracellular contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis. *J Magn Reson Imaging*. 2007;26:1190–1197.
42. Fretellier N, Idée J, Bruneval P, et al. Hyperphosphataemia sensitizes renally impaired rats to the profibrotic effects of gadodiamide. *Br J Pharmacol*. 2012;165:1151–1162.
43. Kimura J, Ishiguchi T, Matsuda J, et al. Human comparative study of zinc and copper excretion via urine after administration of magnetic resonance imaging contrast agents. *Radiat Med*. 2005;23:322–326.
44. Zalewski P, Truong-Tran A, Lincoln S, et al. Use of a zinc fluorophore to measure labile pools of zinc in body fluids and cell-conditioned media. *Biotechniques*. 2006;40:509–520.
45. Mills E, Dong XP, Wang F, et al. Mechanisms of brain iron transport: insight into neurodegeneration and CNS disorders [review]. *Future Med Chem*. 2010; 2:51–64.
46. Cabantchik ZI. Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology [review]. *Front Pharmacol*. 2014;5:45.
47. Idée JM, Port M, Robic C, et al. Role of thermodynamic and kinetic parameters in gadolinium chelate stability. *J Magn Reson Imaging*. 2009;30:1249–1258.
48. Tweedle MF, Hagan JJ, Kumar K, et al. Reaction of gadolinium chelates with endogenously available ions. *Magn Reson Imaging*. 1991;9:409–415.
49. Taupitz M, Stolzenburg N, Ebert M, et al. Gadolinium-containing magnetic resonance contrast media: investigation on the possible transchelation of Gd<sup>3+</sup> to the glycosaminoglycan heparin. *Contrast Media Mol Imaging*. 2013;8:108–116.
50. Laurent S, Elst LV, Copoix F, et al. Stability of MRI paramagnetic contrast media: a proton relaxometric protocol for transmetalation assessment. *Invest Radiol*. 2001;36:115–122.
51. Idée JM, Fretellier N, Robic C, et al. The role of gadolinium chelates in the mechanism of nephrogenic systemic fibrosis: a critical update. *Crit Rev Toxicol*. 2014; 44:895–913.
52. Baranyai Z, Pálkás Z, Uggeri F, et al. Dissociation kinetics of open-chain and macrocyclic gadolinium(III)-aminopolycarboxylate complexes related to magnetic resonance imaging: catalytic effect of endogenous ligands. *Chemistry*. 2012;18:16426–16435.
53. Robic C, Catoen S, de Goltstein MC, et al. The role of phosphate on Omniscan(®) dechelation: an in vitro relaxivity study at pH 7. *Biomaterials*. 2011;24:759–768.
54. Knoepp F, Bettmer J, Fronius M. Gadolinium released by the linear gadolinium-based contrast-agent Gd-DTPA decreases the activity of human epithelial Na<sup>+</sup> channels (ENaCs). *Biochim Biophys Acta*. 2017;1859:1040–1048.

## 2. Conclusions

Dans cette étude comparative sur le modèle sensibilisé qu'est le Rat insuffisant rénal, un profil distinct des 3 agents de contraste testés a été observé.

On retrouve un effet lié à la classe moléculaire et reflétant l'ordre de stabilité thermodynamique et cinétique : le gadodiamide, chélate linéaire et non-ionique, est associé à une accumulation tissulaire notable de Gd. Dans le cas du gadotérate, chélate de Gd macrocyclique et ionique, le Gd n'est retrouvé qu'en très faibles concentrations un mois après les 20 administrations. Le gadobénate, chélate de Gd linéaire et ionique, présente un profil intermédiaire, avec une accumulation tissulaire de Gd, mais inférieure à celle du gadodiamide.

La dissection fine des structures cérébrales a permis d'identifier des sites préférentiels d'accumulation du Gd, dans le cas du gadodiamide, correspondant (dans l'ordre décroissant) aux **DCN**, aux **bulbes olfactifs**, au **striatum** (incluant le *globus pallidus*, comme on l'a vu plus haut), au **thalamus**, puis enfin au **parenchyme cérébelleux**. Le gadobénate est associé à une accumulation préférentielle de Gd dans les DCN également, puis, dans une moindre proportion, dans les bulbes olfactifs, le *striatum* et le thalamus, puis enfin dans les autres structures étudiées. Le gadotérate, enfin, s'accumule très faiblement (sous forme de traces) et à des concentrations du même ordre dans toutes les structures étudiées, les bulbes olfactifs détrônant ici les DCN.

Les principales **structures cérébrales d'accumulation du Gd sont également celles les plus riches en métaux**, et une corrélation positive entre concentration en fer endogène et concentration en Gd a été établie, pour les deux groupes traités par le gadodiamide et le gadobénate. Aucune différence de concentration de Fe, Cu et Zn n'a cependant été observée entre les quatre groupes. L'étude de l'excrétion urinaire de ces métaux a, toutefois, mis en évidence une nette **augmentation de l'excrétion du zinc dans les heures suivant l'injection** des deux agents de contraste linéaires, plus importante dans le cas du gadodiamide. Cela témoigne vraisemblablement de la **chélation du zinc par le ligand formulé en excès** dans la solution (le caldiamide) (Kimura, 2005), ainsi que potentiellement d'une **transmétallation** avec le zinc dans le compartiment extracellulaire. En effet, le gadobénate n'est pas formulé avec un excès de ligand libre (Port, 2008). Par conséquent, l'observation d'une augmentation transitoire de la zincurie ne pourrait ici s'expliquer que par l'échange du Zn endogène issu d'un pool échangeable avec le Gd du chélate.

Le suivi en IRM du **signal T1** dans les DCN a montré que celui-ci restait **stable**, voire augmentait, **pendant le mois suivant les injections** (le rapport DCN/tronc cérébral augmente, mais les valeurs de R1 restent stables). L'augmentation du rapport de signal T1 peut donc traduire l'augmentation du signal T1 des DCN, mais aussi une diminution du signal du tronc cérébral, au cours du temps. En comparant les concentrations de Gd total dans les structures communes avec l'étude précédente (délai de dosage un mois plus tôt), on note ici des concentrations plus faibles dans le cortex cérébral, le parenchyme cérébelleux et le tronc cérébral, mais plus élevées dans les DCN. La fonction rénale des animaux insuffisants rénaux était globalement comparable à celle mesurée dans l'étude 1 et ne peut donc expliquer ces différences. Une élimination progressive, ou **« wash-out », du Gd tissulaire cérébral est plausible**. L'augmentation de la concentration de Gd total au niveau des DCN constatée dans la deuxième étude s'explique certainement par un gain de dextérité dans la dissection manuelle, cette petite structure étant entourée de substance blanche. En effet, une telle variabilité inter-étude ou une redistribution du Gd entre les structures cérébrales au cours du temps, paraissent peu probables.

Le suivi de la concentration du Gd plasmatique a mis en évidence que cet élément réside **relativement longtemps** dans le compartiment circulant après la dernière administration d'agent de contraste, jusque



plus d'un mois (dernier délai étudié). Ce Gd peut éventuellement provenir d'un « wash-out » du Gd cérébral, osseux, et/ou de tout autre tissu.

La capture osseuse de Gd a montré **peu de différences entre la diaphyse** du fémur (surtout composée d'os compact) **et l'os pariétal** du crâne (en grande partie trabéculaire), contrairement à ce que l'on attendait (une concentration de Gd total supérieure dans l'os compact, riche en cristaux d'hydroxyapatite de Ca, par rapport à un os riche en moelle rouge). Ces résultats peuvent s'expliquer par un modèle cinétique de distribution des lanthanides (Taylor, 2003), selon lequel ceux-ci s'accumulent initialement de façon équivalente entre surfaces trabéculaire et surfaces corticales. Ils sont ensuite éliminés des surfaces osseuses avec le renouvellement osseux, pour être redistribués à la fois dans le volume osseux et dans la moelle osseuse, avant de retrouver la circulation sanguine.

L'examen histopathologique et la mesure de paramètres sur la composition osseuse par micro-scanner ont, logiquement, révélé des **signes d'ostéodystrophie** (diminution de la densité du réseau trabéculaire et de son épaisseur, de la densité minérale, et augmentation de la porosité) dans tous les groupes, un phénomène classiquement associée à l'insuffisance rénale (Ho, 2002). Cette ostéodystrophie était même cohérente avec les valeurs individuelles de clairance de la créatinine et l'hyperphosphatémie associée des rats étudiés. Des signes plus sévères (diminution du volume osseux et de la densité minérale osseuse) et moins liés à la fonction rénale ont été observés avec le gadodiamide, mais le trop faible effectif étudié ne permet pas de conclure sur la toxicité propre du produit.



## C. Suivi IRM et distribution cérébrale sur le moyen-long terme, après injections de doses élevées de chélates de Gd

Dans le cadre d'études portant sur l'évaluation d'une éventuelle neurotoxicité de l'accumulation cérébrale de Gd (présentées dans la Partie III), des injections de doses de complexes de Gd plus importantes ont été réalisées, ainsi que des dosages de Gd au sein des structures cérébrales et qu'un suivi en IRM. Afin d'avoir connaissance de tous les éléments disponibles pour discuter au mieux de la description de l'accumulation de Gd à la fin de cette partie, ces résultats sont présentés ici.

1. Administration de 36mmolGd/kg cumulées de gadodiamide, et suivi sur 5 mois post-injections

### A. Méthodes

- a) Modèle d'étude

L'étude a été réalisée sur des rats femelles Spague-Dawley (OFA, Charles River). Les rats étaient initialement âgés de 6 semaines et pesaient entre 180 et 200 g.

Les rats ont reçu soit une solution saline NaCl 0,9% (300mOsm/kg d'eau) (3,6 mL/kg), soit du gadodiamide (Omniscan®) à la dose de 1,8 mmolGd/kg, à raison de 4 injections par semaine pendant 5 semaines, par voie intraveineuse dans la veine caudale, sous anesthésie gazeuse. Cela correspond à une dose cumulée administrée de 36 mmolGd/kg. La dose de Gd reçue à chaque injection de gadodiamide correspond à 3 fois la dose clinique.

- b) Suivi d'un potentiel rehaussement du signal T1 par IRM

Les IRM ont dans un premier temps été réalisées en début de semaine, avant les injections de la semaine, et 3 jours (vendredi-samedi-dimanche) après la dernière injection, sur n=6 rats/groupe. Le suivi IRM s'est poursuivi une fois la période des injections passée, une fois par mois. Les images ont été obtenues sur un imageur Biospec® Bruker 4,7 T.

Après anesthésie des animaux à l'isoflurane (4% pour l'induction, 3% dans l'IRM), les rats sont installés dans l'IRM. Les séquences sélectionnées ont été les suivantes :

- Localizer : Image de repérage pour le positionnement des coupes
- Flash pondérée T1 : Temps de répétition/temps d'écho (TR/TE) = 50/1.782 ms; nombre de répétitions (NR) = 48 ; résolution de 164 x 164  $\mu\text{m}^2$  ; épaisseur de coupe de 700  $\mu\text{m}$  ; temps d'acquisition (Tacq) = 6 mn36 s ; ciblé sur le cervelet (11 coupes).
- Cartographie T1 (réalisée sur la coupe contenant les DCN) FAIR-RARE (« *flow-sensitive alternating inversion recovery – rapid acquisition with relaxation enhancement* ») : TR/TEeffectif = 36.9 ms/2079.9 ms ; NR=4; résolution 164 x 164  $\mu\text{m}^2$ , épaisseur de coupe 700  $\mu\text{m}$  ; Tacq = 11 mn 05 s ; avec 8 temps d'inversion (0, 100, 200, 400, 600, 800, 1200, 2000 ms).

Les images obtenues en Flash pondérée T1 ont, par la suite, été « anonymisées », randomisées (randomisation par rat et par temps) pour une cotation qualitative en aveugle du rehaussement des noyaux cérébelleux profonds (DCN), selon une échelle de 0 à 2 :

- 0 : aucune prise de contraste



- 1 : prise de contraste probable
- 2 : prise de contraste notable

Une seule fois, trois mois et demi après la période d'injections, une acquisition IRM a été réalisée à plus haut champ, au laboratoire MIRCen (CEA, Fontenay-aux-Roses) sur une IRM Bruker Biospec® 11,7 T, sur n=10/groupe.

Les séquences réalisées ont été les suivantes :

- Localizer : Image de repérage pour le positionnement des coupes
- Cartographie T2\* : Résolution = 125x125x500  $\mu\text{m}^3$ , 15 coupes de 500  $\mu\text{m}$ , TR/TE = 800 ms / 3 ms, avec 10 temps d'écho (de 3 à 30 ms)
- Cartographie T2 : Résolution = 250x250x500  $\mu\text{m}^3$ , 15 coupes de 500  $\mu\text{m}$ , TR/TE = 3000 ms / 6,5 ms, avec 10 temps d'écho (de 6,5 à 104 ms)

Pour la cotation quantitative sur les images obtenues avec la séquence flash pondérée T1 et les cartographies, des régions d'intérêt (ROI) ont été dessinées pour délimiter les DCN, ainsi qu'une zone de référence (le tronc cérébral) au moyen du logiciel GOA (Guerbet Oriented Analysis) codé au laboratoire sous MATLAB (The Mathworks Inc. Natick, MA, USA). Les rapports d'intensité de signal des zones d'intérêt ont ensuite été calculés pour quantifier une éventuelle prise de contraste des DCN.

#### c) Euthanasies, dissection et dosages

Suite à l'euthanasie par exsanguination au niveau de l'aorte abdominale, le cerveau a ensuite été prélevé et finement disséqué sous binoculaires pour récupérer les structures suivantes, en vue du dosage de Gd :

- Cervelet,
- Bulbes et tubercules olfactifs,
- Striatum,
- Cortex cérébral,
- Hypothalamus,
- Mésencéphale,
- Thalamus,
- Plexus choroïdes,
- Hippocampe,
- Amygdale.

Le cervelet a ensuite été placé dans une matrice à encoches (Brain Slicer®). Des tranches de 0,5 ou 1mm ont été réalisées, puis délicatement disséqué afin de séparer le cortex cérébelleux, les DCN, le tronc cérébral, et les plexus choroïdes.

Les dosages de Gd total, quelle que soit sa forme (chélatée, complexée avec une macromolécule, libre) ont ensuite été effectués sur les diverses structures cérébrales prélevées par ICP-MS (réalisée sur l'appareil 7700x ; Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Pour cela, les échantillons ont été minéralisés par de l'acide nitrique 65%, en bain marie à 80°C pendant 8h. Une courbe standard de Gd inorganique (0,05–100  $\mu\text{g/L}$ ) dans de l'acide nitrique 6,5% a été réalisée, suivant la réponse de l'isotope  $^{158}\text{Gd}$ . La limite inférieure





de quantification de la concentration du Gd total est de 0,2 nmol/g pour les DCN, 0,5 nmol/g pour les plexus choroïdes, et 0,02 nmol/g de tissu dans les autres matrices cérébrales.

## A. Résultats

### a) Relaxations T1, T2 et T2\*

Les résultats de la cotation qualitative, présentés en Figure 36 A, montrent une prise de contraste T1 notable des DCN chez le groupe traité par le gadodiamide versus le groupe témoin. L'apparition de l'hypersignal T1 chez les rats traités par le gadodiamide se fait de façon progressive et une différence significative avec le groupe témoin apparaît dès 3 semaines d'injections (semaine 4) ( $p < 0,0001$ ) (Figure 36 B). La vitesse de relaxation R1 calculée dans le DCN depuis les cartographies présente une valeur initiale de  $1,32 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$  pour les témoins, se maintenant jusqu'à la fin de l'étude ( $1,33 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ ), contre  $1,31 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ , augmentant progressivement jusqu'à  $1,38 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$  pour le gadodiamide (Figure 36 C).

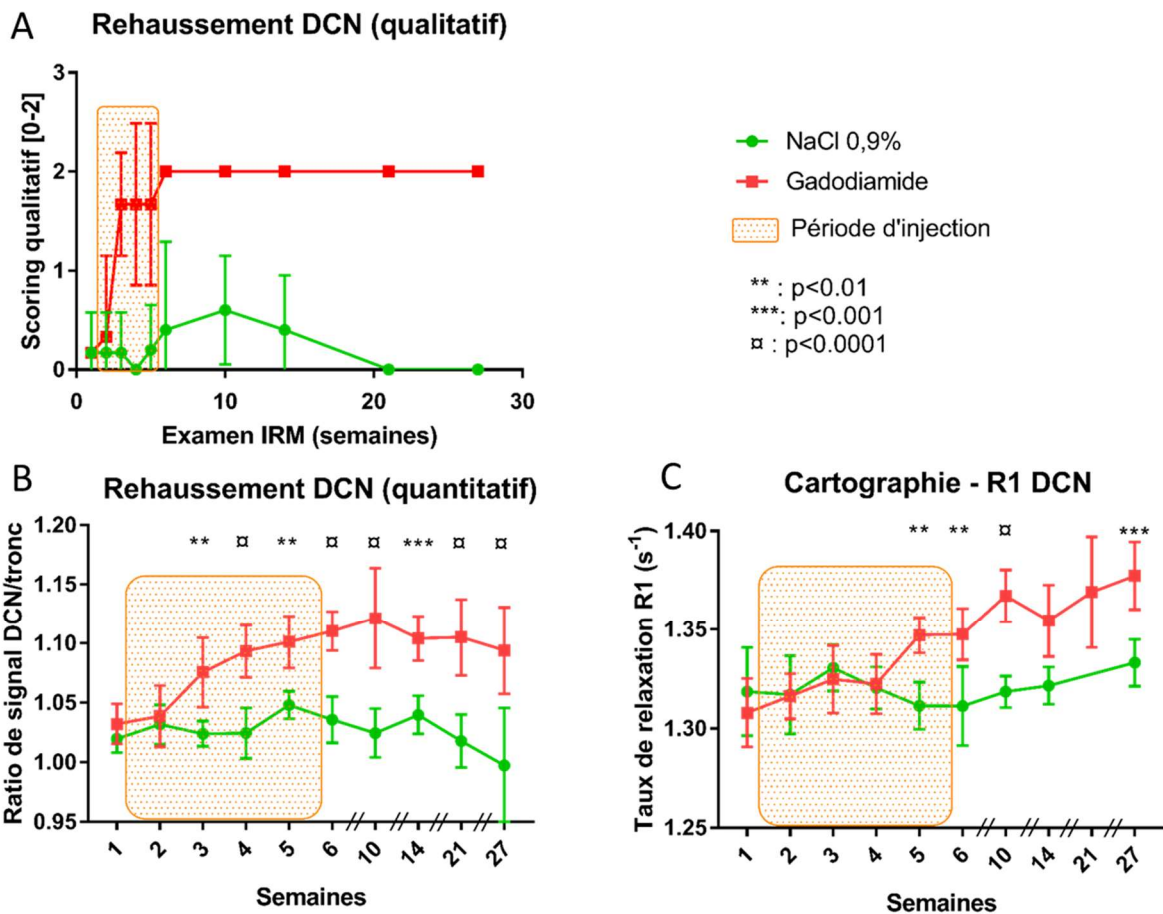


Figure 36 : (A) Cotation qualitative des IRM. La cotation a été faite sur un score de 0 à 2 (0 : aucun rehaussement des DCN, 1 : rehaussement probable, 2 : rehaussement notable) ; (B) Rapport de l'intensité de signal mesuré dans les DCN ramené à celle du tronc cérébral ; (C) R1 calculé dans les DCN d'après la cartographie T1. Les IRM de tous les rats ( $n=6$  rats/groupe) et des différents délais ont été anonymisées et randomisées pour une lecture en aveugle.

Des cartographies T2 et T2\* ont également été réalisées. La pose d'une ROI au niveau du DCN de l'hémisphère droit, du cortex cérébelleux et du tronc cérébral des rats sur les cartes T2 et T2\* a permis le calcul des temps de relaxation moyen pour les deux groupes. Les résultats obtenus sont présentés en Figure





37. Le temps de relaxation T2 moyen dans les DCN est de  $28,9 \pm 0,5$  ms dans le groupe gadodiamide alors qu'il est de  $32,6 \pm 0,8$  ms dans le groupe témoin (Figure 37 A). Les 2 groupes présentent donc des temps de relaxation T2 significativement différents ( $p < 0,0001$ ).

De même, le temps de relaxation T2\* moyen dans les DCN est de  $16,3 \pm 1,1$  ms dans le groupe gadodiamide et de  $20,0 \pm 1,5$  ms dans le groupe témoin (Figure 37 B). Les groupes présentent également des T2\* significativement différents ( $p = 0,0001$ ). Ce raccourcissement significatif des temps de relaxation T2 et T2\* dans les DCN des rats traités par le gadodiamide est retrouvé, de façon moins nette mais toujours significative, dans le cortex cérébelleux (Figure 37 C et D). Dans le tronc cérébral cependant, les valeurs de T2 et T2\* sont similaires pour les deux groupes (Figure 37 E et F).

Ces différences entre les temps de relaxation T2 et T2\* sont également visibles de façon individuelle (en particulier sur la carte T2), comme l'illustre la Figure 38.

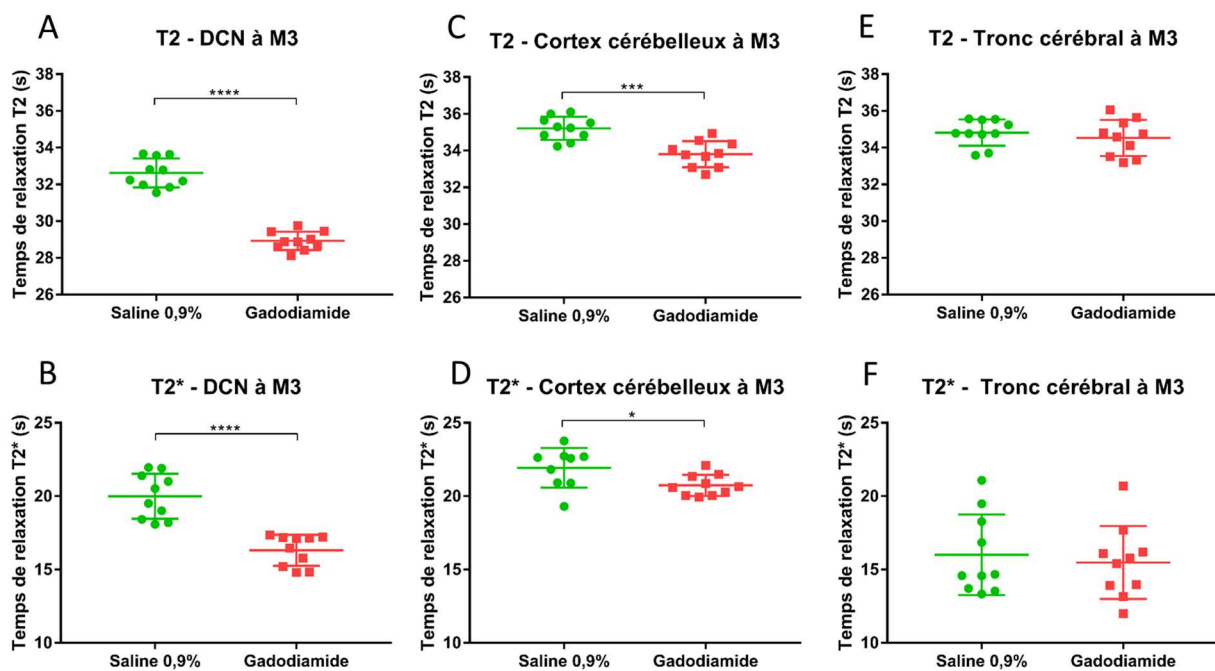


Figure 37 : Temps de relaxation individuels (T2 et T2\*) mesurés dans le DCN droit, le cortex cérébelleux et le tronc cérébral pour les deux groupes à haut champ (11,7 T) et au délai M3 chez des rats traités par le gadodiamide ou du sérum physiologique (n=10 rats/groupe).



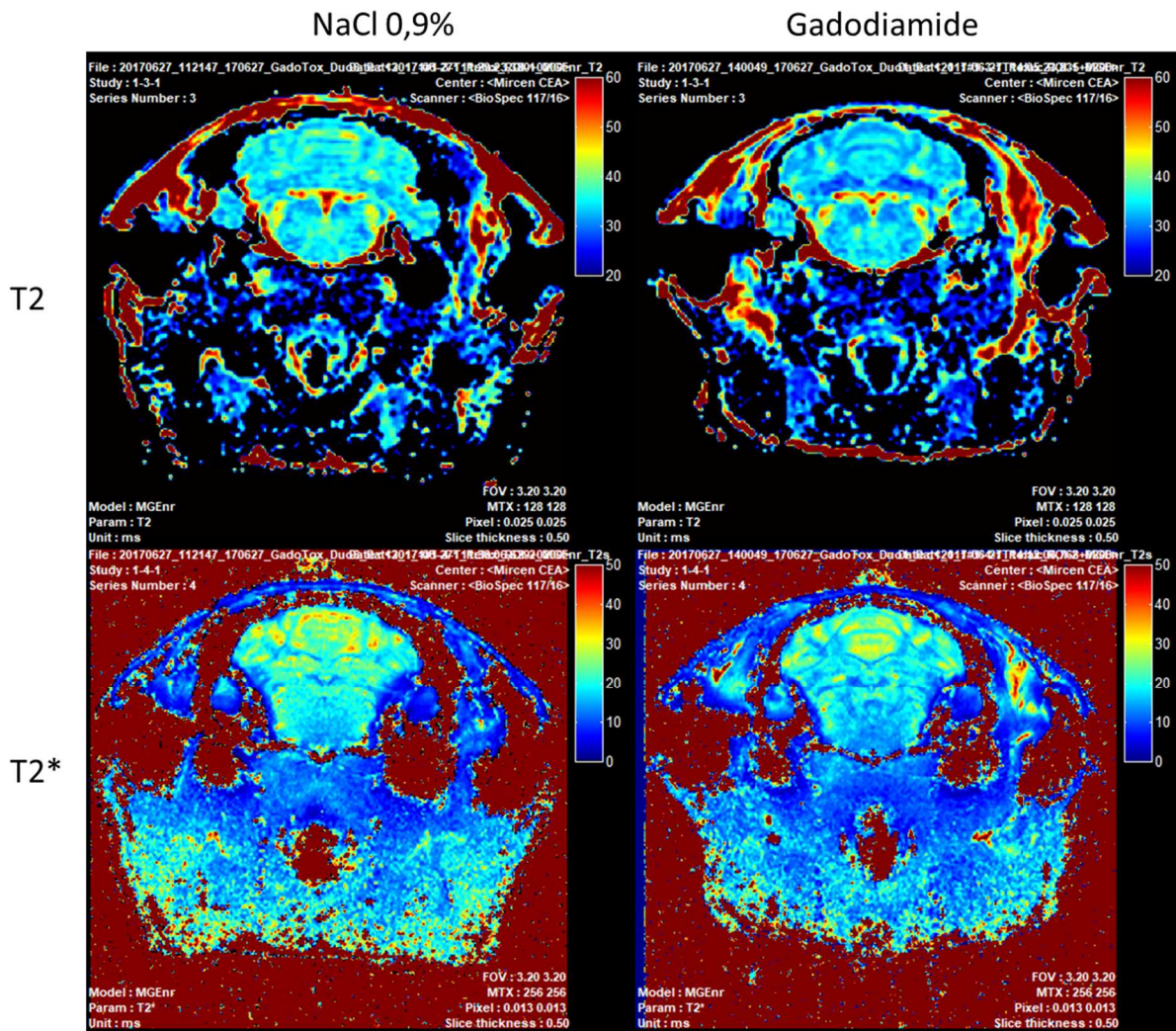


Figure 38 : Exemple de cartes T2 et T2\* obtenues pour un rat de chaque groupe (à un champ magnétique de 11,7 T). Le groupe gadodiamide présente une diminution des temps de relaxation T2 et T2\* des DCN qui se traduit par un hyposignal.

#### b) Concentrations de Gd total dans les structures cérébrales

Le dosage de la concentration de Gd total a été réalisé sur les structures cérébrales disséquées à l'issue de la microdialyse, en semaine 20 (juste avant M4, 4 mois post-injections). La grande majorité des concentrations de Gd total dosées pour le groupe témoins sont inférieures à la limite de quantification (0,02 nmol/g), montrant une contamination négligeable lors de l'expérimentation et la dissection (Figure 39). Pour le groupe gadodiamide, c'est dans les bulbes olfactifs que l'on trouve la plus haute concentration ( $26,1 \pm 4,0$  nmol/g dans les bulbes olfactifs,  $21,2 \pm 4,3$  nmol/g dans les DCN). Le *striatum*, comprenant le *globus pallidus*, trop petit chez le Rat pour pouvoir être disséqué, est en 3ème position ( $17,9 \pm 3,9$  nmol/g). On note, juste après le *striatum*, les plexus choroïdes, avec une variabilité relativement importante, mais des concentrations notables ( $13,2 \pm 6,4$  nmol/g). Le tronc cérébral est la région étudiée pour laquelle la concentration de Gd total était la plus faible pour le groupe gadodiamide ( $3,5 \pm 1,7$  nmol/g).

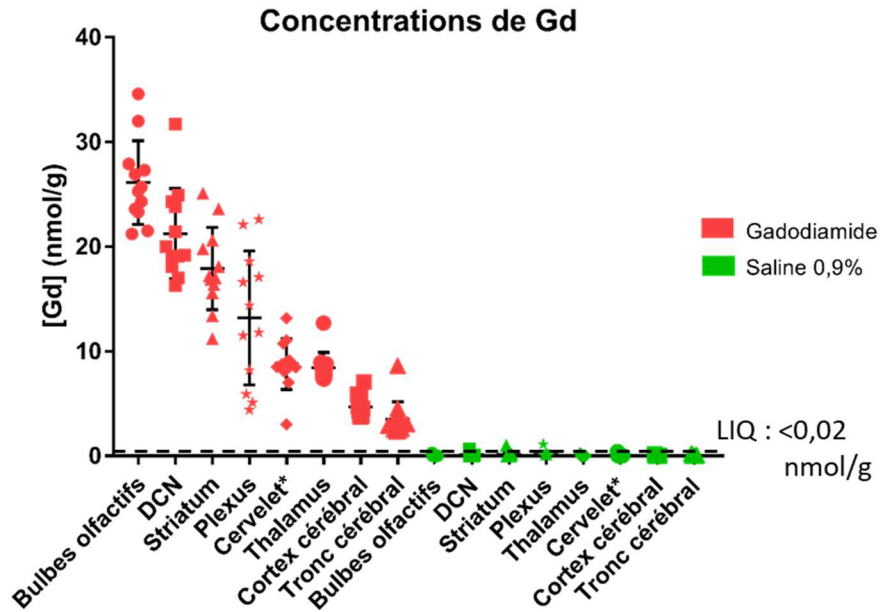


Figure 39 : Détermination du Gd total par ICP-MS, dans les différentes structures disséquées. Cervelet\* indique la totalité du parenchyme cérébelleux sauf les DCN.

## B. Conclusions

L'analyse des images d'IRM a révélé une augmentation croissante et franche du R1 (donc un T1 raccourci) dans les noyaux cérébelleux profonds. Après la période d'injection, le rapport du signal T1 DCN/tronc cérébral a semblé légèrement diminuer après un mois, mais la valeur de la vitesse de relaxation R1 a semblé se maintenir, voire augmenter. Les temps de relaxation T2 et T2\* ont également été raccourcis de façon significative dans les DCN, 3 mois après les injections.

Les concentrations de Gd total sont très hétérogènes d'une structure cérébrale à l'autre, avec toujours globalement le même ordre d'accumulation (cf. Publication 2). Cependant, les bulbes olfactifs se sont ici révélés plus riches en Gd que les DCN, contrairement à ce que nous avons noté (pour une dose de gadodiamide plus faible et chez le Rat insuffisant rénal) dans l'étude 2 (cf. Publication 2).

## 2. Administration de 50 mmolGd/kg cumulées de gadodiamide ou de gadotérate, et suivi sur 4 mois post-injections

### A. Méthodes

Le protocole utilisé est globalement similaire au précédent. Les injections de produits se sont déroulées pendant 5 semaines, mais la dose de produit injectée ici était de 2,5 mmolGd/kg, soit 50 mmolGd/kg cumulés. Le suivi par IRM permettant d'observer la prise de contraste au niveau cérébral a été réalisé au moyen de la séquence FLASH uniquement, et de façon plus espacée dans le temps.

### B. Résultats

#### a) Suivi du signal T1 en IRM

Les IRM pondérées T1 réalisées au cours de l'étude ont montré, à l'analyse qualitative, un rehaussement franc du signal T1 au niveau des DCN, consécutif aux injections de gadodiamide, et, très légèrement, après injections de gadotérate (délai « M0 », juste à la fin de la période d'injections), persistant au cours des mois suivants (délais M1 et M3, soit respectivement 1 et 3 mois post-injections) (Figure 40 A). Quantitativement, le rapport du signal T1 des DCN sur celui du tronc semble diminuer légèrement pour le groupe gadodiamide, et celui du groupe gadotérate est au niveau de celui des témoins (Figure 40 B). Un rehaussement du 4<sup>e</sup> ventricule (présusés plexus choroïdes) a également été observé et coté qualitativement. Alors qu'il apparaît clairement pour les deux groupes injectés par les chélates de Gd à M0, cet hypersignal disparaît les mois suivants (Figure 40 C).

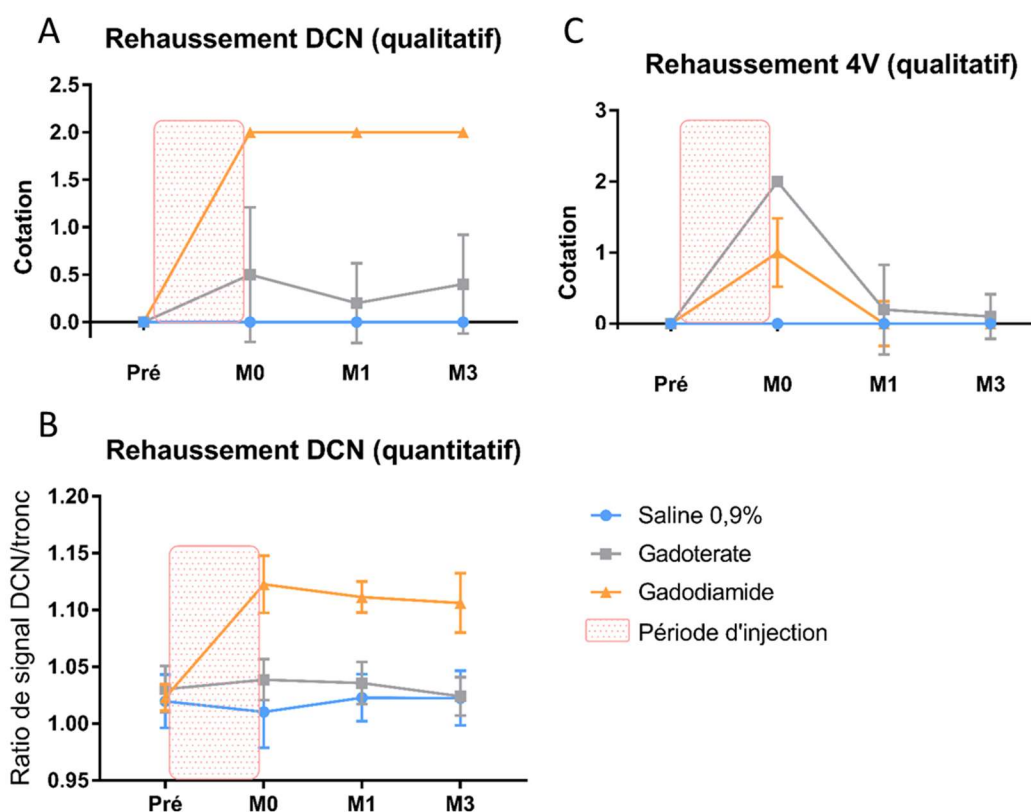


Figure 40 : Cotation qualitative et quantitative (rapport de signal DCN/tronc cérébral) du rehaussement T1 au niveau des DCN et du 4<sup>e</sup> ventricule (4V). Pré : IRM précédant la période d'injection ; M0 : IRM suivant la période d'injection ; M1 et M3 : respectivement 1 mois et 3 mois après la fin de la période d'administrations.



(b) Concentrations tissulaires de Gd total

Les concentrations de Gd total dans les structures cérébrales, 4 mois après la période d'injections, sont présentées ci-dessous (Figure 41). La spéciation du Gd doit être déterminée sur le cortex cérébelleux, les DCN et le tronc cérébral, et les résultats ne sont pas encore disponibles. Les valeurs du groupe témoin sont généralement inférieures à la limite inférieure de quantification, montrant l'absence de contamination croisée. Le groupe gadotérate présente des concentrations de Gd total quantifiables, mais ne dépassant pas les 0,5 nmol/g en moyenne, sauf pour les plexus choroïdes ( $3,9 \pm 1,6$  nmol/g) et les bulbes olfactifs ( $1,2 \pm 0,2$  nmol/g). Les concentrations de Gd total du groupe gadodiamide sont nettement supérieures à celle mesurées pour le groupe gadotérate, quelle que soit la structure étudiée. L'euthanasie a été réalisée quasiment au même délai que l'étude précédente, soit 4 mois après la dernière injection, permettant ainsi la comparaison des concentrations trouvées pour le gadodiamide pour les structures communes aux deux études.

L'ordre global des structures en termes de concentration en Gd est identique à celui de l'étude précédente. La structure d'accumulation principale du Gd est les bulbes olfactifs, avec 32,9 nmol/g en moyenne, mais cette valeur est assortie d'une très forte variabilité causée par une valeur aberrante isolée. Sans celle-ci, cette moyenne tombe à  $24,6 \pm 4,0$  nmol/g, soit similaire à celle de l'étude précédente ( $26,1 \pm 4,0$  nmol/g), bien qu'une dose plus élevée ait été injectée. Les plexus choroïdes et le thalamus présentent des concentrations en Gd total légèrement plus faibles que dans l'étude précédente, là aussi, et le cortex cérébral présente des concentrations très semblables. Le striatum, quant à lui, accumule plus de Gd que dans l'étude précédente ( $22,3 \pm 2,0$  nmol/g contre  $17,9 \pm 3,9$  nmol/g). Ces résultats suggèrent que, pour certains tissus, l'accumulation de Gd est saturable.

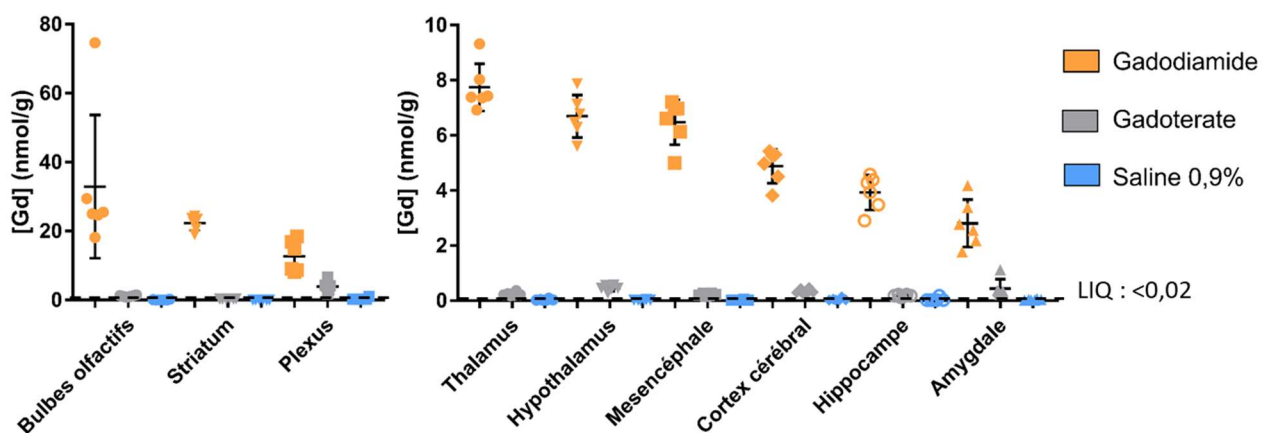


Figure 41: Concentrations de Gd total déterminées (ICP-MS) dans différentes matrices d'intérêt, 4 mois après la fin des injections.

### C. Conclusions

Le suivi du signal des DCN en IRM a révélé un comportement similaire du temps de relaxation T1 suite aux injections de gadodiamide: un net rehaussement T1 témoignant d'un raccourcissement, qui s'estompe légèrement au cours des mois. Cela n'a pas été noté pour le gadotérate. Un rehaussement T1 des plexus choroïdes du 4<sup>e</sup> ventricule a été noté dans les jours suivant les injections, pour les deux chélates de Gd, ce qui traduit probablement le passage des chélates de Gd dans le LCR, comme cela a été suggéré ailleurs (Jost, 2017 ; Nehra, 2018).





Il apparait que les concentrations de Gd total ne sont pas toujours plus élevées que celles de la précédente étude, alors que les euthanasies ont été réalisées presque aux mêmes délais et que la dose injectée était ici bien plus élevée. Ceci suggère un phénomène d'accumulation saturable. L'ordre des structures selon leur accumulation en Gd est cependant resté inchangé.





## Chapitre 4 : Notions et rappels sur les barrières cérébrales

Les chélates de gadolinium sont réputés ne pas passer la barrière hémato-encéphalique, dans le cas où elle est fonctionnelle (Hesselink, 1988). La récente découverte d'hypersignaux T1 cérébraux, en l'absence de lésions de cette barrière, lors d'examens non injectés, a remis en doute ce dogme. De plus, si les chélates de Gd ne traversent effectivement pas cette barrière, du moins sous sa forme chélatée, il peut accéder aux tissus *via* le liquide céphalorachidien et les plexus choroïdes, ou encore passer au niveau des organes circumventriculaires, là où n'existe pas de barrière sang-cerveau.

Voyons d'abord la physiologie de ces barrières, et la façon dont les transports métalliques sont classiquement réalisés à leur niveau.

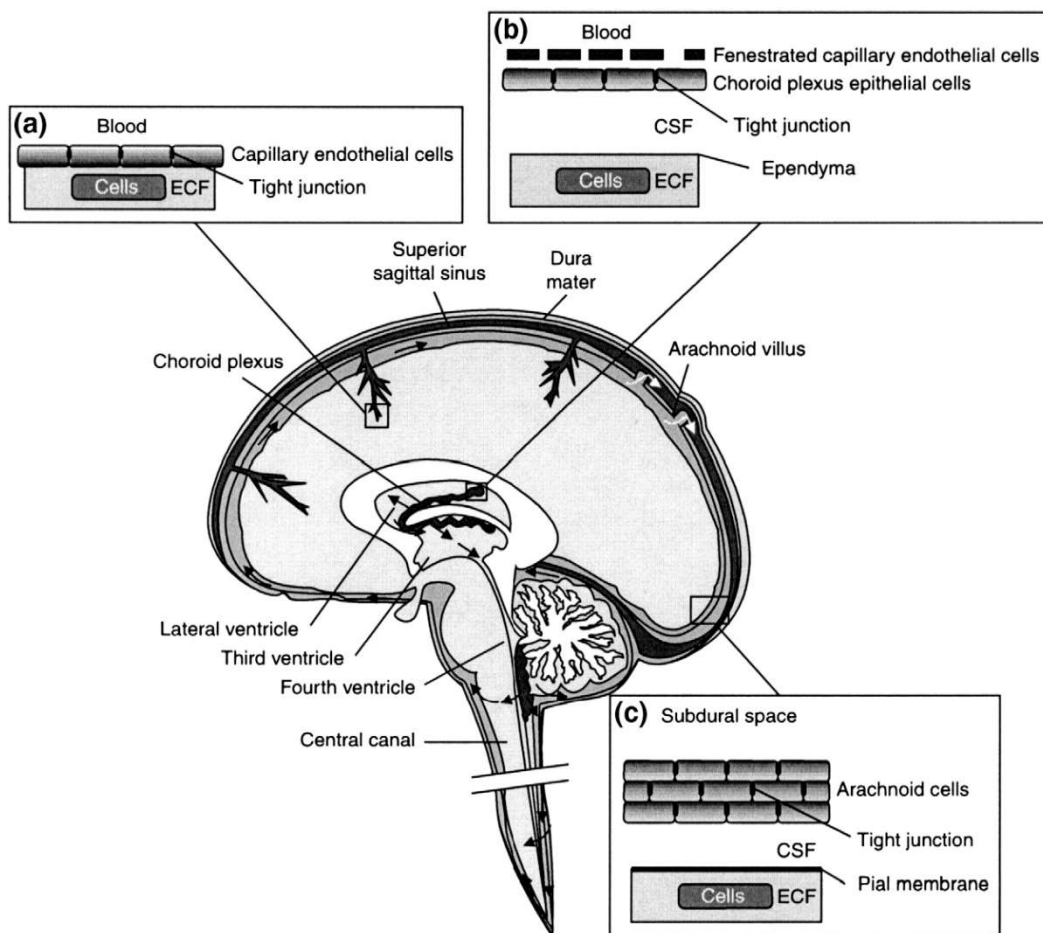


Figure 42 : Organisation des ventricules cérébraux, des plexus choroïdes et du liquide céphalorachidien (LCR, CSF en anglais sur le schéma) dans le système nerveux central, ainsi que les différentes barrières sang-parenchyme. Les plexus choroïdes, produisant le LCR, sont situés dans le 4<sup>e</sup> ventricule sous le cervelet, ainsi que dans le 3<sup>e</sup> ventricule et les ventricules latéraux. Le LCR immerge ensuite tout le cerveau (seulement 25% du LCR se trouvent dans les ventricules), passant des ventricules à la cisterna magna (derrière le cervelet), puis dans l'espace sous-arachnoïdien cérébral et médullaire. Les barrières représentées ici sont (a) la barrière hématoencéphalique sang-parenchyme (ou fluide extracellulaire, « ECF ») ; (b) la barrière sang-LCR (production du LCR) ; et (c) la barrière LCR-sang (réabsorption du LCR) (Abbott, 2010).



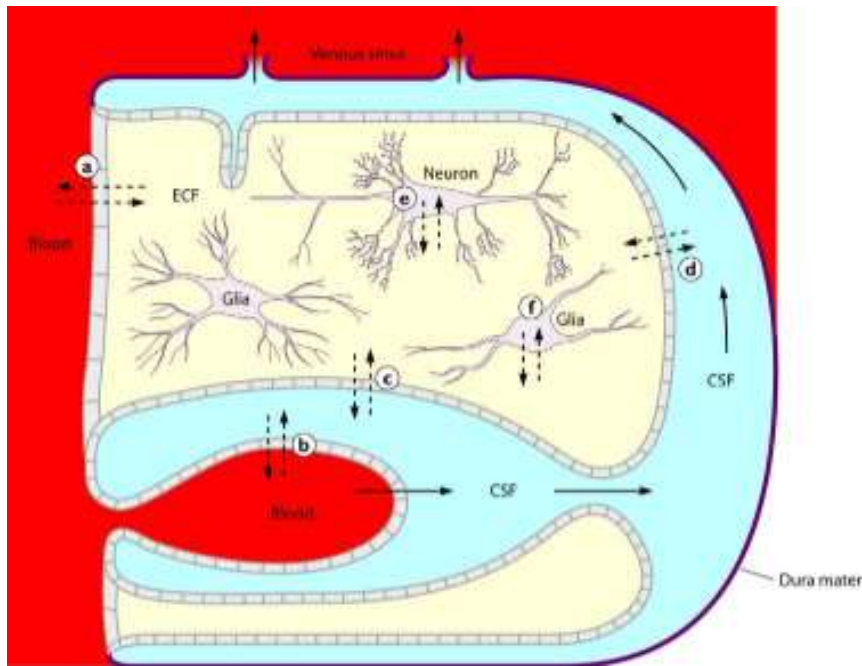


Figure 43 : Zoom sur les barrières à traverser avant d'atteindre le parenchyme cérébral. (a) : passage du sang au fluide extracellulaire (ECF) à travers la barrière hémato-encéphalique ; ou (b) : traversée des plexus choroïdes pour atteindre le liquide céphalorachidien (CSF), puis accès au fluide extracellulaire par l'épendyme (c). Une fois dans le fluide extracellulaire, la membrane plasmique présente une barrière supplémentaire au passage intracellulaire (e)(f). En ce qui concerne l'élimination, le retour dans le liquide céphalorachidien s'effectue à travers la pie-mère (d), puis le sang regagne les sinus veineux (Nau, 2010).

## A. La barrière hémato-encéphalique

La **barrière hémato-encéphalique**, qui sépare la circulation sanguine du tissu cérébral, est une véritable barrière physique à laquelle s'additionnent des transports et métabolismes sélectifs, des molécules et ions circulants. Cette sélection fine permet d'assurer l'homéostasie du système nerveux central, ainsi que sa protection contre d'éventuels composés toxiques ou pathogènes. En effet, les barrières cérébrales sont très efficaces, puisque près de 98% des molécules candidates en neurologie ne parviendraient pas à atteindre le parenchyme cérébral (Pardridge, 2007). Elles sont également un lieu d'élimination des déchets métaboliques cérébraux et autres substances exogènes, par transport dans le sens inverse.

### 1. Circulation sanguine cérébrale

L'apport sanguin au cerveau est assuré par les deux artères carotides internes et les deux artères vertébrales qui fusionnent en une seule artère, le tronc basilaire. Ces artères s'anastomosent à la base du cerveau pour former le polygone de Willis. De ce dernier sont issues les artères cérébrales avec des branches profondes (perforantes) à destinée centrale et des branches corticales à destinée superficielle. L'artère cérébrale moyenne (l'artère sylvienne) irrigue ensuite une grande partie du cortex cérébral, en se divisant en un réseau d'artères piales et d'artéioles pénétrantes (Figure 44). Celles-ci s'amincissent en nombreux capillaires, qui donnent enfin des veinules et veines, assurant le retour veineux.

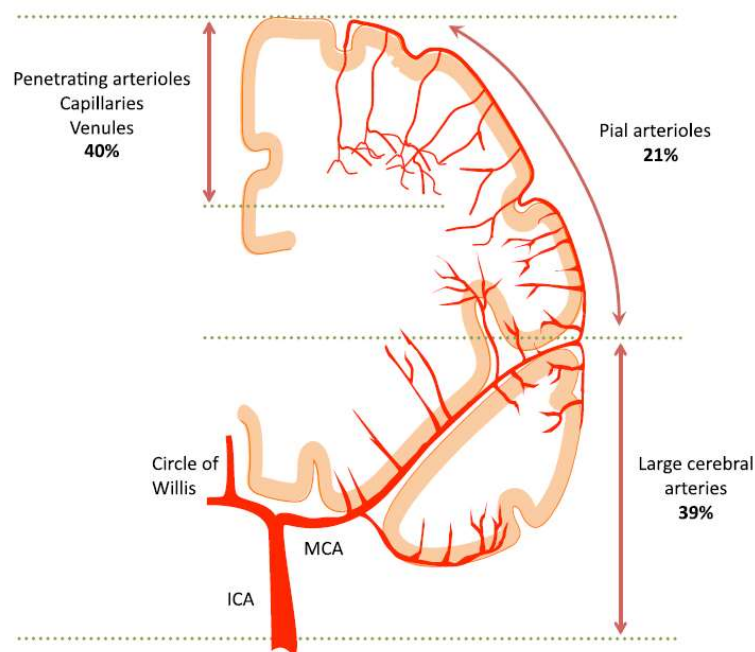


Figure 44 : Anatomie schématique de l'arborescence cérébrovasculaire. ICA : artère carotide moyenne ; MCA : artère cérébrale moyenne (artère sylvienne). Les pourcentages indiquent la résistance vasculaire au niveau des différentes sections, permettant la régulation du débit sanguin (Iadecola, 2017).

## 2. De l'artère à la veinule : structure des parois vasculaires

La structure anatomique des vaisseaux change selon leur nature. Ainsi, les artérioles sont-elles être tapissées de nombreuses cellules musculaires lisses, leur conférant une bonne élasticité. Au niveau de leur transition en capillaires, ces cellules musculaires sont remplacées par des cellules de soutien appelées **péricytes**, encore capables de moduler le flux cérébral, mais en moindre proportion. Ces péricytes recouvrent environ 30% de la surface vasculaire (Iadecola, 2017).

La communication parenchyme cérébral – sang se fait toujours *via* des prolongements cytoplasmiques de cellules gliales : les **pieds astrocytaires**. Ceux-ci viennent ainsi tapisser les vaisseaux sur la quasi-totalité de leur surface.

Les astrocytes reposent sur une matrice extracellulaire qu'ils synthétisent : la **membrane basale parenchymateuse**. Les cellules endothéliales, quant à elles, synthétisent leur propre **membrane basale endothéliale**, à laquelle les péricytes contribuent également. Ces deux matrices sont de composition et localisation bien distinctes au niveau des artères et artérioles. Elles se situent en effet de part et d'autre d'un espace périvasculaire béant, **l'espace de Virchow-Robin** (qui est controversé, comme nous le verrons plus loin), par lequel le LCR peut circuler jusqu'au parenchyme situé plus en profondeur. Au niveau des capillaires, ces deux membranes vont fusionner en une seule, faisant donc disparaître l'espace de Virchow-Robin et venant enrober les péricytes (Zhang, 1990 ; Iadecola, 2017). Elles se distinguent à nouveau autour des veinules, laissant place de nouveau à un espace périvasculaire béant. La Figure 45 représente ces modifications structurales vasculaires.



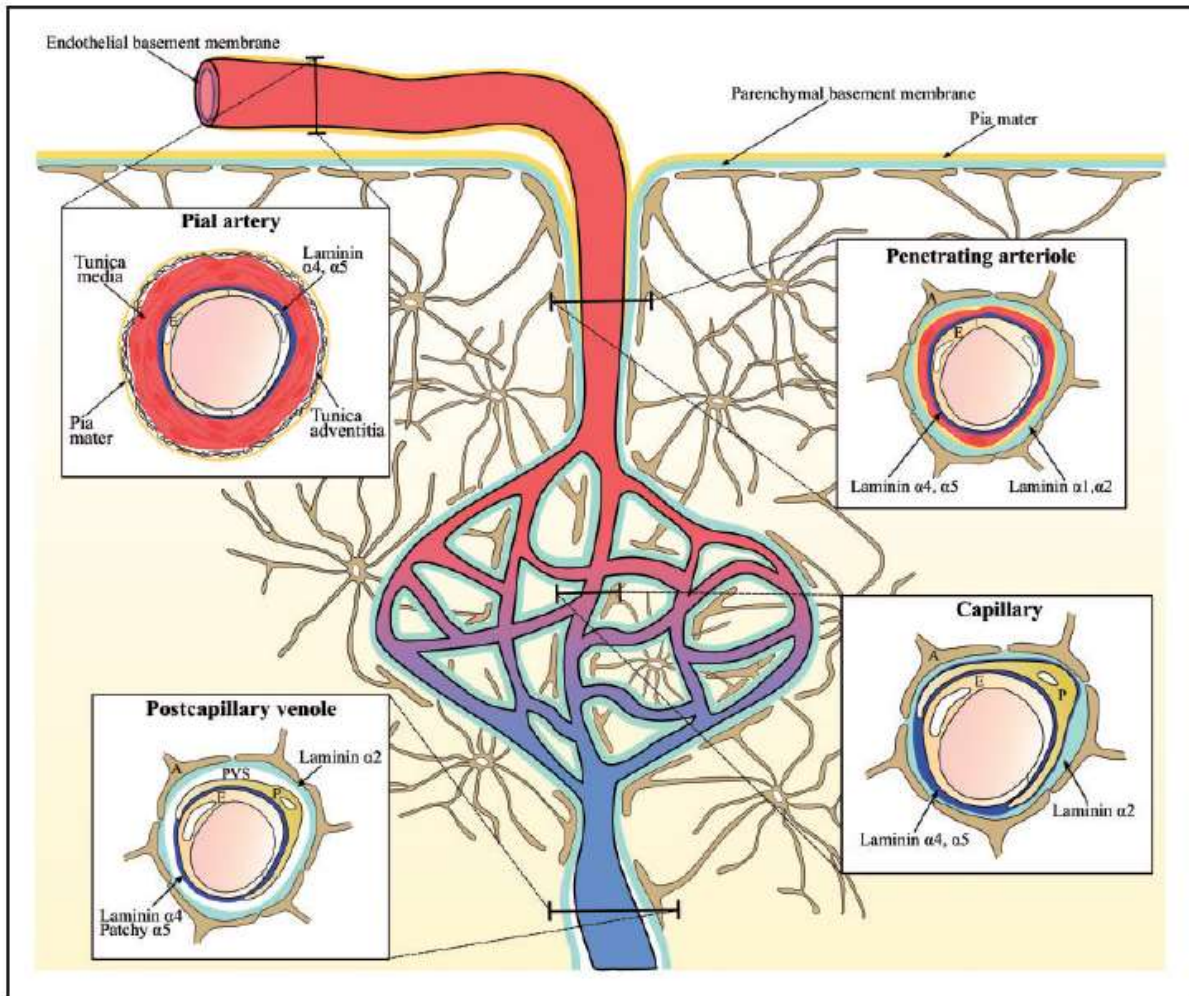


Figure 45 : Représentation des modifications structurales des vaisseaux cérébraux et de leurs cellules de soutien, selon qu'il s'agit d'artères, d'artéoles, de capillaires ou de veinules. Les coupes transversales des vaisseaux indiquent la composition des lames basales parenchymateuse (bleu clair) et endothéliale (bleu foncé). A : astrocyte ; P : péricyte ; E : cellule endothéliale ; PVS : espace périvasculaire (espace de Virchow-Robin) (Thomsen, 2017). L'espace périvasculaire est également présent au niveau des artéoles (non représenté ici).

L'approvisionnement cérébral en nutriments est réalisé au niveau des capillaires, qui couvrent un réseau étoffé, de près de 600 km de long chez l'Homme, offrant ainsi une surface d'échange de 15 à 25 m<sup>2</sup>. Ainsi, on estime que chaque neurone ne se trouve jamais à plus de 20 µm d'un capillaire (Wong, 2013).

L'ensemble cellule endothéliale – membrane basale – péricyte – pied astrocytaire constitue l'**unité neurovasculaire**, ainsi que la barrière hématoencéphalique.

### 3. L'unité neurovasculaire

Le concept d'unité neurovasculaire est récent et il précise la notion de barrière hémato-encéphalique. Il intègre non seulement les cellules endothéliales et les astrocytes périvasculaires, mais aussi les péricytes. Cet ensemble est en contact avec des projections neuronales, ce qui permet aux neuromédiateurs de réguler le débit sanguin régional et probablement aussi de moduler les échanges sang-cerveau.

Plus précisément, ces différents constituants de l'unité neurovasculaire représentent une véritable barrière physique au passage des éléments de la circulation sanguine jusqu'au parenchyme cérébral. Tout



d'abord, les cellules endothéliales cérébrales sont reliées entre elles par des jonctions serrées et adhérentes, ne laissant rien passer de façon paracellulaire (Bazzoni et Dejana, 2004; Wong, 2013). Les composants sanguins sont donc nécessairement soumis aux mécanismes de transport à travers l'endothélium. Ils rencontrent une lame basale accolée à l'endothélium, matrice extracellulaire composée de laminines, de collagène IV, et de protéoglycanes, principalement l'héparane sulfate (Thomsen, 2017). Cette membrane basale permettrait le passage par diffusion d'ions, de neurotransmetteurs et d'ATP (Muio, 2014), mais constituerait tout de même une barrière sélective, puisque son altération entraîne un dysfonctionnement de la barrière hématoencéphalique, accompagnée de l'infiltration de leucocytes, un phénomène d'ailleurs observé dans plusieurs pathologies neurologiques (Daneman, 2015).

Puis interviennent les péricytes. Ces cellules de soutien participent également à la synthèse et au maintien de la membrane basale, régulent l'angiogenèse, le débit sanguin et l'infiltration de cellules immunitaires. Elles constitueraient aussi une réserve de cellules souches multipotentes du système nerveux central (Armulik, 2010 ; Sweeney, 2016).

Les différents solutés sanguins, s'ils ont pu arriver jusque-là, accèdent ensuite aux astrocytes, par les pieds astrocytaires. Ces prolongements cytoplasmiques qui viennent tapisser les vaisseaux, constituent la dernière étape du processus. Les astrocytes maintiennent ainsi l'intégrité de la BHE, régulent l'homéostasie ionique et l'apport en glucose et en eau, *via* les canaux aquaporines 4 (AQP4), largement exprimés aux extrémités des pieds cytoplasmiques (Muio, 2014 ; Keane, 2015). Ils sont également impliqués dans la régulation de la contractilité des vaisseaux, et dans la clairance des neurotransmetteurs (Wong, 2013). C'est souvent par communication étroite entre astrocytes et neurones, que ceux-ci subviennent à leur besoins en nutriments et énergie. La Figure 46 représente ces différents éléments de l'unité neurovasculaire. Les astrocytes produisent la protéine acide fibrillaire gliale (de l'anglais « glial fibrillary acidic protein » ou GFAP), un important biomarqueur de ces cellules (Yang et Wang, 2015) dont nous parlerons ultérieurement.

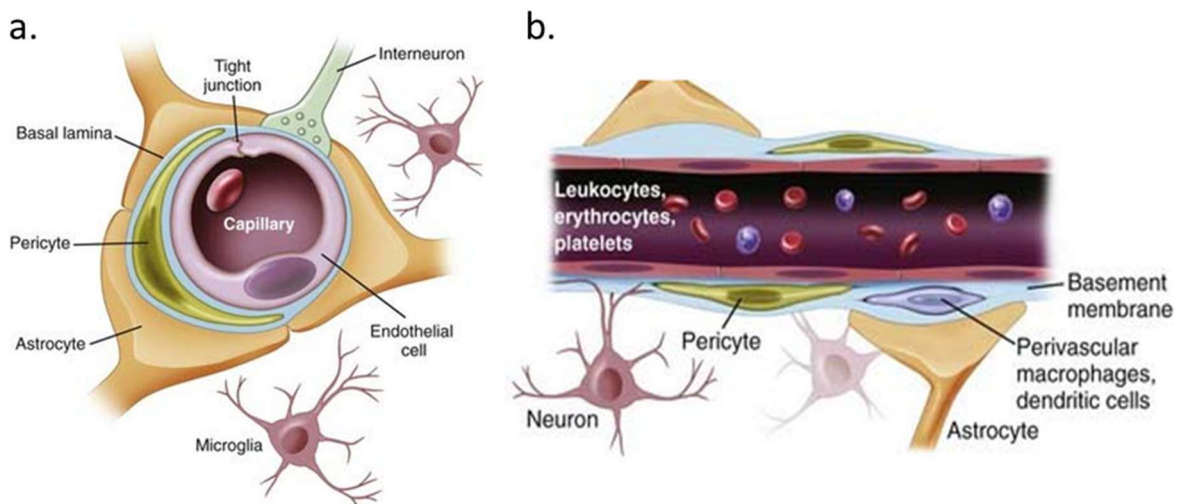


Figure 46 : Organisation de l'unité neurovasculaire, constituant la barrière hématoencéphalique, en coupes transversale (a) et longitudinale (b) (site internet 11).

Enfin, soulignons qu'au niveau de l'unité neurovasculaire et plus précisément de l'interface entre les pieds astrocytaires et les artérioles, l'augmentation transitoire de la concentration du calcium conduit à l'activation de canaux potassiques  $Ca^{2+}$ -dépendants, conduisant à une dilatation des artérioles. Ce phénomène semblerait d'ailleurs à la fois nécessaire et suffisant pour expliquer les changements dans le signal BOLD (« blood oxygenation level dependent ») en IRM fonctionnelle (Wang, 2009).



#### 4. Types de transport à travers la BHE

Le mode de transport à travers les cellules endothéliales de la BHE dépend de la nature des substances concernées (Figure 47). La diffusion paravasculaire des petites molécules solubles est très restreinte, du fait de la présence des jonctions serrées. Les molécules liposolubles de petite taille (< 180 Da) peuvent diffuser passivement à travers la bicouche phospholipidique de l'endothélium, selon un gradient de concentration (Keane, 2015). Des protéines de transport situées à la fois sur les côtés abluminal et luminal assurent des transports spécifiques et régulés de molécules hydrosolubles (telles que le glucose, les acides aminés et les purines). Des phénomènes de transcytose, induits ou non par des transporteurs, permettent le passage de certaines protéines et d'hormones circulantes.

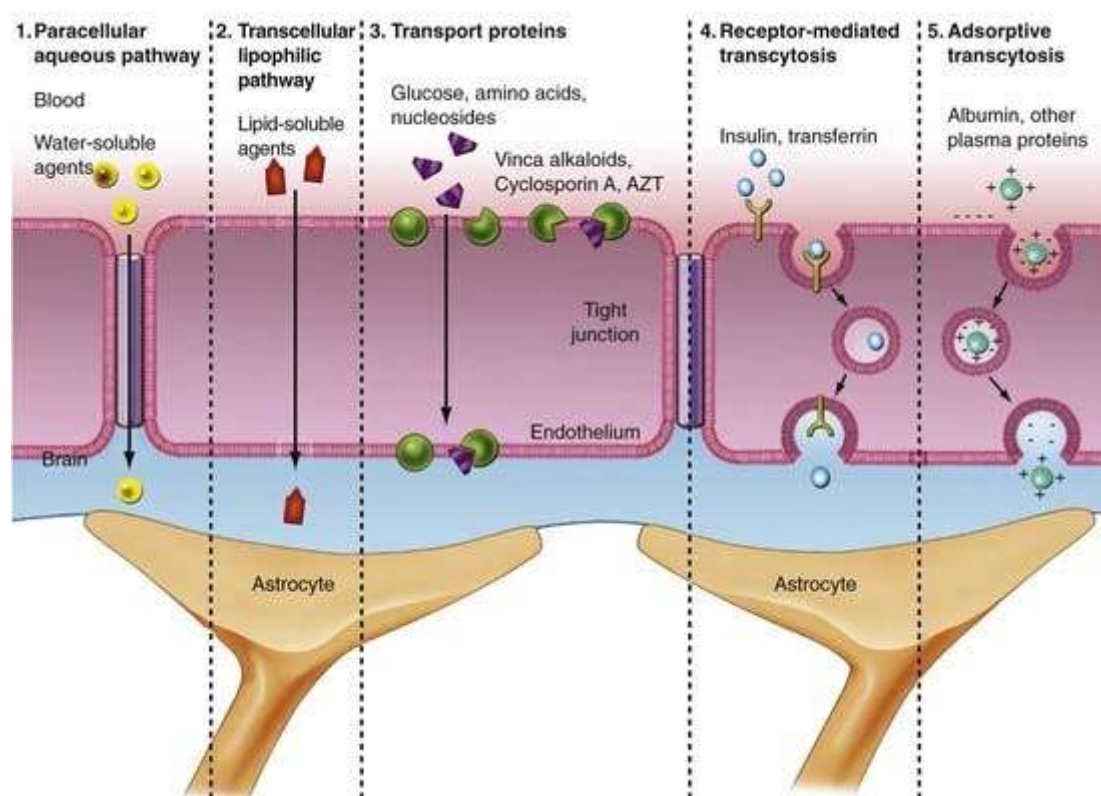


Figure 47 : Représentation des différents modes de transport à travers les cellules endothéliales capillaires. AZT : azathioprine (site internet 11).

#### 5. Efflux actif par les transporteurs ABC

Une catégorie de transporteurs, appelés « famille ABC » (pour ATP-Binding Cassette), assurent des transports actifs et contrôlés de certaines substances vers le sang, leur interdisant l'accès au parenchyme cérébral. En plus des transporteurs d'ions (OATP, pour Organic Anion Transporting Polypeptide), cette famille comprend la glycoprotéine P, qui transporte des molécules jusqu'à 4 kDa (Miller, 2008). Elle est notamment responsable de l'expulsion de chimiothérapies, d'opioïdes, d'antibiotiques, d'immunosuppresseurs, d'antagonistes des canaux calciques (Ford et Hait, 1993). On trouve aussi, parmi les transporteurs ABC, les MRP (pour Multidrug Resistance-associated Proteins), et les BCRP, (pour Breast Cancer Resistance-associated Proteins) (Deeken, 2007). Comme leur nom l'indique, ce sont également des acteurs très actifs de la BHE, posant un sérieux problème thérapeutique pour de nombreuses pathologies.





Les capillaires sanguins expriment particulièrement ces transporteurs, qui y sont nombreux à la surface des cellules endothéliales, du côté luminal. On en trouve aussi aux extrémités des pieds astrocytaires (Schlachetzki et Pardridge, 2003).

## B. La barrière hémato-méningée

La seconde barrière cérébrale est la **barrière hémato-méningée**, entre sang et liquide céphalorachidien. Elle a deux composantes : la première intervient lors de la formation du LCR depuis le sang ; la seconde opère lors de la clairance du LCR, de retour dans la circulation veineuse.

### 1. Barrière sang-LCR et production du LCR

C'est au niveau des ventricules cérébraux que se situe cette barrière. Les cellules endothéliales des vaisseaux (il s'agit de veinules et de capillaires) qui s'y trouvent sont plus lâches, et fenêtrées (l'enveloppe du vaisseau est discontinue et présente des pores de 10-30 nm de diamètre). Ce sont directement les plexus choroïdes, composés de cellules cubiques pseudo-épithéliales, épendymaires, organisées en monocouches, qui tapissent le pourtour des vaisseaux. Les plexus choroïdes ont pour rôle essentiel la production du liquide céphalorachidien, par filtration fine et régulée du sang. Leurs nombreux replis et villosités offrent une large surface d'échange (Figure 48).

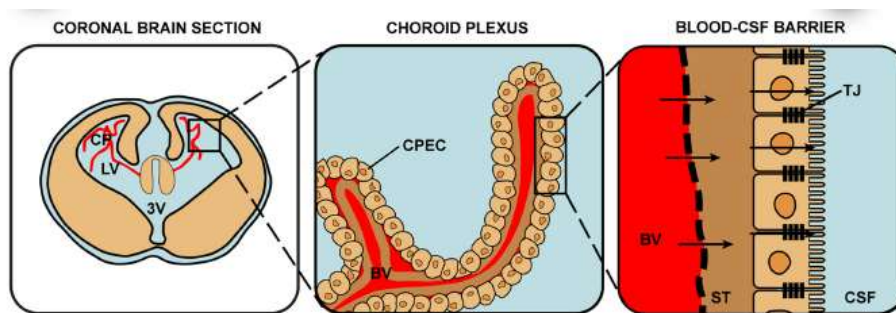


Figure 48: Les plexus choroïdes, barrière physique entre circulation sanguine et liquide céphalorachidien. CP : plexus choroïdes ; LV : ventricule latéral ; 3V : 3<sup>e</sup> ventricule ; CPEC : cellule épithéliale du plexus choroïde ; BV : vaisseau sanguin ; ST : stroma / membrane basale ; TJ : jonction serrée ; CSF : liquide céphalorachidien (Liddlelow, 2015).

Comme toutes les cellules épendymaires, les cellules des plexus choroïdes sont fortement polarisées et présentent des microvillosités du côté luminal. Ces cellules reposent sur une membrane basale et sont séparées des vaisseaux sanguins par un stroma contenant du tissu conjonctif (des fibres lâches de collagène) dans lequel des macrophages ou fibroblastes peuvent circuler. Les cellules épithéliales permettent même parfois le passage de ces cellules dans le LCR (Figure 49).



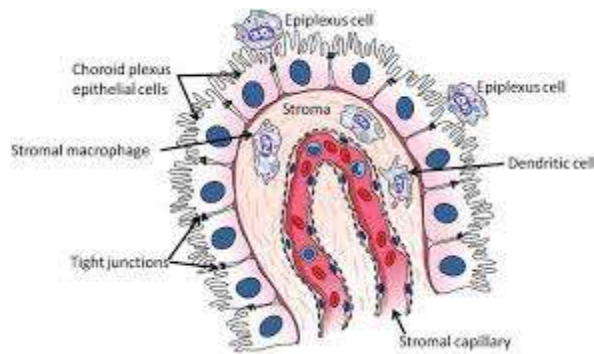


Figure 49 : Représentation de la monocouche de cellules épendymaires des plexus choroïdes, reposant sur une lame basale et un stroma, organisés autour d'un capillaire sanguin. Le stroma contient ici des macrophages et des cellules dendritiques (Kaur, 2016).

## 2. Les transports à travers les plexus choroïdes

Les différents types de transport à travers les plexus choroïdes sont schématisés dans la Figure 50 ci-dessous. A cause des jonctions serrées, la diffusion passive de petites molécules hydrophiles est assez limitée (situation 1, Figure 50). Cela permet un contrôle des transports, assurés par différents transporteurs (Liddelow, 2015) (Figure 50). De plus, des pompes actives de type ABC permettent le reflux des substances liposolubles ou de produits spécifiques, comme c'est aussi le cas au niveau de la BHE (situation 2). On y trouve en effet des transporteurs MRP1 (pour « multi resistance-associated protein ») au niveau basal des plexus, et des glycoprotéines-P au niveau apical (Deeken, 2007). Un transport actif d'ions, d'acides aminés, de glucose et autres petites molécules vers le LCR est assuré par des transporteurs de la famille des SLC (pour « solute carrier ») (situation 3). Un transport bidirectionnel d'ions est réalisé par la famille des transporteurs d'anions organiques (AOT) (situation 4). Des échangeurs d'ions ( $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ) au niveau abluminal et transporteur NKCC ( $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ ) au niveau apical par exemple, ainsi que la présence de pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, permettent de garder un gradient ionique de NaCl, favorisant l'afflux d'eau vers le LCR *via* les aquaporines (AQP1) (cas 7) (Johanson, 2005). Quelques protéines (seulement 0,5% des protéines plasmatiques) passent par des transporteurs spécifiques et sont retrouvées dans le LCR (cas 5) (Cutler, 1967). La transcytose, médiée par des récepteurs spécifiques ou non, permet également le transport de certaines substances (les folates, transportés par des exosomes, par exemple) (cas 6).

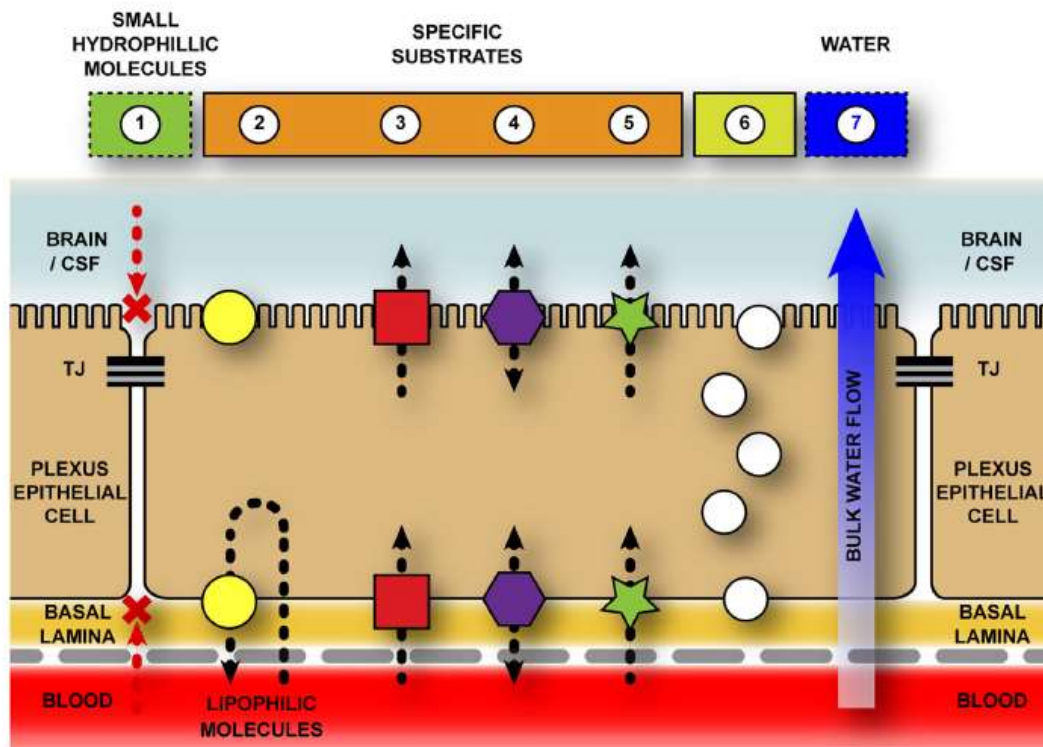


Figure 50 : Modes de transports à travers les plexus choroïdes (Liddelow, 2015).

### 3. Propriétés du liquide céphalo-rachidien

Le volume du liquide céphalorachidien chez l'Homme adulte est environ de 150 mL (Johanson, 2008). Cependant, la production moyenne de LCR est de 20 à 30 mL par heure, variant selon le rythme circadien en faveur de la phase nocturne, ce qui indique un renouvellement complet de 3 à 4 fois par jour (Nilsson, 1992 ; Kaur, 2016). Seuls 25% du LCR seraient intra-ventriculaires, la majorité étant sous-arachnoïdienne (Johanson, 2008). Entre 75 et 90% du LCR seraient produits par les plexus choroïdes, la fraction restante étant attribuée au parenchyme cérébral, à la moelle épinière, à l'espace sous-arachnoïdien, ou enfin à l'artère piale (Brinker, 2014 ; Matsumae, 2016).

Sa composition est enrichie en chlorure et magnésium par rapport au sang, et appauvrie en potassium, glucose, urée, acides aminés et, plus particulièrement, en protéines (Davson, 1967 ; Johanson, 2008).

Le LCR assure des rôles variés. En plus de son rôle de barrière et de maintien de l'homéostasie, il a un rôle de protection mécanique, amortissant les chocs. Le cerveau, se retrouvant en flottaison, aurait ainsi une masse virtuelle largement réduite, de l'équivalent de 25 à 50 g, alors que sa masse effective est d'environ 1,4 kg. Il permet aussi le refroidissement du cerveau, absorbant la chaleur produite par l'activité cérébrale. Le LCR est également impliqué dans la transduction du signal et l'immunité, ainsi que dans l'élimination des toxines et des métabolites cérébraux (Matsumae, 2016).

### 4. Barrière liquide céphalo-rachidien – sang et réabsorption du liquide céphalo-rachidien

La réabsorption du LCR sous-dural, qui trouve dans l'espace sous-arachnoïdien, est réalisée au niveau de l'arachnoïde et de ses granulations (ou villosités) arachnoïdiennes. L'épithélium arachnoïdien n'est pas vascularisé, mais il est accolé au sinus veineux sagittal supérieur. La clairance du LCR vers le sang



est ainsi effectuée par cette voie, pour rejoindre la circulation veineuse *via* le sinus veineux sagittal supérieur. Un drainage lymphatique est aussi évoqué. Il permettrait également une réabsorption liquidienne, par des vaisseaux lymphatiques longeant le sinus veineux et aboutissant aux ganglions lymphatiques cervicaux profonds (Louveau, 2016) (Figure 51).

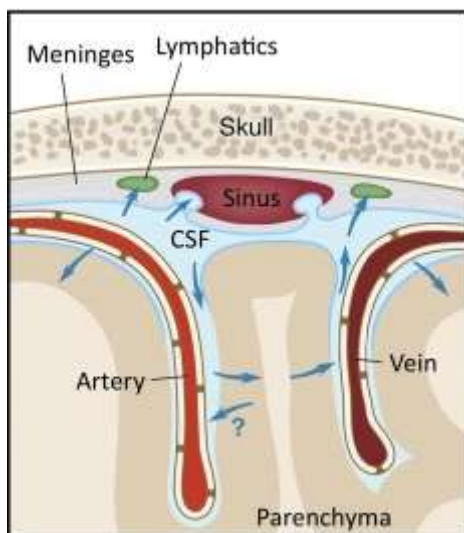


Figure 51 : Barrière LCR – sang (Louveau, 2016).

### C. Les organes circumventriculaires

Les **organes circumventriculaires**, situés près des 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> ventricules, sont au nombre de sept (Figure 52) (Duvernoy et Risold, 2007). Ils correspondent à des zones où la barrière hémato-encéphalique est absente, car ils sont plus perméables (absence de jonction serrées) et fenêtrés (Gross, 1992 ; Morita et Miyata, 2012). Ces petites zones sont responsables de l'import de substances qui traverseraient difficilement (ou pas du tout) la BHE et qui ne sont pas synthétisées par le cerveau, telles que certaines hormones, mais aussi du passage dans la circulation sanguine systémique de peptides produits uniquement dans le cerveau. Ils auraient un rôle important dans la thermorégulation, le métabolisme énergétique, l'immunomodulation, la régulation de l'homéostasie cardiovasculaire (Benarroch, 2011).

Une certaine sélectivité des substances qui passent par ces structures existe cependant (Miyata, 2015) et la surface d'échange qu'elles représentent avec le compartiment sanguin est environ 5000 fois plus petite que celle offerte par la BHE (Levy, 2007). Les organes circumventriculaires ne réalisent pas d'échanges avec le LCR, car ils en sont isolés par les **tanycytes**, des cellules épendymaires qui tapissent la surface des ventricules (Langlet, 2013).



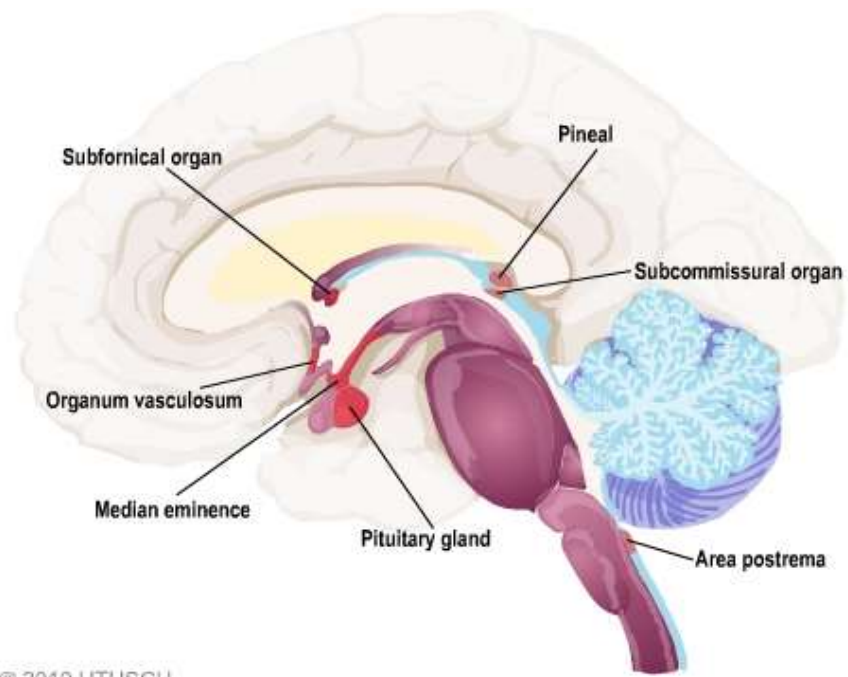


Figure 52 : Localisation des organes circumventriculaires, selon une représentation dans le plan sagittal (site internet 12)



## Chapitre 5 : Histologie du cortex cérébelleux et des DCN

Histologiquement, on distingue 3 couches principales dans le cortex cérébelleux :

- ❖ La **couche moléculaire** en surface, composée des fibres parallèles, horizontales, ainsi que des petits interneurons (cellules étoilées et cellules en panier) ;
- ❖ La monocouche de **cellules de Purkinje** ;
- ❖ La **couche granulaire**, très riche en petits interneurons, les cellules en grain (corps cellulaires des fibres parallèles de la couche moléculaire), ainsi que des **cellules de Golgi** (interneurons inhibiteurs), des cellules de **Lugaro** dans la partie externe de la couche granulaire, encore mal connues, et enfin les **cellules unipolaires en brosse** (UBC), des interneurons excitateurs.

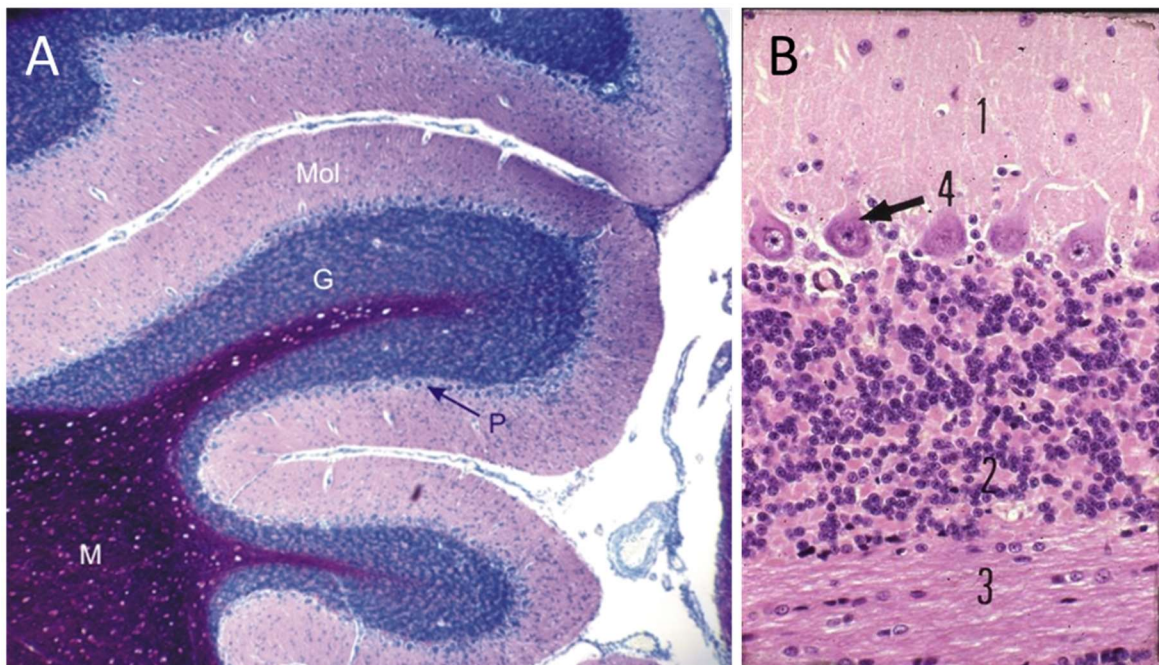


Figure 53: Histologie du cortex cérébelleux. (A) : coloration au bleu de toluidine et fuchsine acide (faible grossissement). (B) Coloration de Dominici (fort grossissement). On distingue parfaitement la couche moléculaire en périphérie des lobules (Mol ; 1), la couche granulaire et ses petites cellules en grain (G ; 2), ainsi que la couche des cellules de Purkinje les séparant (P ; 4). En profondeur, les prolongations des neurones en axones forme la substance blanche (M ; 3) (Site internet 13 et 14).

Les **cellules de Purkinje** forment une monocouche cellulaire, séparant les couches moléculaire (contenant leur arborisation dendritique fournie, de 300µm de long environ) et granulaire (contenant leurs uniques axones). Ce sont de grosses cellules en forme de poire (diamètre de 25 à 40 µm (Herndon, 1963)), et peu nombreuses (15 millions environ). Les extrémités dendritiques sont constituées de près de 80 000 dendrites, faisant synapses excitatrices avec les fibres parallèles de la couche moléculaire, et, plus ou moins directement, avec tous les types cellulaires du cortex cérébelleux. Elles ont pour neurotransmetteur l'**acide gamma-aminobutyrique ou GABA**, inhibant interneurons et neurones des noyaux cérébelleux profonds.





Les **cellules en grain** (ou cellules granulaires) sont de tout petits corps cellulaires arrondis, de 5-8  $\mu\text{m}$  de diamètre, présents en très grand nombre. C'est en effet la population neuronale majoritaire du cerveau ; on en compte environ 50-100 milliards (elles représentent 50-75% des neurones du cerveau). Ces cellules possèdent chacune 4 à 5 dendrites dans la couche granulaire, faisant synapse avec les autres interneurons corticaux, et principalement avec les **fibres moussues, en provenance du tronc et de la moelle épinière**. Les cellules en grain se prolongent en périphérie en deux très longs axones (2 à 7 mm), constituant les **fibres parallèles de la couche moléculaire**. Leur grand nombre résulte en un rapport de près de 400 000 fibres pour un seul arbre dendritique de cellule de Purkinje (communication personnelle, Pr. M Manto, Université Libre de Bruxelles).

Enfin, la couche moléculaire contient les **cellules en étoile**, et les **cellules en panier** (qui forment des synapses dites « en panier » sur les corps cellulaires des cellules de Purkinje). Ces deux types cellulaires forment des synapses GABAergiques avec les dendrites des cellules de Purkinje.

Les noyaux cérébelleux profonds sont eux constitués des mêmes cellules que dans toute matière grise : des neurones (principalement multipolaires), des astrocytes et des oligodendrocytes (qui assurent la synthèse des gaines de myéline), et de la microglie et enfin, de macrophages. On y trouve également les axones et fibres des nombreuses cellules communiquant avec les neurones des noyaux cérébelleux profonds. En effet, un seul neurone recevrait les efférences d'environ 25 cellules de Purkinje, et une cellule de Purkinje enverrait des projections à environ 35 neurones nucléaires (communication personnelle, Pr. M Manto, Université Libre de Bruxelles).



### A. Etude de l'accumulation de chélates de Gd par imagerie multimodale, chez le Rat insuffisant rénal (Publication 3)

#### 1. Analyse rationnelle

Cette étude avait pour but de documenter la **localisation précise du Gd tissulaire au niveau subcellulaire**. Elle a été réalisée de façon ancillaire sur l'étude ayant fait l'objet de la publication 2. L'analyse détaillée de 3 structures anatomiques distinctes, au comportement en IRM et à la composition cellulaire différents, a été envisagée :

- les **noyaux cérébelleux profonds**, structure accumulant le plus de Gd et induisant un rehaussement T1 ;
- le cortex cérébelleux et plus particulièrement sa **couche granulaire**, suite à des travaux précliniques publiés entre temps montrant (en LA-ICP-MS) une accumulation de Gd à ce niveau, suite à des injections de gadodiamide (Lohrke, 2017), alors que cette structure ne se rehausse pas en IRM pondérée en T1;
- et enfin les **plexus choroïdes**, par lesquels il est admis que les chélates de Gd passent dans le LCR puis dans le parenchyme cérébral (Jost, 2017), mais qui peut se rehausser dans le cas d'injections de gadodiamide chez le Rat insuffisant rénal (notre étude n°1) ou aussi le patient insuffisant rénal (Cao, 2016).

Le tout a été réalisé sur des rats de la deuxième étude, et permet ainsi la comparaison **de trois chélates de Gd** de catégories structurales différentes : le gadotérate, le gadobénate, et le gadodiamide.

Cette étude en **microscopie électronique en transmission (TEM)** implique la préparation de l'échantillon préalable à son inclusion en résine. Il est généralement admis que les bains de solvants utilisés à cet effet éliminent le Gd pouvant être accumulé sous forme d'espèces solubles (chélate de Gd intact ou Gd lié à des macromolécules) (Thakral, 2009). Le Gd détecté dans ce cas ne serait qu'alors que la fraction insoluble de Gd tissulaire. La caractérisation de l'élément Gd peut se faire grâce à la **spectroscopie de perte d'énergie d'électrons (EELS)**, couplée à la TEM. Cela nécessite d'augmenter la densité électronique en se limitant à l'analyse d'une zone restreinte. Dans la mesure où le Gd est dense aux électrons, l'analyse pourra être réalisée suite à l'observation de structures denses, pouvant être des suspicions d'amas de Gd. La suspicion « visuelle » de la présence de Gd ne sera cependant possible que dans le cas d'amas de Gd, concentré localement. Si le Gd est réparti de façon éparse et homogène dans le champ de vue, il sera difficile de le détecter sur l'image, et il faudrait balayer l'ensemble de l'échantillon, ce qui serait très chronophage. L'analyse ne sera donc pas réalisée de façon aléatoire.

Ayant conscience de toutes ces limites, la **présence de Gd**, qui est donc supposé principalement insoluble, a été étudiée à l'aide de l'EELS, ainsi que sa colocalisation avec d'autres éléments. Une analyse élémentaire plus fine en termes de quantification, la **spectroscopie de dispersion d'énergie (EP-XRF)**, cf Chapitre 3), a aussi été réalisée. Certains résultats nous ont également amenés à utiliser la **spectrométrie de masse d'ions secondaires (NanoSIMS)**, afin de pouvoir mieux caractériser et cartographier la présence de phosphore, de fer et de soufre.



Enfin, la localisation du Gd à l'échelle subcellulaire, et dans les différentes structures cérébelleuses d'étude, nous ont permis de **proposer une hypothèse concernant le mécanisme de passage du Gd** à travers les barrières cérébrales.

Ces travaux ont fait l'objet de la publication suivante :

Rasschaert M, Schroeder JA, Wu TD, Marco S, Emerit A, Siegmund H, Fischer C, Fretellier N, Idée JM, Corot C, Brochhausen C, Guerquin-Kern JL. Multimodal imaging study of gadolinium presence in rat cerebellum: differences between Gd chelates, presence in the Virchow-Robin space, association with lipofuscin, and hypotheses about distribution pathway. *Invest Radiol.* 2018; **53**:518-528.



## 2. Les techniques de microscopie électronique en transmission et du NanoSIMS

### A. La microscopie électronique et ses modes d'analyse élémentaire

La **microscopie électronique en transmission** est la technique de référence pour accéder à la l'ultrastructure subcellulaire d'un échantillon biologique. Un microscope électronique est constitué d'un canon à électron, d'un système de lentilles électromagnétiques et d'un détecteur, le tout fonctionnant sous un vide poussé ( $10^{-7}$  à  $10^{-10}$  mbar, maintenu par un ensemble de pompes et de vannes). Le canon à électron émet des électrons qui sont ensuite accélérés pour atteindre une longueur d'onde de quelques pm. Les lentilles électromagnétiques permettent de contrôler le faisceau d'électron dans un système d'optique électronique. Ce faisceau d'électron interagit avec l'échantillon et les électrons sont mesurés par le détecteur pour former une image « de transmission » de l'échantillon. La résolution théorique de cette technique est théoriquement de l'ordre de la longueur d'onde des électrons. En pratique cependant, des aberrations limitent cette résolution. Celle-ci reste tout de même excellente, puisqu'elle est de l'ordre de l'angström.

Comme nous l'avons vu au chapitre 3, l'interaction du faisceau d'électrons primaires avec l'échantillon est à l'origine de diffusions élastiques et inélastiques de ces électrons.

L'**image** de l'échantillon est construite par un détecteur à partir des **diffusions élastiques des électrons**, tel un cliché de diffraction. Dans ce cas, on s'affranchit des diffusions inélastiques au moyen d'un filtre énergétique, empêchant le passage des électrons ayant perdu de l'énergie. Cela élimine le bruit de fond apporté par les électrons inélastiques, et améliore ainsi le contraste et la résolution de l'image. Le contraste spatial résulte de différences en densité ou en composition chimique.

Les diffusions élastiques permettent l'analyse de la composition élémentaire de l'échantillon, par les techniques de spectroscopie de perte d'énergie d'électrons (EELS) couplée à la TEM (TEM-EELS), et la microscopie électronique en transmission filtrée en énergie (EFTEM).

La figure ci-dessous (Da Cunha, 2016) compare les deux techniques TEM-EELS et EFTEM (Figure 54).



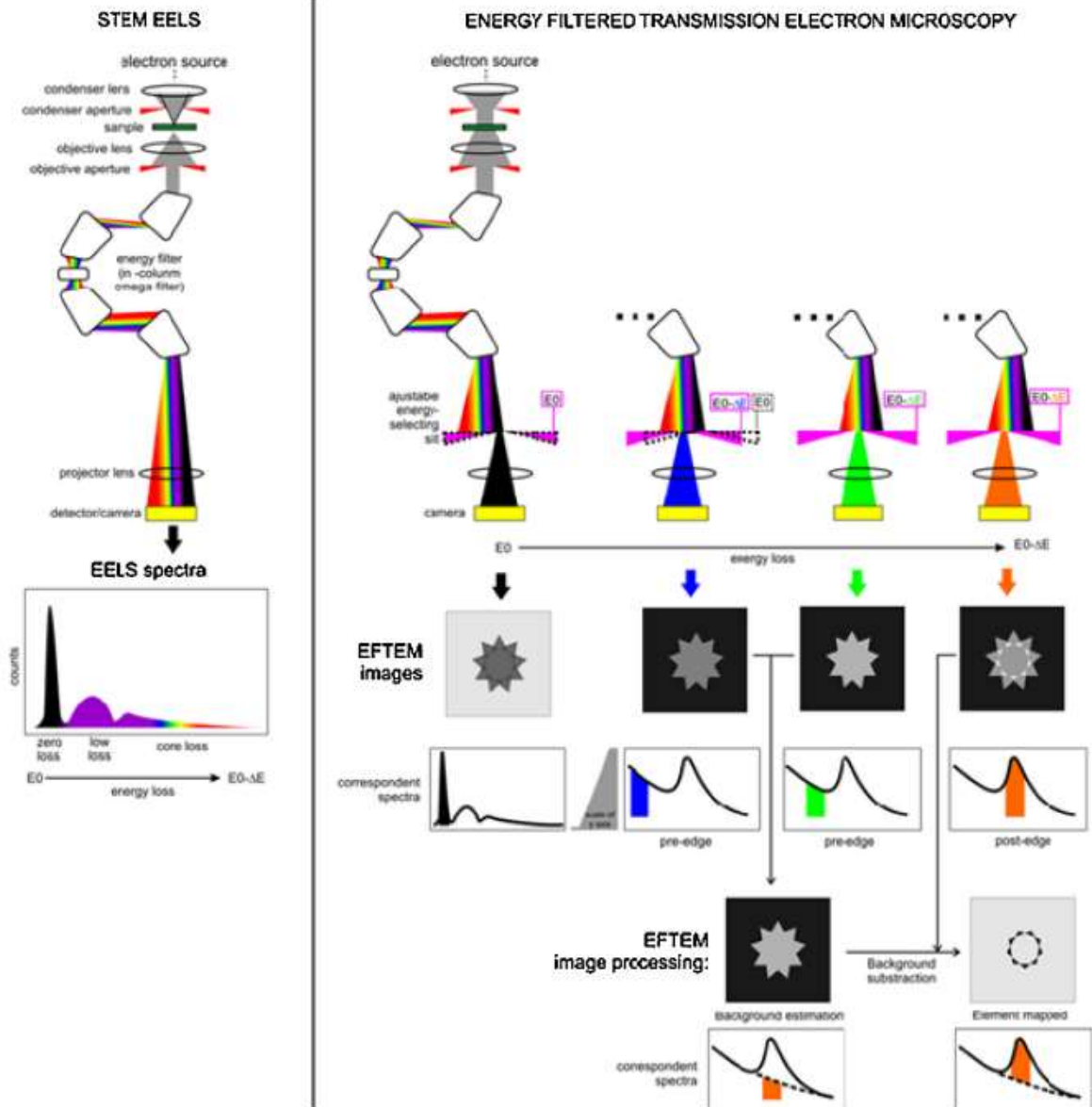


Figure 54: Principe simplifié de l'acquisition du spectre et de la formation de l'image en modes EELS et EFTEM. L'image de gauche présente le spectre d'énergie issu du filtre en énergie. L'image de droite présente l'utilisation d'une fente mobile (en rose) qui permet la sélection d'électrons de différentes valeurs d'énergie ( $E_0$  et  $\Delta E$ ), qui, à leur arrivée sur le détecteur, génèrent différentes images EFTEM. Comme les électrons subissant de multiples diffusions peuvent perdre une énergie totale équivalente à celle d'un élément caractéristique, il convient de les soustraire de l'image formée correspondant à l'énergie caractéristique de l'élément étudié. Cette approche nécessite l'interpolation et la soustraction du nombre de coups correspondant à ces électrons diffusés (bruit de fond). La figure (en bas à droite) schématise cette soustraction du bruit de fond (Da Cunha, 2016).

## B. La spectrométrie de masse d'ions secondaire (SIMS)

La **spectrométrie de masse d'ions secondaires** permet de documenter la composition élémentaire et isotopique d'échantillons *in situ*, à des échelles allant de quelques micromètres jusqu'au-dessous du micromètre (Da Cunha, 2016).

L'instrument **NanoSIMS** est équipé d'une microsonde ionique, fonctionnant suivant la technique SIMS. La microsonde ionique permet une résolution spatiale encore meilleure (jusqu'à 50 nm) (Guerquin-Kern, 2005).

L'analyse fine de surfaces solides est réalisée par bombardement d'un faisceau d'ions primaires au contact de la surface de l'échantillon à analyser. Cela engendre une cascade de collisions, provoquant des cassures moléculaires, et une ionisation partielle. Ce sont ces ions secondaires qui vont être collectés et analysés.

Sur le NanoSIMS, en raison du recours à une lentille à immersion coaxiale pour l'analyse, les ions primaires de la source, et les ions secondaires analysés, doivent être de charge opposée. La majorité des ions d'intérêt en biologie étant négatifs ( $\text{CN}^-$ ,  $\text{P}^-$ ,  $\text{FeO}^-$ ...), le faisceau primaire est généralement une source d'ions positifs  $\text{Cs}^+$ . Pour l'analyse d'éléments positifs comme le Gd, il s'agit d'une source d'ions primaires négatifs, notamment  $\text{O}^-$ , comme obtenue par exemple par un duoplasmatron.

Les ions secondaires générés, issus d'une cascade de collisions, sont ensuite collectés et séparés par spectroscopie de masse, selon leurs rapports masse/charge. On obtient ainsi un spectre de masse secondaire, représentatif de la composition chimique de l'échantillon. Un système de détecteur multi-collection permet d'analyser simultanément jusqu'à 7 masses différentes. Cette technique est relativement destructrice, mais elle permet une imagerie élémentaire et isotopique semi-quantitative et très sensible. La haute résolution spatiale, **de l'ordre de 50 nm**, permet la localisation subcellulaire des éléments d'intérêt, qui doit être recoupée avec une imagerie morphologique obtenue à partir d'éléments comme le carbone/azote ( $\text{CN}^-$ ), présents dans les protéines, lipides etc. (réalisée par un canal de collection dédié) ou par imagerie corrélative (TEM ou optique) réalisée au préalable. Avec l'instrument à notre disposition, la brillante du faisceau  $\text{O}^-$  obtenu avec le duoplasmatron ne permet pas d'obtenir une sensibilité suffisante pour l'analyse de traces de Gd dispersées. De plus, une source en ions négatifs aurait pour conséquence la perte des repères anatomiques du tissu biologique, apportés par  $\text{CN}^-$ , et donc l'information de localisation. Nous avons donc travaillé avec une source d'ions positifs  $\text{Cs}^+$ . Le Gd a été étudié par ailleurs, par imagerie corrélative.

Le recours à cette technique est également envisagée pour l'étude de la présence et distribution du ligand d'un chélate de Gd, s'il est synthétisé avec des isotopes peu courants dans un tissu biologique (deutérium). Cette étude ayant été jugée à risque, elle a été placée en fin de thèse.





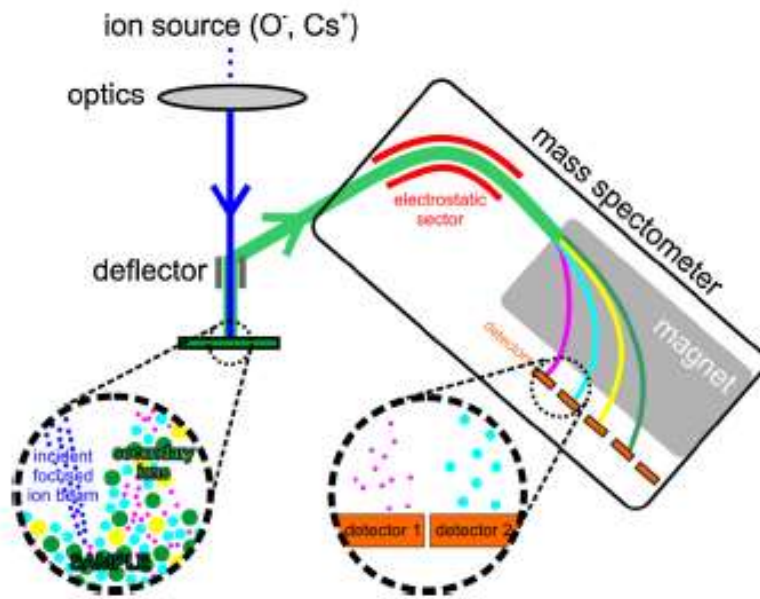


Figure 55: Schéma simplifié du principe de l'imagerie chimique par spectrométrie de masse d'ions secondaire. Un faisceau d'ions primaires (représenté en bleu foncé) est dirigé vers l'échantillon pour l'ioniser, tandis que le flux d'ions secondaires généré (en vert) est collecté et acheminé grâce à un système de lentilles, vers un spectromètre de masse. Celui-ci permet l'analyse d'un nombre limité de masses différentes en simultané (Da Cunha, 2016).

OPEN

# Multimodal Imaging Study of Gadolinium Presence in Rat Cerebellum

## *Differences Between Gd Chelates, Presence in the Virchow-Robin Space, Association With Lipofuscin, and Hypotheses About Distribution Pathway*

Marlène Rasschaert, MS,\*†‡ Josef A. Schroeder, PhD,§ Ting-Di Wu, PhD,†‡ Sergio Marco, PhD,†‡  
 Andréa Emerit, MS,\* Heiko Siegmund, BS,§ Claudia Fischer, BS,§ Nathalie Fretellier, PhD,\*  
 Jean-Marc Idée, PharmD, MS,\* Claire Corot, PharmD, PhD,\*  
 Christoph Brochhausen, MD, PhD,§ and Jean-Luc Guerquin-Kern, PhD†‡

**Purpose:** The aim of this study was to investigate, based on in-depth multimodal imaging, the presence of Gd deposits, their ultrastructure, location, and co-location with endogenous elements, in the cerebellum, after repeated administrations of gadolinium-based contrast agents (GBCAs).

**Methods:** Rats sensitized by subtotal nephrectomy received 20 daily intravenous injections of 0.6 mmol Gd/kg for 5 weeks of commercial forms of either gadoterate, gadobenate or gadodiamide, or saline (n = 2/group). The study was randomized and blinded. Magnetic resonance imaging examination was performed weekly. One month after the last injection, electron microscopy analysis of the deep cerebellar nuclei, the granular layer of cerebellar cortex, and the choroid plexus was performed. Elemental analysis of deposits was carried out by electron energy loss spectroscopy. Secondary ion mass spectroscopy was used for complementary chemical mapping.

**Results:** A T1 hypersignal was evidenced in the deep cerebellar nuclei of rats treated with linear GBCAs, and Gd deposits were identified in all the studied cerebellar structures with gadobenate and gadodiamide (except in the granular layer in gadobenate-treated rats). No such effect was found with the macrocyclic GBCA gadoterate. Most of the Gd deposits revealed a characteristic spheroid “sea urchin-like” morphology, rich in phosphorus, and were localized in the basal lamina of microvessels, in the perivascular Virchow-Robin space, and in the interstitium. Gd was also identified in the glial cells, associated with lipofuscin pigments, for these same groups.

**Conclusions:** Transmission electron microscopy analysis of cerebellums of renally impaired rats repeatedly injected with gadobenate and gadodiamide revealed the presence of Gd. Spheroid Gd depositions consisting of a filamentous meshwork were observed in the wall of microvessels, in perivascular Virchow-Robin space, and in the interstitium. Gd was also found in choroid plexus and was associated with pigments (likely lipofuscin) in glial cells. This is consistent

with the involvement of the glymphatic distribution pathway for GBCAs. No insoluble Gd deposits were detected in rats injected with the macrocyclic GBCA gadoterate and controls.

**Key Words:** deep cerebellar nuclei, cerebellar cortex, choroid plexus, glymphatic pathway, electron microscopy, secondary ion mass spectroscopy, gadolinium presence, gadodiamide, gadobenate, gadoterate

(*Invest Radiol* 2018;53: 518–528)

Gadolinium (Gd) accumulation in brain structures after repeated injections of gadolinium-based contrast agents (GBCAs) has been widely investigated. It is well established, from nonclinical and clinical studies, that Gd accumulates after repeated exposure to linear Gd chelates,<sup>1,2</sup> in brain regions rich in iron,<sup>3,4</sup> and in different coexisting forms (ie, chelated Gd, dissociated and soluble Gd bound to unidentified macromolecules, and insoluble Gd).<sup>5–7</sup> It is also known that Gd washout exists but is not complete.<sup>7–9</sup> Electron microscopy (EM), associated with spectroscopic techniques, is a highly sensitive and specific tool for localizing and characterizing exogenous metals in biologic structures.<sup>10</sup> McDonald et al<sup>11</sup> identified Gd deposits in the dentate nucleus of postmortem patients who received 4 to 29 injections of gadodiamide, reportedly in the endothelial wall of blood vessels and in the interstitium as well. Recently, the same team found insoluble Gd deposits within the nucleus of neuronal cells from the dentate nucleus of 2 gadodiamide-treated patients.<sup>12</sup> In rats, insoluble Gd deposits were observed in the wall of blood vessels in the region of the lateral (dentate) cerebellar nuclei after repeated administrations of gadodiamide (2 months after the last injection).<sup>13</sup> Another study also found insoluble Gd deposits also in the interstitium after administrations of gadodiamide, gadobenate, and gadobutrol, but not gadoteridol, using the same administration protocol.<sup>14</sup>

To provide detailed information complementing these observations, we investigated Gd cerebellar tissue presence in a comparative study (saline/macrocylic GBCA gadoterate/linear GBCAs gadobenate and gadodiamide), in rats that received 20 repeated injections, and sensitized by moderate renal impairment to be translational to a common clinical condition<sup>15</sup> and to increase the sensitivity of the model.<sup>4,16</sup> In addition to the deep cerebellar nuclei (DCN), the granular layer of the cerebellar cortex and choroid plexus of the fourth ventricle were studied because these specific structures are also prone to store Gd, according to laser ablation–inductively coupled plasma–mass spectrometry data,<sup>13</sup> and, to our knowledge, have never been investigated by EM so far.

The aims of this study were to investigate in depth, by multimodal imaging techniques, the possible presence, ultrastructural morphology, precise localization, shape, and co-location with endogenous elements of Gd deposits in various areas of interest in the rat cerebellum, after repeated administration of GBCAs, and to build a hypothesis for the distribution and behavior of these molecules in the central nervous system.

Received for publication April 11, 2018; and accepted for publication, after revision, April 24, 2018.

From the \*Guerbet Research and Innovation Department, Aulnay-sous-Bois; †Institut Curie, INSERM U1196; ‡Université Paris Sud, Université Paris-Saclay; PSL Research University, Orsay, France; and §Institute of Pathology, University Regensburg, Regensburg, Germany.

Conflicts of interest and sources of funding: M.R., A.E., N.F., J.M.I., and C.C. were Guerbet Employee at the time of the study. University of Regensburg received funding from Guerbet within a common research project. This study was funded by Guerbet.

Correspondence to: Marlène Rasschaert, MS, Research and Innovation Department, Guerbet Group, BP57400, 95943 Roissy CDG Cedex, France. E-mail: marlene.rasschaert@guerbet.com.

Copyright © 2018 The Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

ISSN: 0020-9996/18/5309-0518

DOI: 10.1097/RLI.0000000000000490

## MATERIALS AND METHODS

All animal experiments were conducted in compliance with the European Union Directives 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

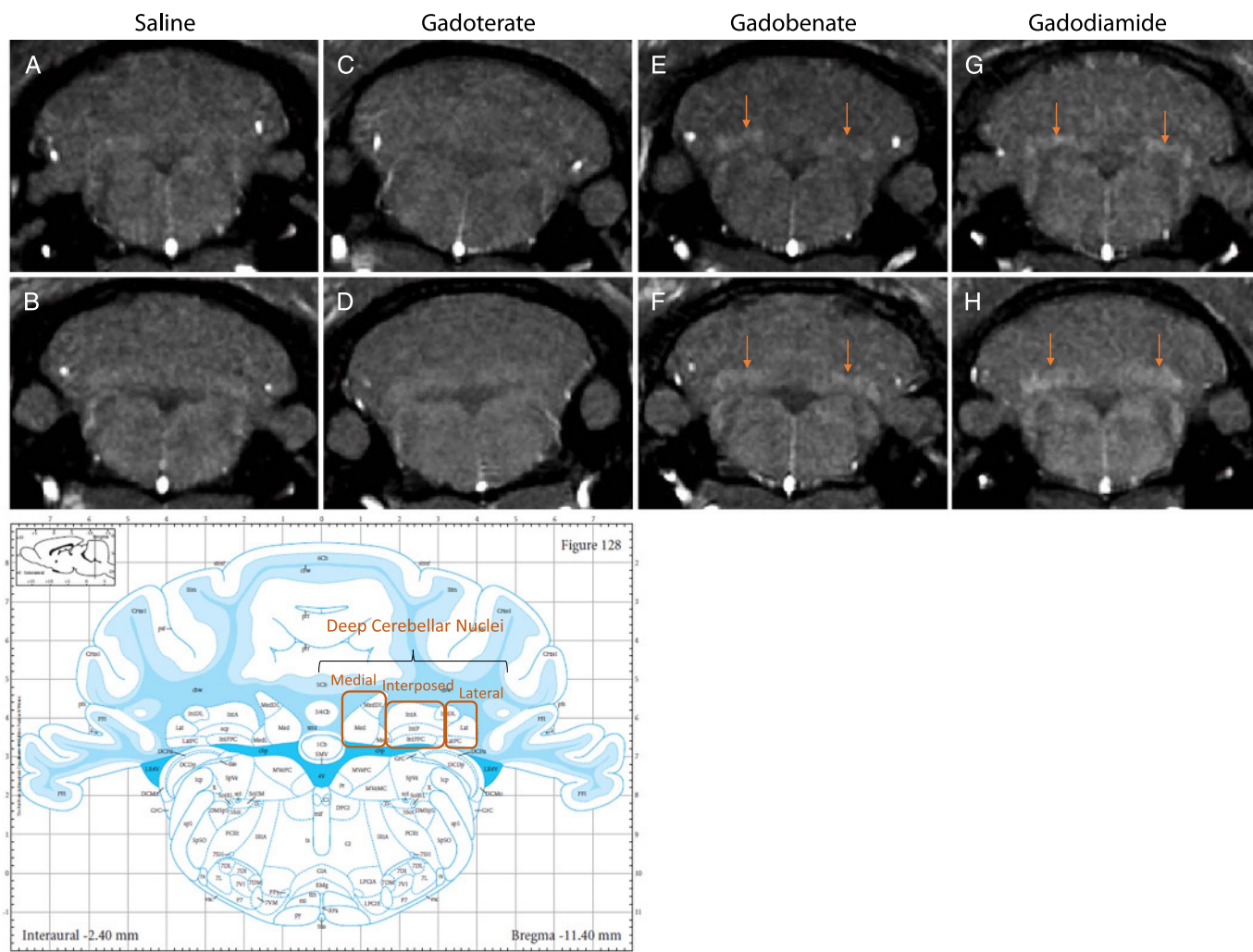
### Study Design

This is an ancillary study of a previously published investigation.<sup>4</sup> Female Sprague-Dawley rats (SPF/OFA rats; Charles River, L'Arbresle, France), 5/6th subtotally nephrectomized 2 weeks earlier, received 20 intravenous injections of 0.6 mmol Gd/kg (1.2 mL/kg) of the commercial forms of gadoterate (macrocyclic and ionic GBCA, Dotarem; Guerbet, Villepinte, France), gadobenate (linear and ionic GBCA, Multihance; Bracco Imaging, Milan, Italy), gadodiamide (linear and nonionic GBCA, Omniscan; GE Healthcare, Chalfont St Giles, United Kingdom), or 1.2 mL/kg of 0.9% saline solution (CDM Lavoisier, Paris, France) under isoflurane (IsoFlo; Axience, Pantin, France) anesthesia. The intravenous injections were performed in the tail once a day, 4 days a week for 5 weeks. The 0.6 mmol Gd/kg dose corresponds to the clinical dose (0.1 mmol Gd/kg) adjusted for the body surface area of the rat species, according to Food and Drug Administration guidelines.<sup>17</sup> An injection-free period of one month was applied after the last injection.

Two rats per group were randomly extracted from a larger cohort (8 rats/group) for dedicated transmission electron microscopy (TEM)/electron energy loss spectroscopy (EELS) examinations. Regarding the other animals, total Gd measurement was performed in brain structures.<sup>4</sup> Then, the animals were anesthetized using 5% isoflurane and exsanguinated, with a 4% formalin solution for perfusion. The cerebellum was subsequently harvested, and placed in Karnovsky medium (2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, 0.1 M cacodylate buffer). Group assignment was randomized, and the whole study was carried out blindly.

### Magnetic Resonance Imaging Examination

Magnetic resonance imaging (MRI) was performed at completion of the study (ie, one month after the last injection) in anesthetized animals (isoflurane), using a dedicated phased-array quadrature head coil in a gradient/shims insert B-GA 12S HP (660 mT/m intensity and 4570 T/m/s maximum slew rate) on a 4.7 T preclinical magnet (Biospec 47/40; Bruker). The MRI examination consisted of a T1-weighted 2D FLASH (repetition time/echo time, 50/1.78 milliseconds; 48 averages; in-plane resolution,  $164 \times 164 \mu\text{m}^2$ ; slice thickness, 700  $\mu\text{m}$ ; acquisition time, 6 mn 36 seconds), targeted only on the cerebellum (11 slices). The examination was performed by a single investigator in blinded conditions.



**FIGURE 1.** T1-weighted MRI (4.7 T) examination of the animals analyzed by TEM, after an injection-free, washout period of one month, in the plane containing DCN, and associated atlas (copyright Elsevier Inc, with permission).<sup>23</sup> A T1 hypersignal was visible in the DCN of rats from the gadobenate (E–F) and gadodiamide groups (G–H) (arrows), but not in the saline (A–B) and gadoterate (C–D) groups.



## Transmission Electron Microscopy

First, the fixed cerebellums were cut into the 2 hemispheres, and 1.5-mm thick slices were cut out of the specimens. Square pieces (~2 mm<sup>3</sup>) were removed from the choroid plexus, the DCN, and the granular layer of the cerebellar cortex. Two specimens of each cerebellum area were used for embedding. All samples were post-fixed with osmium tetroxide for 2 hours. After dehydration, the samples were infiltrated with EPON resin via an automated tissue processor (LYNX; Leica Reichert, Wetzlar, Germany). The processed material was transferred into EPON resin (EMBed812; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), which was polymerized at 60°C for 2 days. The EPON resin blocks were cut in semithin (0.75 μm) sections with an ultramicrotome, and double-stained with toluidine blue and basic fuchsin for orientation. Areas of interest were identified with the help of the light microscope. Ultrathin sections (80 nm) of the marked structures were prepared. Finally, the sections were stained with uranyl acetate and lead citrate.

## Energy-Filtered Transmission Electron Microscopy and Electron Energy Loss Spectroscopy

Transmission electron microscopy (zero-loss mode) observations were performed on 80-nm conventionally stained ultrathin sections. Parallel EELS in spot- or TEM-modes (Zeiss LEO 912AB Oberkochen, Germany; iTEM software package OSIS, Muenster, Germany) was used to analyze suspicious electron-dense deposits for the presence of Gd, or, occasionally, other elements (N, O, Ca). Gadolinium produces a characteristic loss of electron energy at the M<sub>4,5</sub> edge at 1185 eV. The spatial distribution of the elements was mapped by energy-filtered transmission electron microscopy applying the 3 windows method, using inelastically scattered electrons with element-specific energy loss (electron spectroscopic imaging) as described elsewhere.<sup>18</sup>

## Blinded Semiquantification of Gd-Deposits Among the Groups

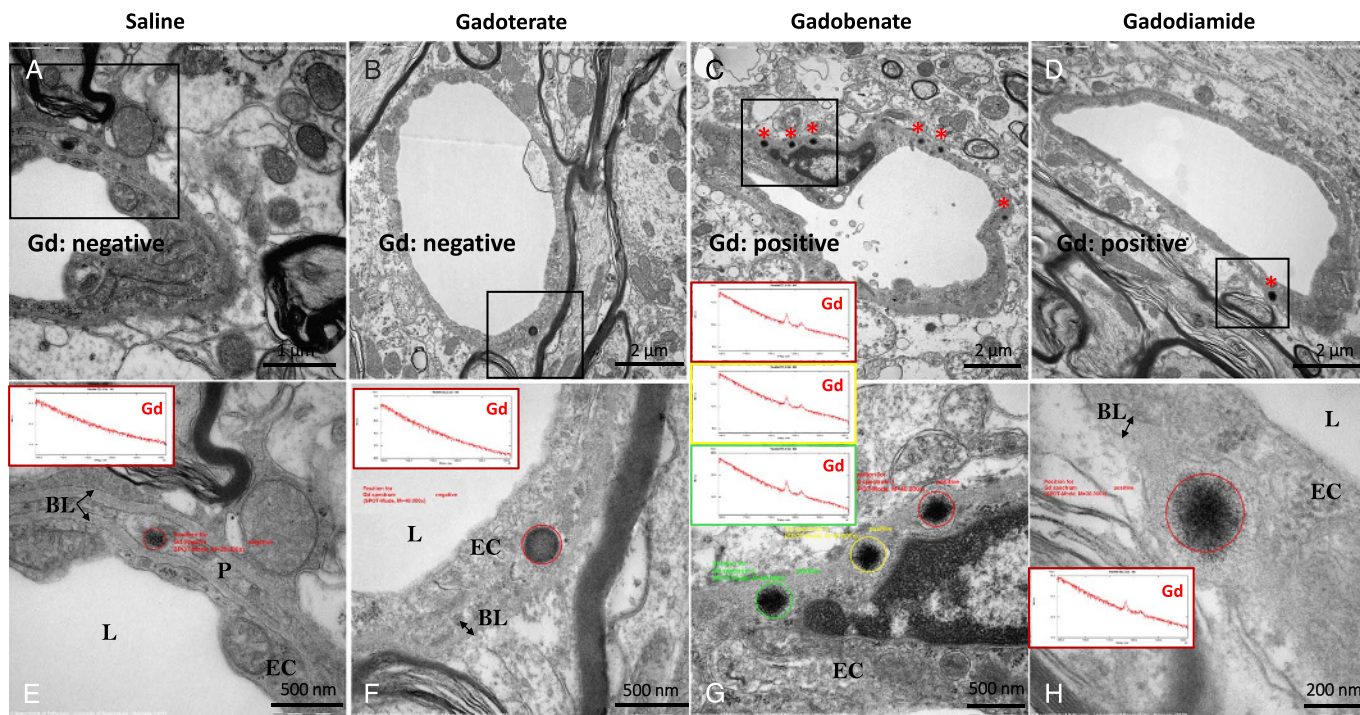
Subsequent to the blinded qualitative analysis, a blinded semi-quantitative analysis was performed to investigate all the samples, which were 24 in total (3 locations in 2 animals of each of the 4 groups). Randomly chosen cells (neurons and glial cells) (n = 10) and blood vessels (n = 10) were analyzed for each rat and each area of interest (ie, choroid plexus, DCN, and granular layer of the cerebellar cortex). This number was chosen to ensure that the whole number of analyzed cells, and vessels came from 1 section to prevent a bias in quantification due to the use of serial sections. With that approach in 23 of 24 sections, we reached the number of cells and vessels that should be analyzed semiquantitatively.

Furthermore, the entire interstitium of the analyzed field was evaluated. For the evaluation of the blood vessels, the entire basal lamina was investigated. In an overview (TEM magnification was 1250), the number of blood vessels determined the total number of investigation fields (grid meshes).

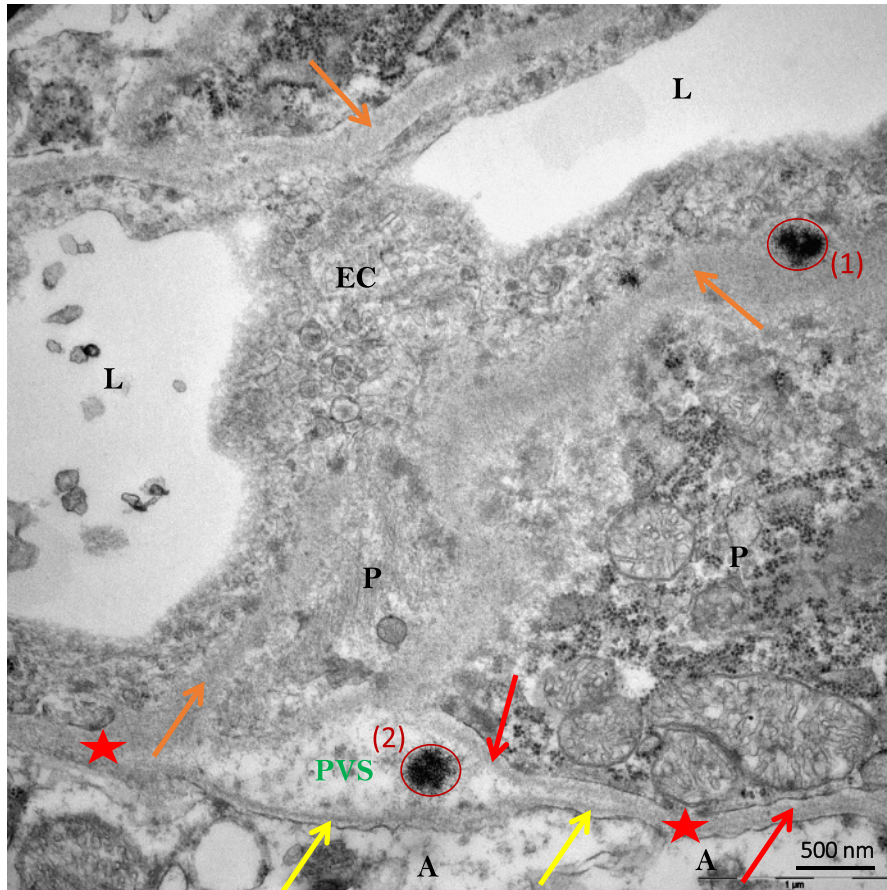
## High-Spatial Resolution Secondary Ion Mass Spectroscopy (NanoSIMS)

After TEM/EELS study, to characterize the presence of phosphorous, iron, and sulfur in the deposits and pigment aggregates, one grid with DCN area in the gadodiamide group was further studied by NanoSIMS. High spatial resolution SIMS imaging was carried out on the same area of interest observed by TEM, using a NanoSIMS-50 Ion microprobe (CAMECA, Gennevilliers, France) operating in scanning mode.<sup>19</sup>

A tightly focused Cs<sup>+</sup> primary ion beam was directed at the sample surface to trigger the secondary ion emission. With the primary beam stepping over the surface of the sample, images of the selected ion species were generated. In the present work, 5 secondary ion species (<sup>12</sup>C<sup>-</sup>, <sup>12</sup>C<sup>14</sup>N<sup>-</sup>, <sup>32</sup>S<sup>-</sup>, <sup>31</sup>PO<sub>2</sub><sup>-</sup>, and <sup>56</sup>FeO<sup>-</sup>) were monitored in parallel.



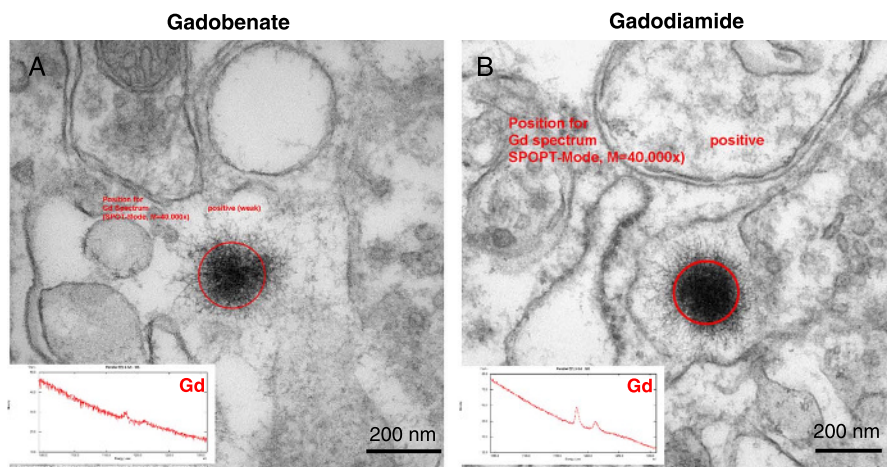
**FIGURE 2.** Gd-containing deposits in sea urchin-shaped spheroidal inclusions (asterisks) observed intramembranously in the basal lamina of vessels in the DCN of rats that received gadobenate (panels C and G) and gadodiamide (panels D and H). In the gadoterate (panels B and F) and saline (panels A and E) groups, the electron-dense structures sporadically observed in the vessel wall never displayed the characteristic sea urchin shape, were not located in the basal lamina, and were always negative for Gd when analyzed by EELS. BL indicates basal lamina; EC, endothelial cell; L, Lumen of the microvessel; P, pericyte.



**FIGURE 3.** Sea urchin-like, spheroid-shaped Gd deposits (red circles) localized in the basal lamina (1) and in the perivascular (also known as Virchow-Robin) space (2) (DCN of a gadodiamide-treated rat). A indicates Astrocyte end-feet; BL, basal lamina (yellow arrows = BL of glia limitans; orange arrows = unified basal lamina of endothelial cell and pericyte adluminal side; red arrow = basal lamina of one pericyte abluminal side; red stars = BL coalescence of glia limitans and pericyte or of endothelial cell); EC, endothelial cell; L, lumen of vessel; P, pericyte; PVS, perivascular (also known as Virchow-Robin) space.

After careful Cs<sup>+</sup> ion implantation to achieve steady-state ion emission, acquisition was carried out using multiframe mode. The primary beam intensity was in the order of 0.3 pA, and the field of view was around 10 μm with an image size of 256 × 256 pixels, and a dwell time of

0.5 milliseconds per pixel, from 100 to 300 frames. Image processing was performed using ImageJ software.<sup>20</sup> First, multiframe images were properly aligned using the TomoJ plugin with <sup>12</sup>C<sup>14</sup>N<sup>-</sup> images as reference before a summed image was obtained for each ion species.<sup>21</sup>



**FIGURE 4.** Typical sea urchin-like, spheroid-shaped deposits observed in the interstitium of the DCN of rats treated with gadobenate (A) and gadodiamide (B). In the gadobenate and saline groups, no deposits were found in the interstitium (data not shown).



The  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  image then served as a reference for correlation with the high-resolution TEM image of the same region using the TurboReg plugin.<sup>22</sup>

## RESULTS

### Magnetic Resonance Imaging

After repeated injections followed by an injection-free period of one month period, a T1 hypersignal was observed in the DCN only in all rats treated with gadobenate and with gadodiamide, but not in the DCN of gadoterate- and saline-treated rats (Fig. 1).

### Electron Microscopy and NanoSIMS Examinations

Electron energy loss spectroscopy–characterized, Gd-positive electron-dense deposits were observed intramembranously in the basal lamina of blood microvessels, in the DCN of all rats that received gadobenate and gadodiamide, and in the granular layer of the cerebellar cortex of gadodiamide-treated rats (Fig. 2). No Gd deposits were found in the endothelial cells, regardless of the treatment or the structure examined. These Gd-positive deposits had a characteristic spheroid shape and morphology resembling a spiny “sea urchin,” approximately 300 nm in diameter with 2-nm wide spines, forming a meshwork-like structure. Insertion or formation of those deposits frequently produced a local deformation and hump-like thickening of the basal lamina. Singularly, Gd deposits were observed in the vessel wall in a space between 2 basal laminae consistent with the perivascular Virchow-Robin space (Fig. 3).<sup>24</sup> Similar Gd deposits were observed in the interstitium of the DCN in all rats that received gadobenate and gadodiamide (Fig. 4). Detailed EELS analysis of Gd sea urchins spheroids revealed heterogeneous

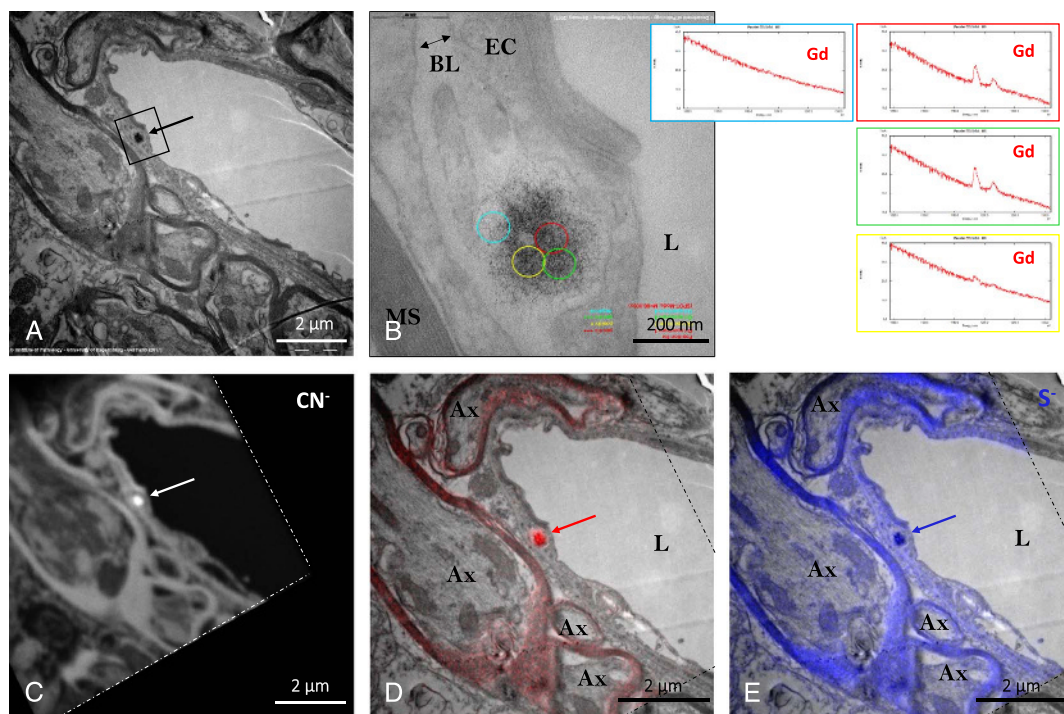
presence of Gd (Fig. 5). Copresence of Ca, N, and O was also occasionally detected in the deposits (data not shown). Such typical Gd-positive deposits were never observed in the samples from the gadoterate and saline groups.

NanoSIMS analysis revealed the presence of a high content of phosphorous in the sea urchin deposits (as well as in the myelin sheaths, rich in phospholipids), together with the presence of sulfur in scarce amounts (Fig. 5). Conversely, no iron copresence was evidenced in the Gd deposits.

Gadolinium was also identified in membrane-bound electron-dense pigment aggregates, located in the glial cells of the DCN, for the 2 linear GBCAs groups (Fig. 6). Only a few of these analyzed pleomorphic intracellular inclusions were positive for Gd. These positive signals consisted of small electron-dense dots, which were inhomogeneously distributed.

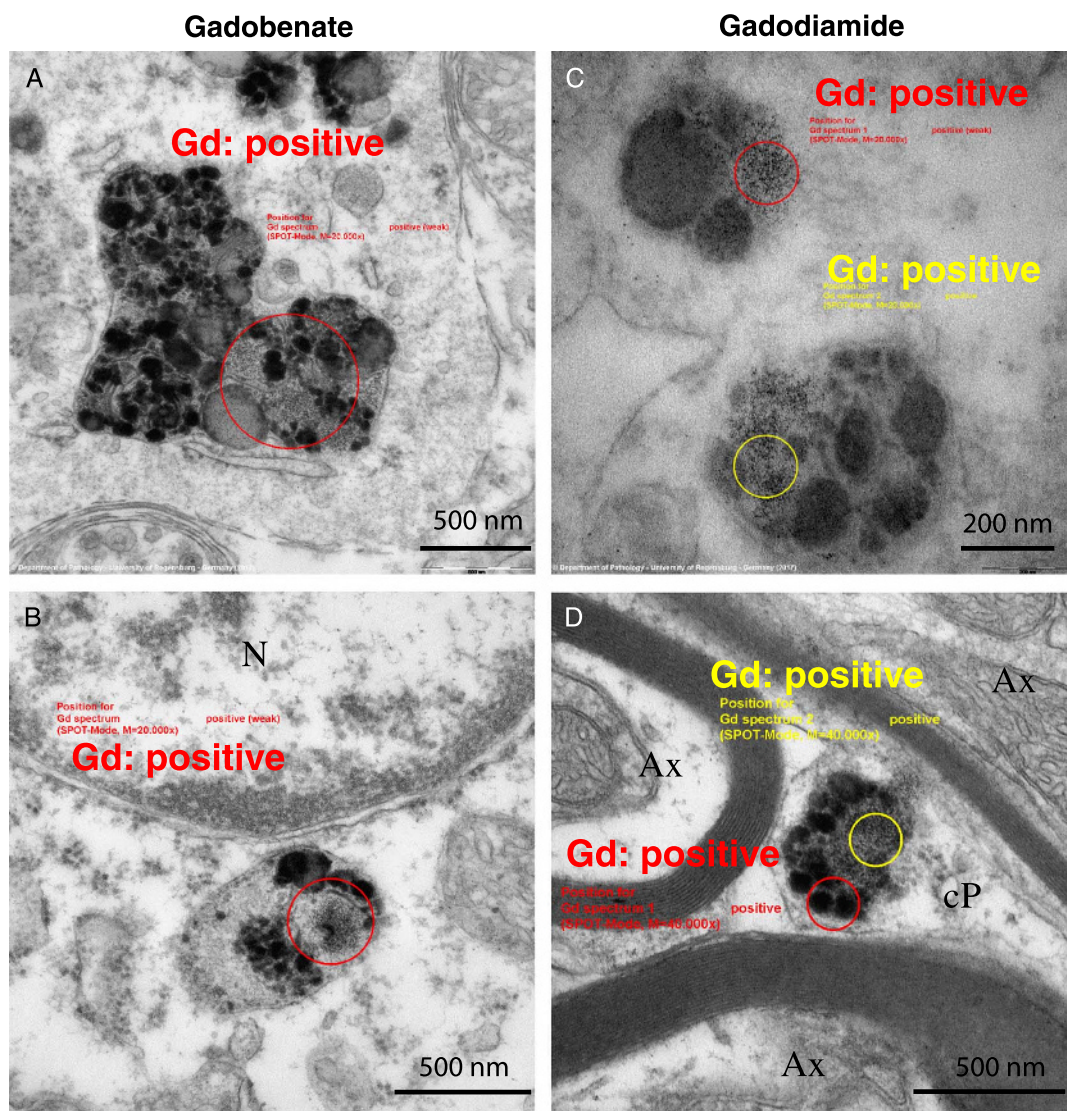
NanoSIMS analysis revealed that, whatever the Gd content, they were, in proportion, more rich in sulfur than its environment, which is a characteristic of lipofuscin, compatible with their ultrastructural aspect (amorphous electron-dense material and lipid droplets). Phosphorous was also sometimes identified in some of the aforementioned aggregates, with quite a good correlation with the location of Gd (Fig. 7).

In the choroid plexus, Gd deposits were identified in fibrocyte-like cells, in the interstitium located perivascularly between the basal lamina of a venule, and in the epithelial basal lamina of a choroid plexus, in 2 rats from the gadobenate group and in 1 rat from the gadodiamide group. In these fibrocyte-like cells, Gd was found to be associated with membrane-bound pigments (likely lipofuscin) (Fig. 8, A and B). Furthermore, in the gadodiamide treated group, a Gd-positive structure was found in the basal lamina of a blood vessel (Fig. 8, E and F); and in 1 case, EELS analysis identified Gd associated with a dark, roundish inclusion,



**FIGURE 5.** A, Typical sea urchin–like, spheroid-shaped deposits (arrow) in the DCN of a gadodiamide-treated rat. B, Higher magnification of this deposit showed its precise location in the basal lamina confluence of a microvessel, and EELS suggested heterogeneous Gd distribution (as shown in the adjacent spectra). C,  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  (carbon-nitrogen group) image of the analyzed area (delimited by dashes, NanoSIMS chemical mapping), showing high  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$  content in the Gd deposit (arrow); D, overlay of P (red, NanoSIMS) and TEM (gray) images, showing that this characteristic Gd deposit was rich in phosphorus (arrow); E, overlay of sulfur (blue, NanoSIMS) and TEM (gray) images showing that this Gd deposit was also rich in sulfur. Ax indicates axon; BL, basal lamina; EC, endothelial cell; L, lumen of the vessel; MS, axon myelin sheaths.





**FIGURE 6.** Ultrastructure and EELS analysis results of Gd associated with intracellular membrane-bound pigment inclusions, in the DCN of rats that received gadobenate (A and B) and gadodiamide (C and D). Gd was never detected by EELS in pigment inclusions in rats from the gadoterate and saline groups (data not shown). Ax indicates axon; cP, cell protrusion; N, nucleus.

which was located in a fold of the basal lamina of the choroidal epithelium (Fig. 8, C and D). No Gd deposits were identified inside the choroid plexus epithelial cells. A summary of all Gd-related findings in the examined cerebellar areas are presented in Table 1.

### Semiquantification

No Gd was observed in the gadoterate cerebellar samples, or in the control samples. Conversely, Gd deposits were observed in the gadobenate and gadodiamide groups, in the different areas observed (Table 1). The term “other” relates to cell processes, which did not formally allow cell identification in the DCN (as in Fig. 6D).

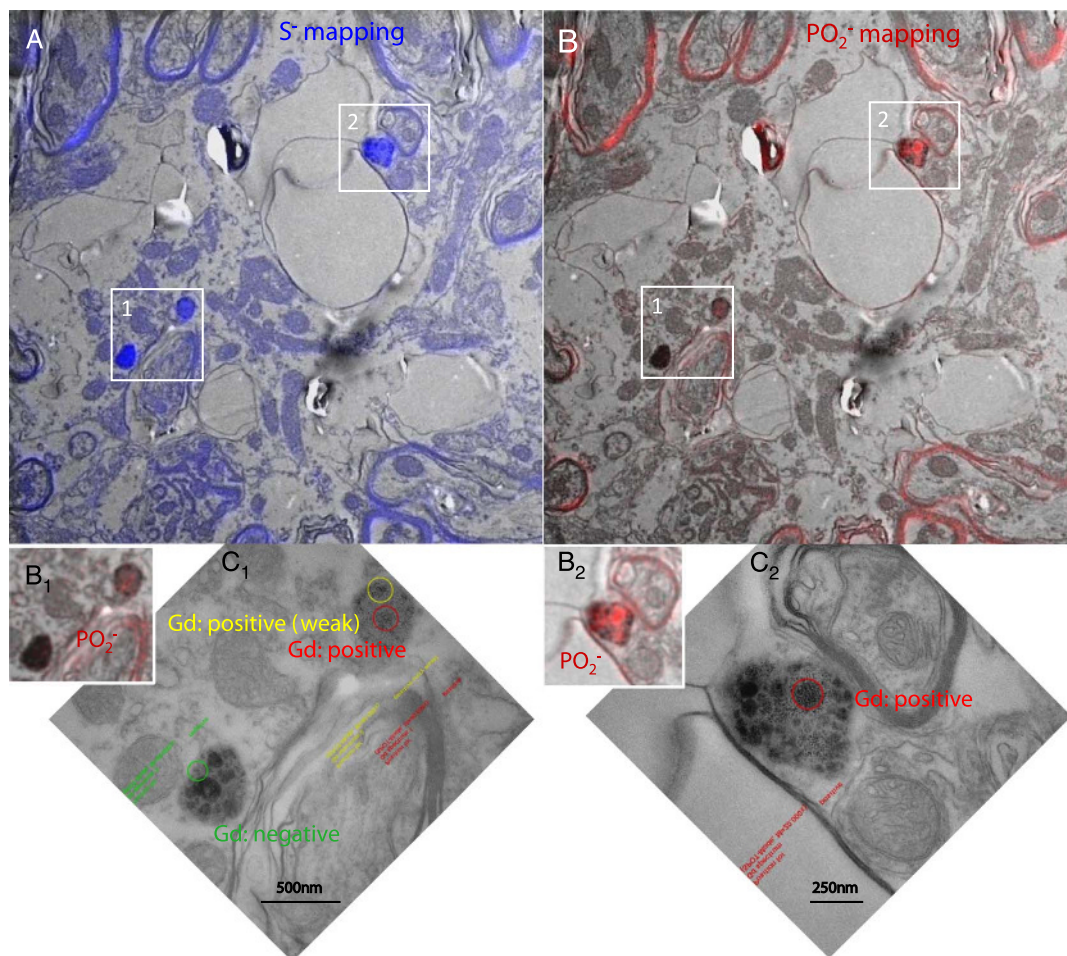
The summary of all of the observations, during qualitative and semiquantitative analyses (Gd presence and location), is presented in Table 2.

### DISCUSSION

This study was carried out on rats with moderately impaired renal function, corresponding to a sensitized population frequently exposed to

contrast-enhanced MRI examinations.<sup>15,16</sup> It was an exploratory and hypothesis-generating study.<sup>25</sup> Our investigation reveals the presence of insoluble Gd species under distinct profiles in the cerebellum of rats. The preparation for the EM examination would likely washout soluble entities from the samples.<sup>26</sup> This strongly suggests that all the Gd species observed with this technique are in the insoluble form, corresponding to the precipitated part not recovered by the methods used in biospeciation studies.<sup>5,6</sup>

Most of the Gd deposits revealed, at high-power magnification, a spheroid shape resembling a sea urchin, with a mesh-like fine filamentous substructure. Similar globular deposits (without dissecting their internal ultrastructure) have been already described in other clinical<sup>11,12</sup> and nonclinical<sup>13,14</sup> studies. These Gd deposits were identified in the basal lamina of cerebellar microvessels, in the perivascular Virchow-Robin space, for the first time to our knowledge, and in the interstitium as well. Unlike what was suggested by other studies,<sup>13,14</sup> these Gd deposits were never observed into endothelial cells. Unlike a postmortem clinical study in gadodiamide-treated subjects,<sup>12</sup> no Gd deposits were



**FIGURE 7.** Correlative imaging by TEM and NanoSIMS of Gd-positive pigments (areas 1 and 2) examined by EELS (C1 and C2: higher magnification of areas 1 and 2, respectively), in the DCN of a rat from the gadodiamide group. These pigments were found, by NanoSIMS, to be rich in sulfur (A), consistent with the hypothesis that they are lipofuscin pigments. Presence of P was observed in some parts of the pigments (B1, B2), coinciding with Gd-positive areas observed by EELS (C1, C2, respectively).

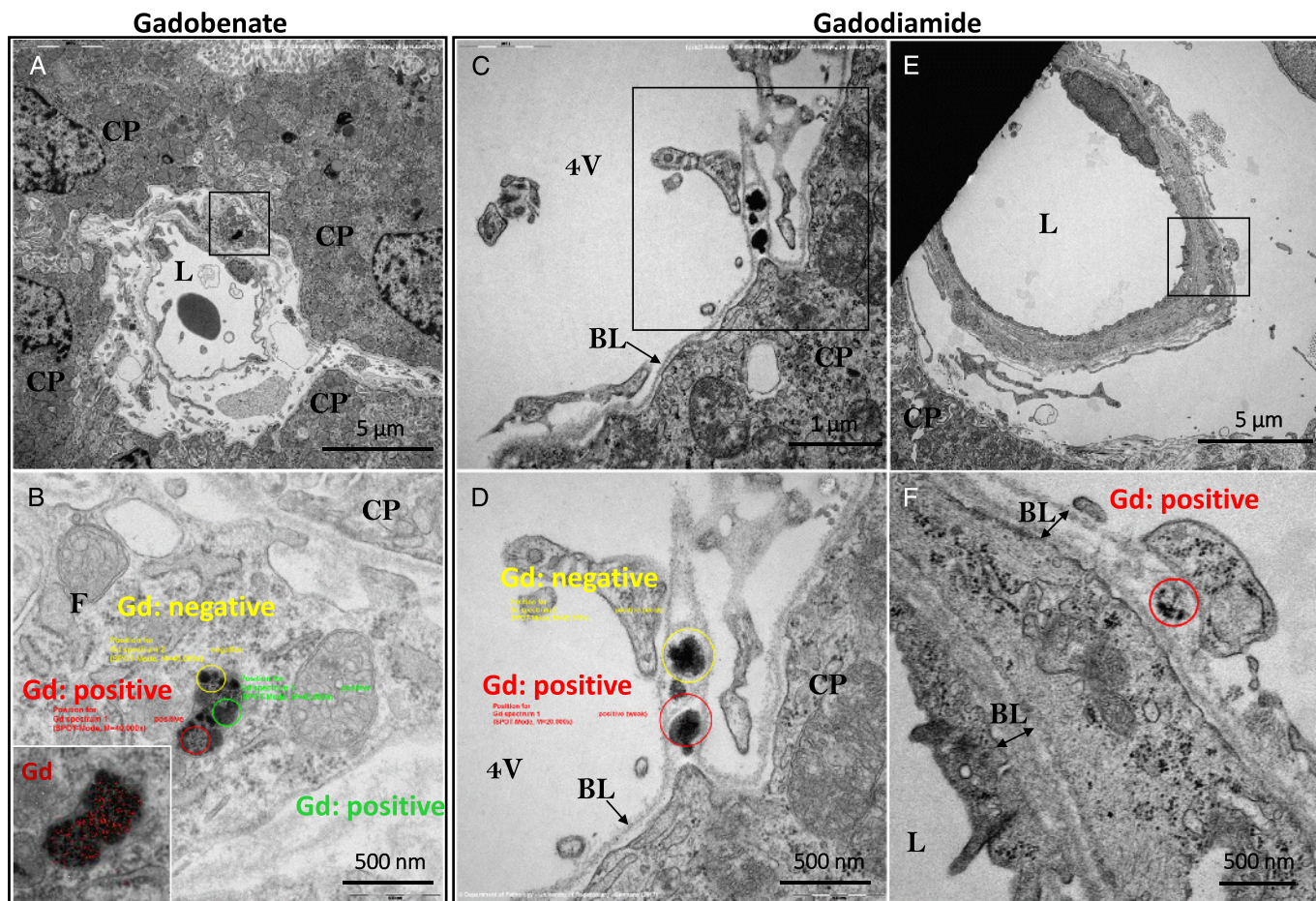
observed in the nucleus of neuronal cells in our conditions. No insoluble Gd species was observed in the cerebellar tissues of rats treated with the macrocyclic GBCA gadoterate, possibly because this chelate does not dissociate *in vivo*, due to its higher thermodynamic and kinetic stabilities.<sup>27</sup> The electron-dense structures that were sporadically observed and presented as negative examples for saline and gadoterate-treated rats (Fig. 2, E and F) did not display this typical sea urchin shape, were not located into the same substructures (basal lamina or interstitium), and, above all, were negative when tested by the EELS technique. No Gd deposits were observed in the granular layer of rats that received gadobenate. This may be consistent with the lower Gd concentrations found in the cerebellar cortex of rats treated with this GBCA, compared with the DCN or to the same areas in the gadodiamide group.<sup>16</sup>

We used the NanoSIMS technique to perform a chemical mapping of the elements of interest. This technique is based on the impact of a primary ion beam (in our case, Cs+) focused on the surface of the cerebellar sample, which results in the generation of particles ejected from the sample surface. Of the emitted particles, some end up as secondary ions. These secondary ions are subsequently collected and directed to a mass spectrometer. Parallel detection simultaneously counts the ions corresponding to preselected masses from the same microvolume sampled by the probe. This results in a chemical mapping of the area of interest.<sup>28</sup>

The NanoSIMS technique revealed that the spheroidal sea urchin Gd deposits were rich in phosphorous, consistent with the hypothesis of a Gd storage in the form of insoluble  $GdPO_4$ . It is likely that these insoluble Gd species are not responsible for T1 signal enhancement.<sup>5</sup> However, because these Gd deposits appear to be a mesh-like, porous structure, the water accessibility also to the interior of the deposit may exist. Even if this is a  $GdPO_4$ -like structure, the possibility of some T1 relaxivity effect cannot be totally ruled out. Neither TEM/EELS nor NanoSIMS techniques revealed the presence of Fe associated with the Gd deposits. Conversely, other elements (N, O, and Ca) were detected, and high  $^{12}C^{14}N^-$  (carbon-nitrogen) content was evidenced by NanoSIMS. The sea urchin-shaped structures seemed heterogeneous as regards the presence of Gd in their meshwork, suggesting that Gd is associated with a filamentous structure unknown yet. Morphologically similar mesh-like Gd-positive formations in this case associated with collagen fibers were observed in the dermis of rats treated with gadodiamide.<sup>29</sup>

Interestingly, gradual formation of similar sea urchin resembling structures has been described after exposure of lanthanides oxides (including  $Gd_2O_3$ ) to phagolysosomal-simulated fluid.<sup>30</sup> Elemental characterization of these deposits by energy dispersive x-ray revealed the copresence of phosphorus. The lanthanide salts were assumed to be a hexagonal rhabdophane polymorph of the lanthanide orthophosphates.<sup>30</sup>





**FIGURE 8.** Examples of Gd-positive inclusions detected in the choroid plexus area. A, Topology of a perivascular fragment of a circulating fibrocyte-like cell bearing a lipofuscin-like pigment inclusion; note its localization in the interstitial space between the blood vessel and the epithelial choroidal cells (gadobenate group). C, Overview displaying pleomorphic non-membrane-bound electron-dense inclusions found in a basal lamina fold of the choroidal epithelium (gadodiamide group). E, Location of a partial spheroid, sea urchin-like structure found in the basal lamina of a pericyte (gadodiamide group). B, D, and F, Higher magnification of the inclusion (in panels A, C, and E, respectively) displaying the areas selected for EELS analysis. Insert in B, electron-dense lipofuscin inclusion with electron spectroscopic imaging-mapped Gd distribution (red). Insert in B, Gd mapping by electron spectroscopic imaging on the membrane-bound lysosomal lipofuscin inclusion (higher magnification). BL indicates basal lamina; CP, choroid plexus epithelial cell; F, circulating fibrocyte-like cell; L, lumen of the venule; 4 V, fourth ventricle.

Intracellular Gd was also found in linear GBCAs groups in glial cells (identified as astrocytes), associated with membrane-bound pigment inclusions. These pigment aggregates were characterized as lipofuscin because of their typical ultrastructural features (homogeneous lipid vacuoles surrounded by, or adjacent to, a coarse or fine electron-dense matrix)<sup>31</sup> and the high local amount of sulfur.<sup>32</sup> In the brain of old rats, the range of dimensions of lipofuscin pigments is generally 0.5 to 3  $\mu\text{m}$ .<sup>31,33</sup> Moreover, they cannot be confused with neuromelanin because the latter is found only in catecholaminergic neurons<sup>34</sup> and never reported in rat cerebellum, to our knowledge. Indeed, fluorescence microscopy would allow to firmly confirm this conclusion. We believe that this is the first time this association between Gd and a pigment (likely lipofuscin) is evidenced. Lipofuscin is an undegradable, autofluorescent, ubiquitous pigment polymer. It is a byproduct of the macroautophagy pathway where autophagic vacuoles engulf intracellular components to later fuse with lysosomes to degrade their constituents.<sup>35</sup> Lipofuscin consists of an aggregate of oxidized proteins (30%–70%), lipids (20%–50%), bound sugar residues (from the fifth decade of life in humans), and acidic residues of hydrolysis.<sup>35,36</sup> Its number increases with aging, and it is principally located in the neurons and glial cells of those areas involved in motor functions. Lipofuscin deposition has been reported in the neurons of the human

dentate nucleus.<sup>36</sup> Lipofuscin aggregates are known to be rich in transition metals, such as Zn, Cu, Mn, Ca, and especially Fe.<sup>37</sup> In our conditions, however, the presence of Fe was not evidenced by the NanoSIMS technique. It is admitted that lipofuscin is cytotoxic because of its ability to incorporate redox-active transition metals, its ability to catalyze the Fenton reaction, and thus its ability to generate the formation of free radicals. In addition, lipofuscin can inhibit the degradation of oxidized proteins by competitively binding to the proteasome.<sup>35,36</sup> Qualitatively, no difference was observed as regards to the number of lipofuscin pigments among the groups (data not shown). Reasons for the gadolinium association with intracellular lipofuscin pigments remain unclear. Local and systemic neurotoxicity remains to be investigated in depth at the ultracellular level.

Regarding Gd associated with lipofuscin, co-location was sometimes observed with phosphorus as well, but it seems difficult to draw firm conclusions at this stage.

Our findings are consistent with the current hypothesis that all GBCAs access healthy brain tissues and are cleared through the glymphatic pathway.<sup>9,38–43</sup> Indeed, Gd deposits were found around choroidal venules (Fig. 8), where cerebrospinal fluid (CSF) is produced; between a microvessel basal lamina and the glia limitans, in the so-called Virchow-Robin space; in microvessels basal lamina; in

**TABLE 1.** Semiquantification: Incidence of Gd-Positive Findings

Structure / Location		Group #1 - SALINE		Group #2 - GADOTERATE		Group #3 - GADOBENATE		Group #4 - GADODIAMIDE	
		animal #39	animal #27	animal #35	animal #40	animal #23	animal #29	animal #28	animal #36
Choroid Plexus	Choroidal cells	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Choroidal BM	0	0	0	0	0	0	0	1
	Blood vessel BM	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/6*	0/10	1/10
	Fibrocyte-like cells (other)	0	0	0	0	0	1	0	1
Deep Cerebellar Nuclei	Intracellular	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10	0/10	1/10	0/10
	Interstitium	0	0	0	0	4	1	11	1
	Blood vessel BM	0/10	0/10	0/10	0/10	7/10	4/10	3/10	7/10
	Other	0	0	0	0	0	0	0	1
Granular Layer of the Cerebellar Cortex	Intracellular	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Interstitium	0	0	0	0	0	0	0	0
	Blood vessel BM	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10	2/10
	Other	0	0	0	0	0	0	0	0

\*: only 6 vessels were found in the investigated area.

BM : basal membrane ; “Other” relates to cell processes

Light yellow : single observation ; Light orange : few observations ; Dark orange : numerous observations

Interstitium and Other : observations performed in the areas selected for blood vessels and cells

the interstitium; and in glial cells. Therefore, with the exception of postcapillary perivenous space, Gd deposits were found at every stage of the glymphatic pathway. Before reaching the level of the capillaries, the CSF circulates along penetrating arterioles in the Virchow-Robin (or perivascular) space. This structure disappears at deeper levels and the basal laminae collapse.<sup>24</sup> We speculate that insoluble Gd deposits found in microvessels basal lamina could have been retained at this level, after circulating in the CSF along para-arterial channels. Another explanation would be that Gd circulating in the microvessel crossed the endothelium, and was retained in the basal lamina, possibly by interacting with the cerebrovascular matrix constituents.<sup>44</sup>

Some Gd must then have reached the interstitial fluid by convection, as proposed in the glymphatic system hypothesis.<sup>38–40</sup> Numerous Gd deposits were found in the interstitium. Finally, some Gd could enter glial cells, and possibly cleared as cellular waste material.<sup>36,45</sup>

The study was performed on the sensitized population of moderately renally impaired rats. One limitation may be that extrapolating the results to a healthy population is hazardous. In a previous study, it was shown that, in similar conditions, the Gd distribution profile was not qualitatively affected by renal impairment.<sup>16</sup> Total Gd concentrations in cerebrum and cerebellum were, however, increased in the case of renal failure.<sup>16</sup> Therefore, we assume that the distribution mechanism is similar in both conditions. In healthy rats, approximately 50% of the linear GBCA gadobenate is taken up by the hepatocytes, unlike gadodiamide and gadoterate that are exclusively excreted by the kidneys.<sup>46</sup> Therefore, in renally impaired rats, this phenomenon may underestimate the tissue Gd concentration for gadobenate. Another limitation of the study is that the techniques used here cannot determine the precise forms of Gd trapped in the brain tissues, even if it is very likely that the sample processing would have washed out all the soluble species of Gd.<sup>26</sup> Therefore, this study would address only the insoluble form of dissociated Gd. The size of the study group with 2 animals per group may seem small.

However, this semiquantification of Gd deposits on the ultrastructural level represents a proof of concept approach,<sup>25</sup> which allows a proper comparison of deposits after use of different GBCAs. Basically, 24 specimens were analyzed and quantified: for each animal, 3 cerebellar locations associated with the presence of Gd by laser ablation–inductively coupled plasma–mass spectrometry in rats<sup>13</sup> or by MRI in rats<sup>16</sup> and in patients with renal failure.<sup>47</sup> To reach a clear interpretation, we selected the number of 10 cells and 10 blood vessels per cerebellar location to ensure that this number could be found in a single section. In doing so, we made sure that specimens were compared in a single level, to prevent a bias due to serial sectioning. Our semiquantitative analysis fully confirmed the findings of the qualitative study and enabled the possibility to compare the presence of Gd deposits for 3 different GBCAs.

In conclusion, after repeated injections of linear Gd chelates, gadodiamide showed the most Gd-positive electron-dense deposits, followed by gadobenate. Most Gd-positive deposits were found in DCN, followed by choroid plexus and the granular cell layer of the cerebellar cortex. Gd deposits were found in different structures of cerebellar tissues: basal lamina of microvessels, Virchow-Robin (perivascular) space, interstitium, and in glial cells associated with lysosomal lipofuscin pigments. Most Gd deposits displayed a characteristic spheroidal sea urchin shape and consisted of a filamentous meshwork with inhomogeneous Gd distribution. These observations and the suggested glymphatic clearance pathway via the perivascular Virchow-Robin space need further studies for clinical relevance assessment.

No insoluble Gd deposits were observed in the cerebellums of rats treated with the macrocyclic GBCA gadoterate or saline.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank Prof Toshiaki Taoka (Nagoya University Hospital, Japan) for helpful discussions, and Dr Cédric Messaoudi and



TABLE 2. Summary of the Gd Related Findings Observed During the Study

Structure / Location		Group #1 - SALINE		Group #2 - GADOTERATE		Group #3- GADOBENATE		Group #4 - GADODIAMIDE	
		animal #39	animal #27	animal #35	animal #40	animal #23	animal #29	animal #28	animal #36
Choroid Plexus	Choroidal cells	No Gd found		No Gd found		No Gd found		No Gd found	
	Choroidal BM	No Gd found		No Gd found		No Gd found		No Gd found	Gd in roundish structure
	Blood vessel BM	No Gd found		No Gd found		No Gd found		No Gd found	Gd in roundish structure
	Other	No Gd found		No Gd found		Gd in lipofuscin In fibrocyte-like cell		No Gd found	Gd in lipofuscin In fibrocyte-like cell
Deep Cerebellar Nuclei	Intracellular	No Gd found		No Gd found		Gd in lipofuscin (glial cells)	No Gd found	Gd in lipofuscin (glial cells)	No Gd found
	Interstitium	No Gd found		No Gd found		Gd in sea urchin		Gd in sea urchin	
	Blood vessel BM	No Gd found		No Gd found		Gd in sea urchin		Gd in sea urchin	
	Other (cell processes)	No Gd found		No Gd found		No Gd found		No Gd found	Gd in lipofuscin
Granular Layer of the Cerebellar Cortex	Intracellular	No Gd found		No Gd found		No Gd found		No Gd found	
	Interstitium	No Gd found		No Gd found		No Gd found		Gd in sea urchin	No Gd found
	Blood vessel BM	No Gd found		No Gd found		No Gd found		Gd in sea urchin	
	Other	No Gd found		No Gd found		No Gd found		No Gd found	

BM : basal membrane  
 Orange : presence of Gd observed

Amandine Verguet (Institut Curie, Orsay, France) for their help in the definition of regions of interest for the NanoSIMS analyses.

REFERENCES

- Runge VM. Safety of the gadolinium-based contrast agents for magnetic resonance imaging, focusing in part on their accumulation in the brain and especially the dentate nucleus. *Invest Radiol.* 2016;51:273–279.
- Kanda T, Nakai Y, Oba H, et al. Gadolinium deposition in the brain. *Magn Reson Imaging.* 2016;34:1346–1350.
- Zhang Y, Cao Y, Shih GL, et al. Extent of signal hyperintensity on unenhanced T1-weighted brain MR images after more than 35 administrations of linear gadolinium-based contrast agents. *Radiology.* 2017;282:516–525.
- Rasschaert M, Emerit A, Fretellier N, et al. Gadolinium retention, brain T1 hyperintensity, and endogenous metals: a comparative study of macrocyclic versus linear gadolinium chelates in renally sensitized rats. *Invest Radiol.* 2018;53:328–337.
- Gianolio E, Bardini P, Arena F, et al. Gadolinium retention in the rat brain: assessment of the amounts of insoluble gadolinium-containing species and intact gadolinium complexes after repeated administration of gadolinium-based contrast agents. *Radiology.* 2017;285:839–849.
- Frenzel T, Apte C, Jost G, et al. 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.* 2017;52:396–404.
- Robert P, Fingerhut S, Factor C, et al. One year retention of gadolinium in the brain: comparison of gadodiamide and gadoterate meglumine in a rodent model. *Radiology.* 2018. In press.
- Smith AP, Marino M, Roberts J, et al. Clearance of gadolinium from the brain with no pathologic effect after repeated administration of gadodiamide in healthy rats: An analytical and histologic study. *Radiology.* 2017;282:743–751.
- Kanda T, Nakai Y, Hagiwara A, et al. Distribution and chemical forms of gadolinium in the brain: a review. *Br J Radiol.* 2017;90:20170115.
- Egerton RF. New techniques in electron energy-loss spectroscopy and energy-filtered imaging. *Micron.* 2003;34:127–139.
- McDonald RJ, McDonald JS, Kallmes DF, et al. Intracranial gadolinium deposition after contrast-enhanced MR imaging. *Radiology.* 2015;275:772–782.
- McDonald RJ, McDonald JS, Kallmes DF, et al. Gadolinium deposition in human brain tissues after contrast-enhanced MR imaging in adult patients without intracranial abnormalities. *Radiology.* 2017;285:546–554.
- Lohrke J, Frisk AL, Frenzel T, et al. 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.* 2017;52:324–333.
- McDonald RJ, McDonald JS, Dai D, et al. Comparison of gadolinium concentrations within multiple rat organs after intravenous administration of linear versus macrocyclic gadolinium chelates. *Radiology.* 2017;285:536–545.
- Stevens LA, Viswanathan G, Weiner DE. Chronic kidney disease and end-stage renal disease in the elderly population: current prevalence, future projections, and clinical significance. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010;17:293–301.
- Rasschaert M, Idée JM, Robert P, et al. Moderate renal failure accentuates T1 signal enhancement in the deep cerebellar nuclei of gadodiamide-treated rats. *Invest Radiol.* 2017;52:255–264.
- Food and Drug Administration. US Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry. Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. 2005. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM078932.pdf>. Accessed April 2, 2018.
- Schroeder JA, Weingart C, Coras B, et al. Ultrastructural evidence of dermal gadolinium deposits in a patient with nephrogenic systemic fibrosis and end-stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3:968–975.
- Guerquin-Kern JL, Wu TD, Quintana C, et al. Progress in analytical imaging of the cell by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS microscopy). *Biochim Biophys Acta.* 2005;1724:228–238.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9:671–675.
- Messaoudi C, Boudier T, Sanchez Sorzano CO, et al. TomoJ: tomography software for three-dimensional reconstruction in transmission electron microscopy. *BMC Bioinformatics.* 2007;8:288.
- Thévenaz P, Ruttimann UE, Unser M. A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans Image Process.* 1998;7:27–41.

23. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th ed. London, England: Elsevier-Academic Press; 2007.
24. Bacyinski A, Xu M, Wang W, et al. The paravascular pathway for brain waste clearance: current understanding, significance and controversy. *Front Neuroanat*. 2017;11:101.
25. Robert P, Frenzel T, Factor C, et al. Methodological aspects for preclinical evaluation of gadolinium presence in brain tissue: critical appraisal and suggestions for harmonization-A joint initiative. *Invest Radiol*. 2018;53:499–517.
26. Thakral C, Abraham JL. Gadolinium-induced nephrogenic systemic fibrosis is associated with insoluble Gd deposits in tissues: in vivo transmetallation confirmed by microanalysis. *J Cutan Pathol*. 2009;36:1244–1254.
27. Idée JM, Port M, Robic C, et al. Role of thermodynamic and kinetic parameters in gadolinium chelate stability. *J Magn Reson Imaging*. 2009;30:1249–1258.
28. Da Cunha MM, Trepout S, Messaoudi C, et al. Overview of chemical imaging methods to address biological questions. *Micron*. 2016;84:23–36.
29. Haylor J, Schroeder J, Wagner B, et al. Skin gadolinium following use of MR contrast agents in a rat model of nephrogenic systemic fibrosis. *Radiology*. 2012;263:107–116.
30. Li R, Ji Z, Chang CH, et al. Surface interactions with compartmentalized cellular phosphates explain rare earth oxide nanoparticle hazard and provide opportunities for safer design. *ACS Nano*. 2014;8:1771–1783.
31. Gilissen EP, Staneva-Dobrovski L. Distinct types of lipofuscin pigment in the hippocampus and cerebellum of aged cheirogaleid primates. *Anat Rec (Hoboken)*. 2013;296:1895–1906.
32. Quintana C, Wu TD, Delatour B, et al. Morphological and chemical studies of pathological human and mice brain at the subcellular level: correlation between light, electron, and nanosims microscopies. *Microsc Res Tech*. 2007;70:281–295.
33. Heinsen H. Lipofuscin in the cerebellar cortex of albino rats: an electron microscopic study. *Anat Embryol (Berl)*. 1979;155:333–345.
34. Fedorow H, Tribl F, Halliday G, et al. Neuromelanin in human dopamine neurons: comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2005;75:109–124.
35. Höhn A, Grune T. Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy. *Redox Biol*. 2013;1:140–144.
36. Gilissen EP, Leroy K, Yilmaz Z, et al. A neuronal aging pattern unique to humans and common chimpanzees. *Brain Struct Funct*. 2016;221:647–664.
37. Jung T, Bader N, Grune T. Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1119:97–111.
38. Jessen NA, Munk AS, Lundgaard I, et al. The glymphatic system. A beginner's guide. *Neurochem Res*. 2015;40:2583–2599.
39. Iliff JJ, Lee H, Yu M, et al. Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. *J Clin Invest*. 2013;123:1299–1309.
40. Eide PK, Ringstad G. MRI with intrathecal MRI gadolinium contrast medium administration: a possible method to assess glymphatic function in human brain. *Acta Radiol Open*. 2015;4:2058460115609635.
41. Jost G, Frenzel T, Lohrke J, et al. 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*. 2017;27:2877–2885.
42. Lee H, Mortensen K, Sanggaard S, et al. Quantitative Gd-DOTA uptake from cerebrospinal fluid into rat brain using 3D VFA-SPGR at 9.4 T. *Magn Reson Med*. 2018;79:1568–1578.
43. Taoka T, Jost G, Frenzel T, et al. Impact of the glymphatic system on the kinetic and distribution of gadodiamide in the rat brain: observations by dynamic MRI and effect of circadian rhythm on tissue gadolinium concentrations. *Invest Radiol*. 2018. [Epub ahead of print].
44. Joutel A, Haddad I, Ratelade J, et al. Perturbations of the cerebrovascular matrisome: A convergent mechanism in small vessel disease of the brain? *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36:143–157.
45. Porta EA. Pigments in aging: an overview. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;959:57–65.
46. Lorusso V, Arbughi T, Tirone P, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution in animals of gadobenate ion, the magnetic resonance imaging contrast enhancing component of gadobenate dimeglumine 0.5 M solution for injection (MultiHance). *J Comput Assist Tomogr*. 1999;23(Suppl 1):S181–S194.
47. Cao Y, Zhang Y, Shih G, et al. Effect of renal function on gadolinium-related signal increases on unenhanced T1-weighted brain magnetic resonance imaging. *Invest Radiol*. 2016;51:677–682.



### 3. Synthèse des résultats

L'analyse TEM des échantillons a été réalisée **en aveugle**. Un premier examen des échantillons, en vue d'une **description qualitative**, a été effectué. Ensuite, sachant mieux documenter la présence de dépôts de Gd caractérisés en EELS, une **approche semi-quantitative** a été menée. Dix vaisseaux, dix cellules et l'interstitium ont été analysés pour chaque rat et chaque zone d'intérêt. L'ensemble des événements (forme et localisation du Gd), ont été comptabilisés, par structure, en tant que reflet de l'importance relative de dépôts de Gd.

Dans certains échantillons, lors de l'analyse qualitative initiale, des structures électrons-denses, à l'**aspect épineux** en surface, que l'on appellera arbitrairement « **oursins** », ont été observées. Ces « oursins », d'environ 300 nm de diamètre, étaient toujours localisés dans la **lame basale de microvaisseaux**, et dans l'**interstitium des noyaux cérébelleux profonds**. L'analyse EELS a mis en évidence, à leur niveau, la **présence de Gd**. Ils correspondent donc à des amas de Gd, supposés insolubles. Ces dépôts de Gd présentent une structure filamenteuse, hétérogène, incluant aussi du phosphore, ce qui laisse penser à la présence de  $GdPO_4$  insoluble. Il est intéressant de noter que l'incubation d'oxyde de Gd,  $Gd_2O_3$ , dans du fluide phagolysosomal artificiel conduit à la formation progressive de structures insolubles morphologiquement similaires (Li, 2014).

L'analyse de **pigments intracellulaires** contenant des amas sombres, sans forme particulière, a également, dans de rares cas, révélé la présence de Gd. La distinction du Gd, au sein de ces structures, est cependant délicate.

L'observation de ces dépôts de Gd a été faite **dans toutes les structures étudiées** dans cette étude : DCN, couche granulaire, et plexus choroïdes du 4<sup>e</sup> ventricule. Cependant, dans ces derniers, les dépôts étaient plutôt de forme arrondie, et situés dans des replis de la lame basale de la veinule. Cette différence est peut-être la conséquence d'une différence dans la composition de lame basale, interagissant différemment avec le Gd.

L'analyse EELS des « oursins » a également permis d'identifier des éléments colocalisés avec le Gd : on y trouve ainsi de l'oxygène, de l'azote, du calcium, mais pas de fer, dans nos conditions expérimentales. La présence d'azote et de calcium laisse penser que le Gd, même s'il est précipité, pourrait être associé à une structure peptidique. De plus, le Gd au sein de l'oursin est hétérogène.

La levée de l'aveugle suite à l'analyse a révélé que les **dépôts de Gd** n'avaient été observés que dans les échantillons de rats ayant reçus les **deux chélates de Gd linéaires testés** : le gadobénate (uniquement dans les DCN, et dans un fibrocyte ou un macrophage circulant situé entre un microvaisseau et les cellules épithéliales des plexus choroïdes) et le gadodiamide (dans les 3 structures étudiées).

L'analyse par EDS, réalisée pour quantifier les espèces présentes dans les dépôts de Gd, ne s'est pas révélée suffisamment sensible et n'a donc pas permis la détection du Gd, sur des échantillons pourtant préalablement caractérisés en TEM. L'analyse fine de ces oursins avec cette technique n'a donc pas été poursuivie.

Le NanoSIMS, technique destructive de l'échantillon, a été réalisée à la suite de l'analyse TEM, sur un échantillon du groupe gadodiamide, afin de caractériser la nature des pigments contenant du Gd. Les éléments étudiés choisis ont été les suivants :  $^{12}C^-$ ,  $^{12}C^{14}N^-$ ,  $^{32}S^-$ ,  $^{31}PO_2^-$ , and  $^{56}FeO^-$ . Le soufre n'était pas analysable en EELS, et le pic d'énergie correspondant au phosphore était ambigu et non-exploitable. La **richesse en soufre** des pigments est venue soutenir l'hypothèse qu'il s'agissait de **lipofuscine** (Quintana, 2007). Ce pigment, non-dégradable, résulte de la phagocytose de débris cellulaires (mélange protéique et lipidique), et est trouvé en nombre croissant avec l'âge. Cependant, nous n'avons pas étudié ces pigments en microscopie de fluorescence, ce qui aurait apporté la démonstration quasi-certaine du fait qu'il s'agissait de lipofuscine (Georgakopoulou, 2013).



Alors que les DCN sont une zone bien connue pour leur richesse en fer (Popescu, 2009), aucune présence de  $\text{FeO}^-$  n'a été mise en évidence par cette technique.

Les pigments de lipofuscine contenant du Gd se sont avérés contenir aussi du phosphore, coïncidant avec la même zone d'accumulation du Gd au sein du pigment. Ceci suggère la présence de  $\text{GdPO}_4$  insoluble.

Des dépôts de Gd en forme d'oursin ont également été observés dans l'espace périvasculaire, situé entre les lames basales des vaisseaux et des pieds astrocytaires, qui plongent dans le parenchyme cérébral le long des artères et artérioles ainsi que le long des veines et veinules, comme décrit préalablement. Il serait un lieu de circulation du LCR, propulsé en profondeur grâce aux pulsations artérielles (Jessen 2015).

La localisation des différents dépôts de Gd semble cohérente avec une **circulation glymphatique** du Gd (où le LCR circule dans l'espace périvasculaire périartériel, et traverse le parenchyme avant de réintégrer l'espace péri-veineux), comme détaillé au chapitre 4/A de cette partie. Le Gd aurait alors précipité tout au long de ce parcours. Les éléments de notre étude qui sont compatibles avec cette hypothèse sont les suivants:

- On trouve des dépôts de Gd au niveau de la lame basale des plexus choroïdes (et des fibrocytes ou macrophages circulants), qui serait leur principale voie d'entrée, accédant ensuite dans tout le LCR ;
- Du Gd est retrouvé également piégé dans la lame basale endothéliale de microvaisseaux, ce Gd pouvant être d'origine sanguine (deuxième voie d'entrée possible), mais aussi périvasculaire (d'origine glymphatique) ;
- On trouve du Gd sous la même forme dans l'espace périvasculaire ;
- Le Gd semble aussi circuler à travers tout le parenchyme cérébelleux, puisqu'il est retrouvé dans l'espace interstitiel ;
- Enfin, du Gd semble également avoir traversé la membrane plasmique astrocytaire, et y est localisé au niveau intracellulaire.



## B. Analyse par fluorescence X de noyaux cérébelleux profonds de rats ayant reçus des injections multiples de chélates de Gd

### 1. Introduction

L'étude de microscopie électronique mentionnée préalablement nous a permis d'identifier et de localiser des dépôts de Gd insoluble, sur des coupes ultrafines de tissu cérébelleux. Nous avons alors souhaité faire le lien entre cette localisation « grossière » du Gd, déterminée par les dissections cérébrales et l'ICP-MS, et la localisation subcellulaire, en observant le phénomène à une **échelle intermédiaire**. La fluorescence X, a été réalisée sur une coupe d'échantillon plus épaisse (500  $\mu\text{m}$ ) que celle requise en TEM, pour optimiser la détection des faibles quantités de Gd. Cela devrait nous permettre d'avoir une visualisation plus globale des dépôts de Gd au sein du cervelet. La cartographie du Gd ainsi que d'autres éléments d'intérêt, sur des volumes de plus grandes tailles, nous donnera en effet certainement des informations complémentaires à celles obtenues jusqu'ici. Une potentielle colocalisation (ou, au contraire, l'exclusion) du Gd avec des éléments tels que les métaux Fe, Cu, trouvés en très grande concentration dans les DCN mais aussi le P et le Ca, a ainsi été étudiée. L'identification des structures d'accumulation devrait être possible grâce à la cartographie des éléments endogènes, ou bien en ayant recours à des techniques renseignant la morphologie et la microanatomie de l'échantillon (techniques disponibles sur la ligne du synchrotron, ou encore la TEM, ou l'histologie optique). L'EP-XRF n'avait pas permis de mettre en évidence la présence de Gd localement, au niveau des « oursins ». Une autre modalité d'analyse par émission de fluorescence est apparue possible, sur la nouvelle ligne Nanoscopium du synchrotron SOLEIL. Ce rayonnement synchrotron, plus intense, devrait conférer à la SXRF (Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence) une meilleure sensibilité.

Un premier créneau synchrotron pour un premier essai nous a été attribué. Une seconde demande de projet a été déposée avec un créneau temporel plus large. Les principales questions pratiques issues du premier essai ayant alors été résolues, nous avons pu envisager l'étude de plus de zones anatomiques et de plus d'échantillons.

### 2. Le rayonnement synchrotron

Le rayonnement synchrotron est produit par des électrons de très haute énergie qui tournent dans un accélérateur circulaire. Ce rayonnement extrêmement brillant est ensuite exploité dans des « lignes de lumière », au bout desquelles sont montées les cibles, c'est-à-dire les échantillons de matière à étudier. Le synchrotron SOLEIL compte 29 lignes de lumière, dont Nanoscopium (Somogyi, 2015). Cette ligne, longue de 155m, innovante et unique, est dédiée à l'imagerie X (5 à 20 keV), multimodale et multi-échelle (35 nm à 1  $\mu\text{m}$ ), par balayage rapide. Elle offre la possibilité d'avoir simultanément et dans les mêmes conditions expérimentales, à la fois des informations quantitatives 2D et 3D (tomographie) sur la composition élémentaire, les spéciations chimiques et la morphologie de l'échantillon étudié.

### 3. La ligne Nanoscopium

Nanoscopium est dotée de deux stations expérimentales, la première est optimisée pour l'imagerie à balayage par diffraction cohérente, ou « ptychographie », et la seconde pour la cartographie élémentaire par fluorescence X.



La **Ptychographie** consiste à balayer l'échantillon afin d'obtenir des milliers d'images de diffraction 2D. Une reconstruction de la structure fine de l'échantillon (résolution de 35 nm) est ensuite assurée par de puissants algorithmes.

C'est la deuxième station, dotée d'une nanosonde pour l'analyse chimique et élémentaire, qui va surtout nous intéresser dans le cadre de notre thématique. Elle assure en effet la cartographie élémentaire, à l'état de traces, grâce à son excellente sensibilité, par **spectroscopie de fluorescence X** (XRF). Elle vise aussi à renseigner la spéciation chimique d'un élément (état d'oxydation et coordination chimique) par **spectroscopie de structure près du front d'absorption de rayons X** (ou « XANES » en anglais, pour « X-ray Absorption Near Edge Structure »). Cette station permet également l'accès à des informations morphologiques, par analyse du spectre d'absorption, de diffusion, ou par contraste de phase différentiel (réfraction).

La spectroscopie de fluorescence X repose cependant sur une excitation par bombardement de rayons X, tandis que l'EP-XRF repose sur une excitation par bombardement d'électrons. La fluorescence X, issue d'un rayonnement synchrotron, assure une bien meilleure sensibilité (la détection élémentaire y est possible à l'état de traces), une plus grande pénétration de l'échantillon, et également une meilleure résolution en énergie, puisque cette technique permet de moduler l'énergie du faisceau selon l'élément d'intérêt principal. Elle a cependant une moins bonne résolution spatiale que l'EP-XRF couplée à la microscopie électronique, et elle nécessite des temps d'acquisition bien plus longs.



4. Etude préliminaire : Caractérisation par imagerie multimodale de noyaux cérébelleux profonds de rats ayant reçu des injections répétées de gadodiamide.

Une première étude a été réalisée sur un échantillon déshydraté et inclus en résine, permettant l'analyse en microscopie électronique sur le même échantillon.

#### A. Matériel et Méthodes

##### a) Animaux

Deux rats ont été inclus dans cette étude. Il s'agit de femelles de 9 semaines lors de la réception, provenant du fournisseur Charles River (souche Sprague-Dawley, OFA). Les animaux ont ainsi 11 semaines (correspondant à des jeunes adultes) lors des administrations intraveineuses des produits. Tout au long de l'étude, les animaux ont été hébergés par cage de deux, dans des conditions standard de laboratoire : une température de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , un rythme obscurité/lumière de 12h/12h, et l'eau et la nourriture ont été accessibles *ad libitum*. Les études ont été réalisées conformément à la législation française sur l'expérimentation animale et à la directive européenne 2010/63/EU.

##### b) Réalisation de l'expérimentation

- Injections répétées de produit de contraste

Le chélate de Gd testé dans cette première étude est le gadodiamide. La dose injectée a été de 0,6 mmolGd/kg de poids corporel, au niveau de la veine caudale sous anesthésie gazeuse, pendant quatre jours par semaine pendant 5 semaines (soit 12 mmolGd/kg reçues au total). Une période de 2 mois post-injections a été respectée, afin de n'observer que le Gd accumulé sur le moyen-long terme dans les tissus cérébraux et ainsi d'éviter une possible interférence avec des dépôts transitoires et non pertinents.

- Examen d'imagerie par résonance magnétique

Un examen IRM a été réalisé immédiatement après la dernière injection et un autre a été réalisé juste avant le sacrifice (soit 7 semaines après), permettant ainsi de documenter le rehaussement T1 des DCN induit par la capture de Gd dans cette zone (un effet attendu sur ce modèle), ainsi que l'effet de la période dite de « wash-out » (absence de traitement pendant 7 semaines) sur ce rehaussement.

Il s'agissait d'une imagerie SE2D pondérée T1 réalisée sur IRM Bruker 4,7 Tesla. La séquence utilisée est la suivante: FLASH 2D - TR/TE = 50 ms/1,782 ms – NR 48 - Résolution =  $164 * 164 \mu\text{m}$  – épaisseur =  $700 \mu\text{m}$  - Tacq = 6 min 36 s.

- Euthanasie des animaux

A l'issue de la période de 7 semaines post-injections, une exsanguino-perfusion cardiaque par le paraformaldéhyde 4% a été réalisée afin d'obtenir une fixation préliminaire des tissus. Ensuite, le cerveau et le cervelet ont été délicatement prélevés.

##### c) Préparation des échantillons

Une fois extrait, le cervelet a été laissé pendant la nuit dans une solution de Karnovsky (paraformaldéhyde 2%, glutaraldéhyde 2,5%, 0,1M tampon phosphate de sodium ; solution classiquement préconisée pour les études de microscopie électronique), pour fixation. Le lendemain, il a été rincé et transféré dans un tampon cacodylate. L'utilisation d'un tampon classique contenant du phosphate est ici évitée, afin de prévenir une éventuelle précipitation de  $\text{GdPO}_4$ .





- Découpe des cervelets en coupes de 2 mm contenant les DCN

Après rinçage au tampon cacodylate (0,1M), une coupe coronale de cervelet de 2 mm d'épaisseur et contenant les DCN a été réalisée. La coupe a ensuite été coupée en 2 sur le plan sagittal pour séparer les deux DCN, et le tronc cérébral a été éliminé. Les échantillons ont été fixés au glutaraldéhyde, contrastés à l'osmium, puis inclus en résine, comme détaillé en Annexe 3.

- Préparation d'un bloc de résine analysable au synchrotron

Les dimensions du bloc ont été choisies en tant que compromis entre la microscopie électronique (échantillon de 1 à 2 mm de côté, coupe de quelques dizaines de nm) et la fluorescence X (le montage sur un support nécessite une taille d'échantillon permettant sa bonne manipulation, et l'échantillon doit être suffisamment épais pour optimiser la détection de Gd). A noter que le bloc est monté verticalement.

L'échantillon en résine a été taillé par tronçonnage et surfacage au couteau à diamant, pour obtenir un bloc contenant notre zone d'intérêt, de 500 µm d'épaisseur, 1,5 mm de longueur et 900 µm de largeur. Une coupe de 50 nm a été réalisée en début d'échantillon pour permettre l'examen en TEM-EELS à la recherche de dépôts de Gd.

## B. Résultats

- Evaluation de la capture cérébrale de Gd par imagerie de résonance magnétique

Alors qu'un rehaussement du signal T1 des noyaux cérébelleux profonds n'apparaît pas nettement sur l'IRM réalisée au lendemain de la dernière des 20 injections de gadodiamide, celui-ci est bien plus net après 7 semaines de « wash out » (Figure 56). Le rapport de signal T1 DCN/tronc cérébral témoigne de ce rehaussement.

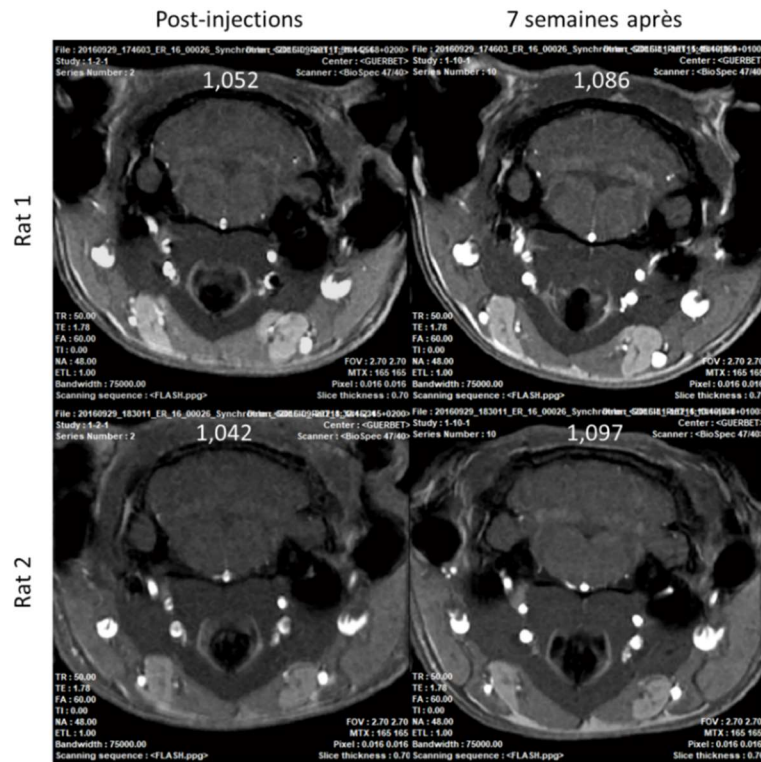


Figure 56 : IRM présentant la coupe contenant les noyaux cérébelleux profonds des deux rats, le lendemain de la fin des injections de gadodiamide, et 7 semaines plus tard, juste avant l'euthanasie. Le chiffre en blanc indique le rapport de signal T1 DCN/tronc cérébral. Celui-ci est cohérent avec ce qui apparaît visuellement : un rehaussement du signal T1 est plus net après les 7 semaines non-injectées.

b) Caractérisation histologique de la coupe pour microscopie électronique

Une coloration au bleu de toluidine d'une coupe de l'échantillon nous a permis de centrer sur une zone d'intérêt, contenant une partie des noyaux cérébelleux profonds (Figure 57).

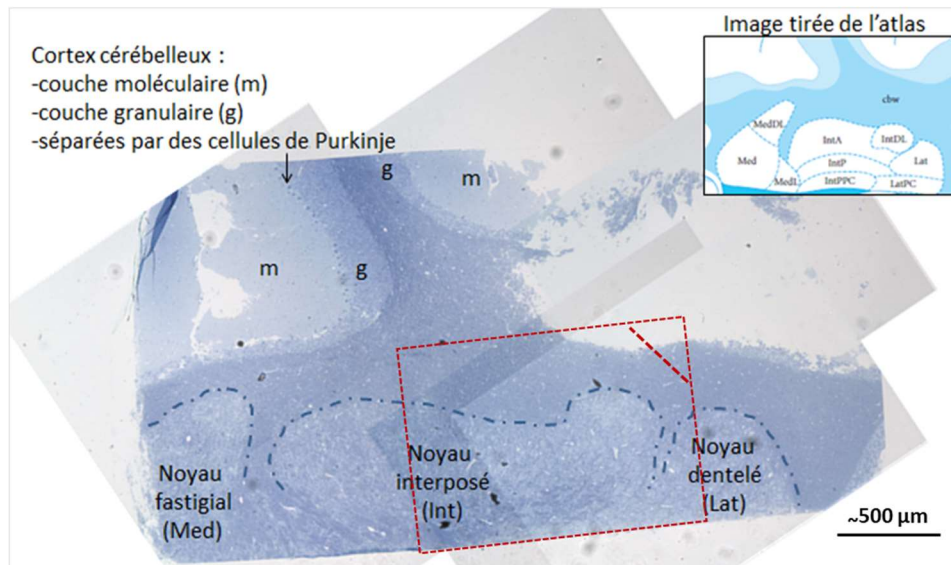


Figure 57 : Repérage des DCN afin de centrer les coupes TEM et XRF Nanoscopium (plus petites, dans la zone délimitée en rouge), coloration au bleu de toluidine et mise en relation avec les données anatomiques de l'atlas de Paxinos et Watson (2007). Au sein de la zone d'intérêt, deux structures tissulaires sont bien identifiables, l'une contenant des cellules plus claires correspondant aux DCN (bas), l'autre à de la substance blanche ne contenant que de la substance blanche (haut).

c) Analyse par microscopie électronique de transmission

Une première analyse de l'échantillon a été réalisée en TEM, mais aucun des dépôts « candidats » ne s'est révélé positif pour le Gd à l'examen EELS.

d) Installation de l'échantillon pour la Fluorescence X : ligne Nanoscopium du synchrotron SOLEIL

L'installation de l'échantillon est illustrée ci-dessous.



Figure 58: Fixation, à l'aide de vernis à ongles, de l'échantillon (900 x 1500 x 500  $\mu$ m) sur le support métallique pour l'examen en XRF.

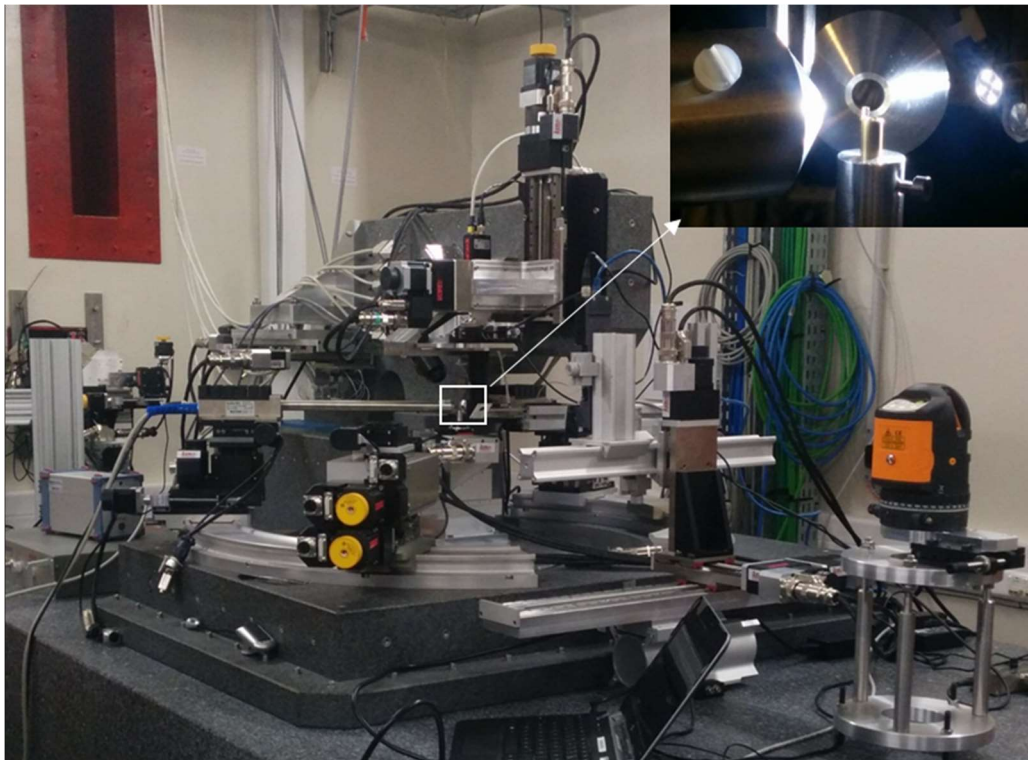


Figure 59: Station de la nanosonde permettant l'analyse XRF, et zoom sur l'échantillon installé entre les deux détecteurs de fluorescence (sonde Nanoscopium, synchrotron SOLEIL).

e) Analyse de l'échantillon par fluorescence X

Afin de pouvoir observer le Gd dans les meilleures conditions, nous nous sommes placés à un niveau d'énergie de 9 keV, juste supérieur à celui d'activation de la couche L du Gd (Figure 60). En effet, alors que pour les éléments légers (jusqu'au nombre atomique  $Z=42$ ), l'analyse des niveaux d'énergie des transitions électroniques de la couche K convient bien. En revanche, pour des éléments de nombre atomique élevé, tels que les lanthanides, les raies K ne sont pas mesurables.

Element	K 1s	L <sub>1</sub> 2s	L <sub>2</sub> 2p <sub>1/2</sub>	L <sub>3</sub> 2p <sub>3/2</sub>
64 Gd	50239	8376	7930	7243

Figure 60: Energie d'activation des électrons du Gd (X-RAY DATA BOOKLET, Center for X-ray Optics and Advanced Light Source, Lawrence Berkeley National Laboratory, 2001. Disponible sur : <http://xdb.lbl.gov/>).

Element	K $\alpha_1$	K $\alpha_2$	K $\beta_1$	L $\alpha_1$	L $\alpha_2$	L $\beta_1$	L $\beta_2$	L $\gamma_1$
63 Eu	41,542.2	40,901.9	47,037.9	5,845.7	5,816.6	6,456.4	6,843.2	7,480.3
64 Gd	42,996.2	42,308.9	48,697	6,057.2	6,025.0	6,713.2	7,102.8	7,785.8

Figure 61: Energies caractéristiques d'émission secondaire de rayons X (ou fluorescence X) des différentes couches de l'élément Gd (<http://xdb.lbl.gov/>).

Sur un scan large de repérage, de 400  $\mu\text{m}$  x 400  $\mu\text{m}$ , avec une résolution de 1  $\mu\text{m}$  par pixel et un temps d'exposition de 10 ms, les pics caractéristiques du Gd ont été détectés. La résolution indiquée est celle en x et y, mais le faisceau traversant la majorité de l'échantillon, la résolution en z est limitée à





celle de son épaisseur, soit 500  $\mu\text{m}$ . Après sélection des énergies spécifiques des différents éléments d'intérêt afin d'en afficher leur cartographie sur la zone scannée, nous obtenons les images ci-dessous (Figure 62).

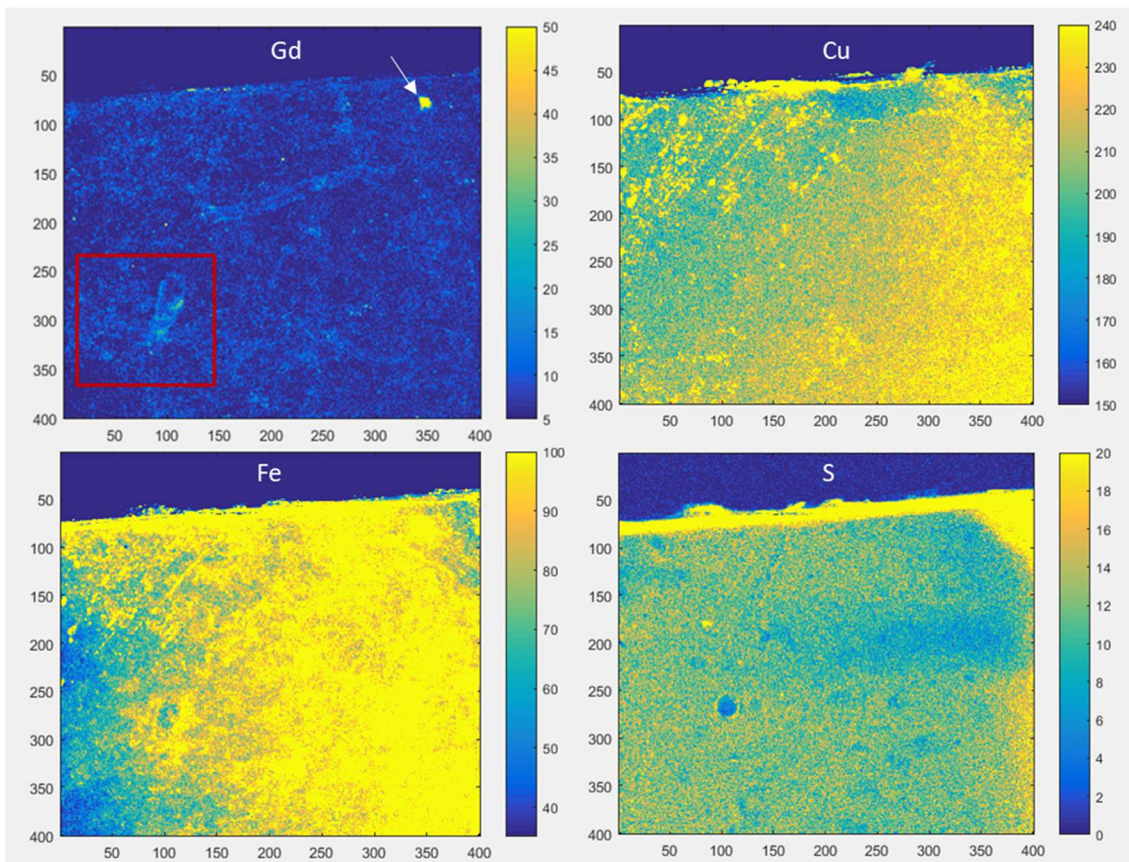


Figure 62 : Cartographie du gadolinium, cuivre, fer et soufre (reconstruction par un code MATLAB développé par l'équipe de la ligne Nanoscopium). Les échelles d'intensité ont été choisies afin d'obtenir une image permettant de conclure sur la présence de ces éléments au niveau de la zone contenant du Gd. La « pépite » observée en haut à droite dans la cartographie du Gd (flèche) correspond à la coprésence de Fe et de Mn si l'on analyse plus précisément les spectres (très proches) à ce niveau. Le chlore, l'aluminium, le phosphore et le calcium ont également été cartographiés, mais les résultats ne présentant pas d'intérêt majeur, ils ne sont pas présentés. Scan de 400 x 400  $\mu\text{m}$ , résolution de 1  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ , durée d'exposition 10 ms.

Element	$K\alpha_1$	$K\alpha_2$	$K\beta_1$	$L\alpha_1$	$L\alpha_2$	$L\beta_1$	$L\beta_2$	$L\gamma_1$
63 Eu	41,542.2	40,901.9	47,037.9	5,845.7	5,816.6	6,456.4	6,843.2	7,480.3
64 Gd	42,996.2	42,308.9	48,697	6,057.2	6,025.0	6,713.2	7,102.8	7,785.8

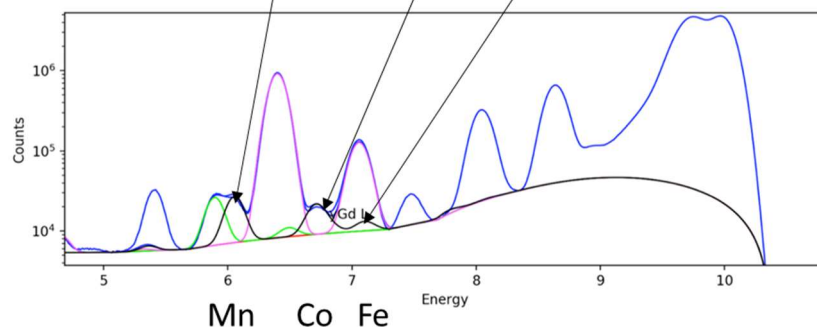


Figure 63 : Différents spectres identifiés : spectre total (bleu), Gd (noir), Mn (vert) et Fe (rose). Les 3 pics caractéristiques du Gd sont respectivement recoups par ceux du Mn, du Co (non représenté) et du Fe. Il vaut mieux tenir compte du 2e pic du Gd pour la représentation des cartographies, puisqu'au contraire du Mn et du Fe contenus de façon endogènes dans nos tissus, on ne détecte pas de Co.



La cartographie du Gd montre une répartition hétérogène dans l'échantillon. La « pépite » observée en haut à droite dans la cartographie du Gd correspond en fait à du Fe et du Mn si l'on analyse plus précisément les spectres (très proches) à ce niveau. Un « bruit de fond » de Gd est observé sur l'ensemble de la surface. Une zone, délimitée par le cadre rouge sur la Figure 62, contient bien du Gd, en quantité plus importante. Ci-dessous le spectre moyen de la zone, avec les deux pics principaux du Gd, entourant le pic de Fe à 6,4 keV (Figure 64).

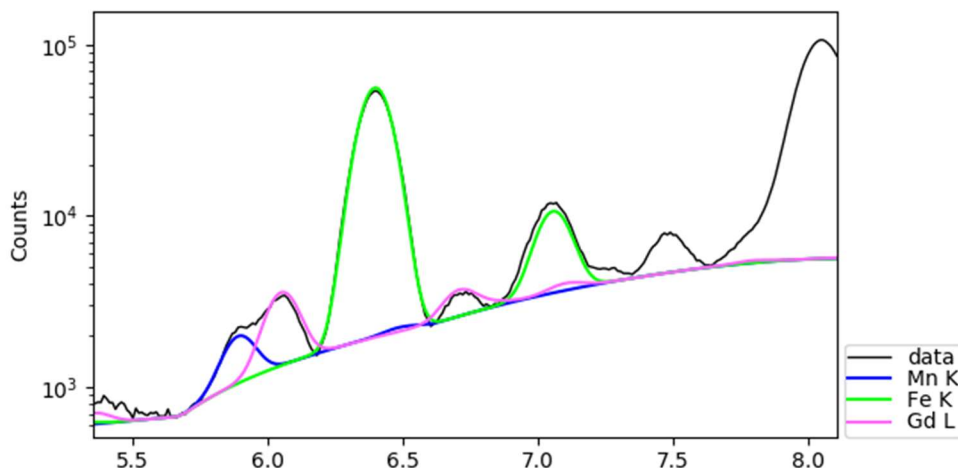


Figure 64 : Spectre moyen de la zone délimitée par le cadre rouge. Les pics à 6,047 keV et 6,715 keV correspondent à du Gd.

Comme attendu, (Popescu, 2009), des quantités importantes de fer et de cuivre ont été observées dans les DCN. Le zinc n'a pas été observable. Le Gd semblait se situer autour d'une zone ovale. Un scan de 150  $\mu\text{m}$  sur 120  $\mu\text{m}$ , zoomé de la zone contenant du Gd, a ensuite été réalisé, avec une résolution de 500 nm et un temps d'exposition de 100 ms.

Les cartographies du Gd et d'autres éléments sont présentées à la Figure 65. La structure ovoïde associée à l'accumulation de Gd semble remplie de chlore (et donc probablement de résine), et ne semble pas être colocalisée spécifiquement avec du fer ou du soufre. Il peut s'agir d'un trou dans l'échantillon (artéfact, mais que nous estimons peu probable), ou bien d'une structure oblongue, d'environ 20-25  $\mu\text{m}$  de largeur et contenant une lumière. Nous avançons l'hypothèse qu'il s'agit d'un vaisseau sanguin. L'échantillon n'a pas pu être plus exploité dans le temps imparti sur la ligne.



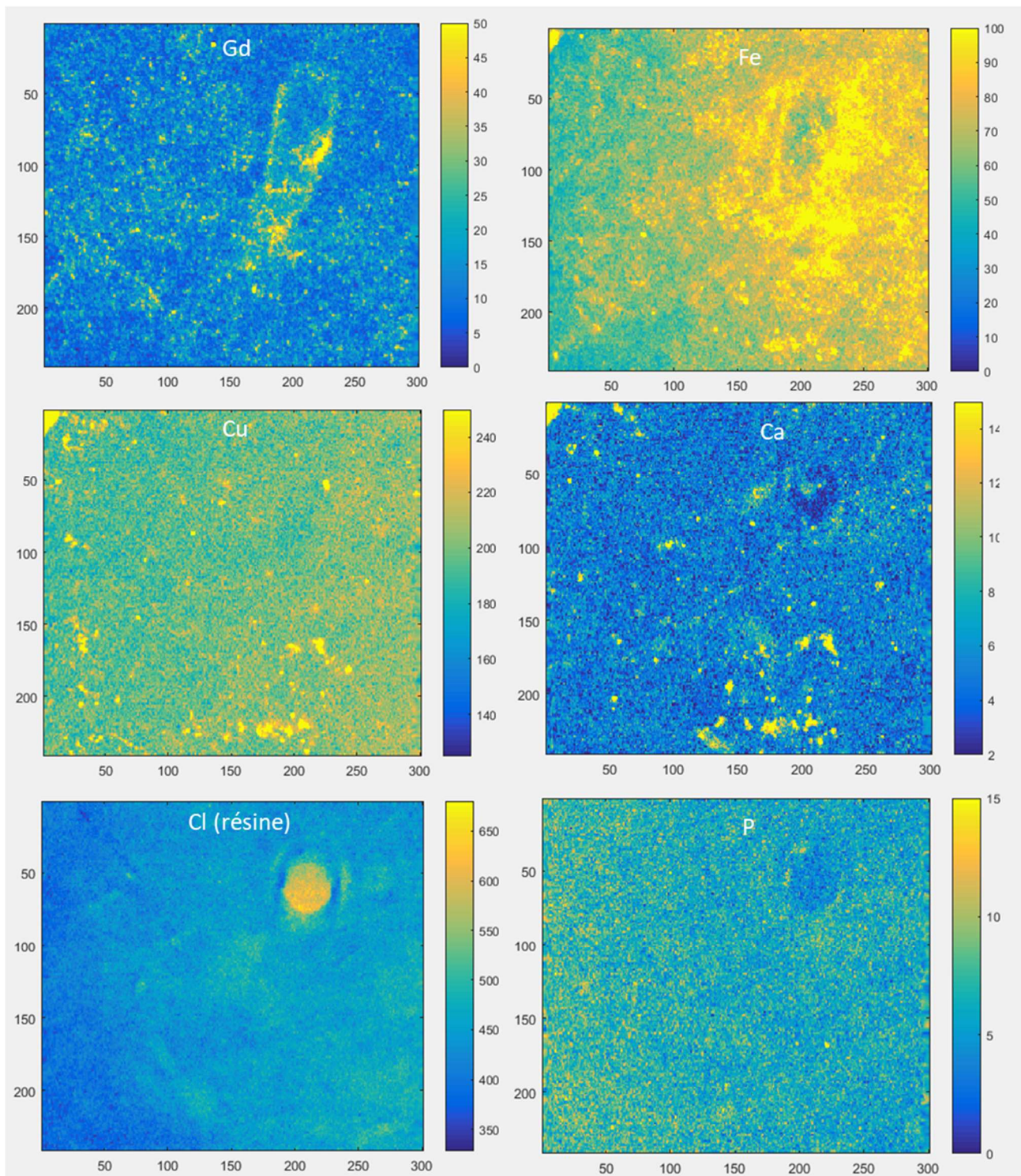


Figure 65 : Cartographie des différents éléments observés sur la zone scannée (120 x150 μm) (résolution de 500 nm, temps d'exposition 100 ms).

f) Accès à l'ultrastructure par microscopie électronique à balayage

Afin d'accéder à la structure de la zone étudiée et de confirmer ou infirmer notre hypothèse de vaisseau sanguin, nous avons réalisé un examen par **microscopie à balayage couplée à une sonde ionique focalisée (FIB-SEM)**. Cette technique est destructive, mais elle permet de scanner l'échantillon sur des couches de 5 nm, successivement érodées.





L'échantillon a été collé sur un support. Afin de protéger l'échantillon du bombardement d'ions gallium, sa surface a été recouverte d'ions métalliques, en l'occurrence ici de platine, par dépôt chimique en phase vapeur, dans une chambre sous vide.

A cause de la durée de cette technique, seule une zone de  $40\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$ , sur  $30\ \mu\text{m}$  de profondeur, divisée en près de 800 coupes de 4-5 nm chacune a pu être scannée, avec une résolution définie à 40 nm. Nous avons tenté d'identifier la zone analysée au synchrotron grâce à un repère gravé sur un coin de l'échantillon.

Les Figure 66 à Figure 68 illustrent nos résultats dans la zone sélectionnée. Il faut souligner que les contrastes sont ici inversés (ce qui apparaît en blanc apparaît en noir en microscopie électronique conventionnelle). Les images obtenues sont perpendiculaires au plan d'analyse de la fluorescence X.

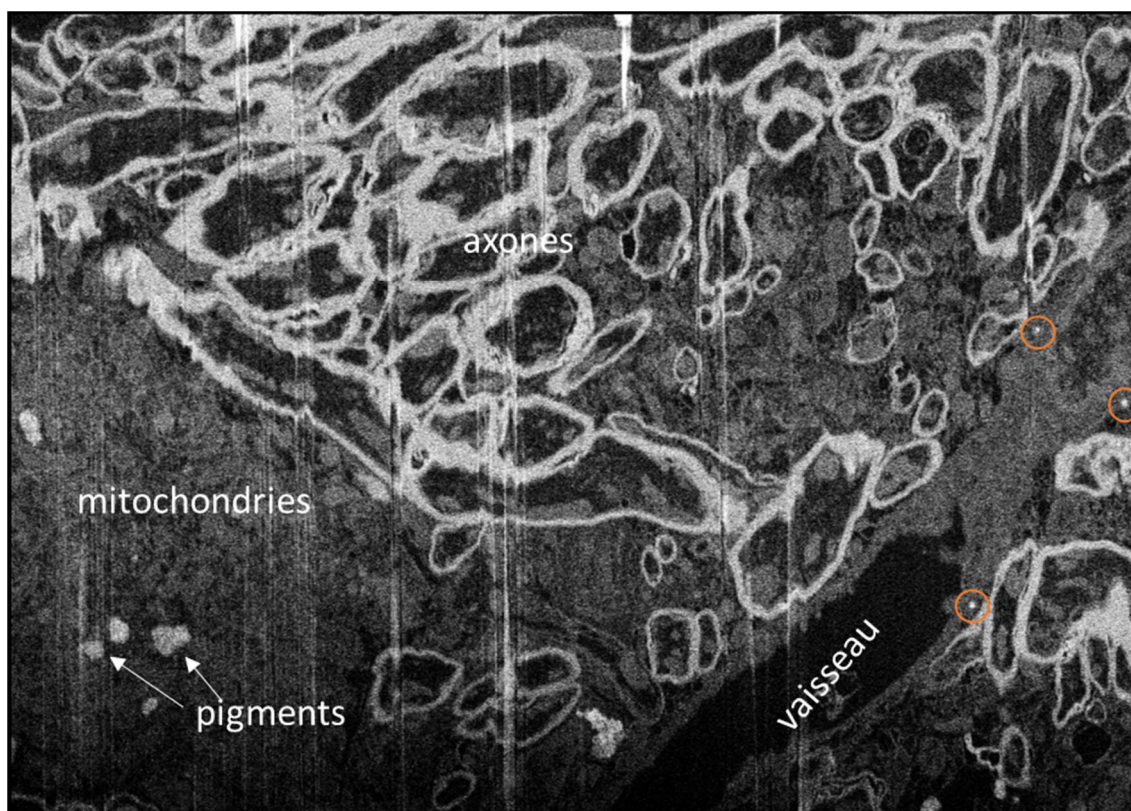


Figure 66 : Composition de l'échantillon sur une coupe située à  $5,5\ \mu\text{m}$  du point de départ. On observe principalement des axones entourés de myéline (claire), ainsi que le cytoplasme d'une cellule, contenant de nombreuses mitochondries et ce que l'on identifie comme des dépôts de lipofuscine (dépôts arrondis plus clairs). Un vaisseau en coupe longitudinale apparaît en bas à droite. Des dépôts opaques aux électrons (en blanc, encerclés en orange) situés en périphérie du vaisseau pourraient correspondre à du Gd sous forme d'« oursins », dans la lame basale, comme cela avait été retrouvé dans l'étude de microscopie électronique de transmission (Rasschaert 2018). Les traces blanches verticales sont artéfactuelles.



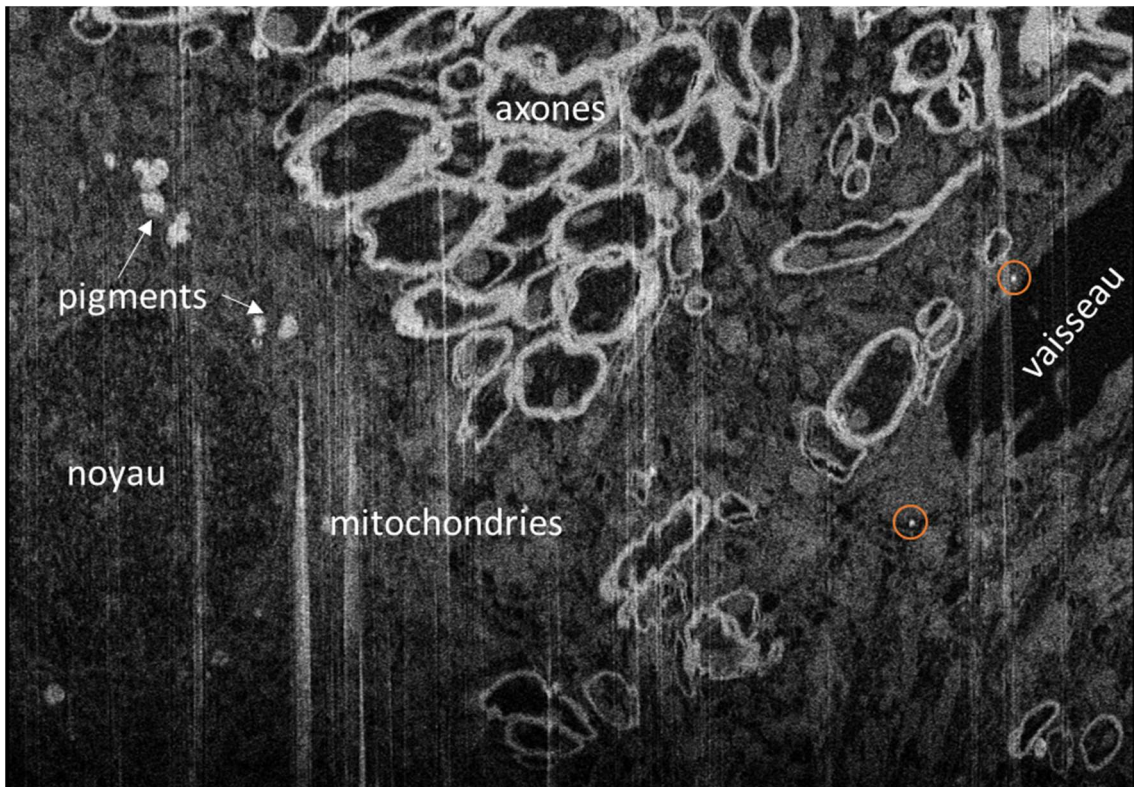


Figure 67 : Composition de l'échantillon sur une coupe située à 8,15  $\mu\text{m}$  du point de départ. Des supposés oursins de Gd (encerclé en orange) sont toujours apparents à la périphérie du vaisseau. Les stries blanches verticales sont artéfactuelles.

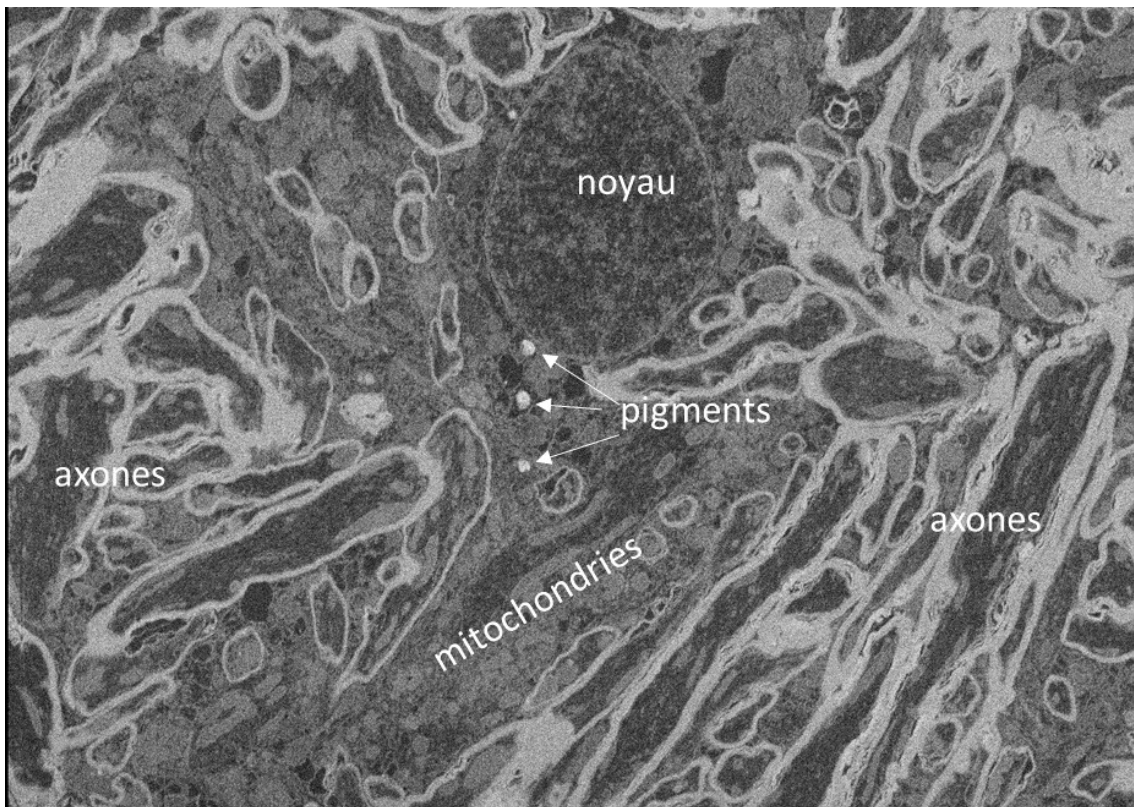


Figure 68 : Composition de l'échantillon sur une coupe située à 23,7  $\mu\text{m}$  du point de départ. On repère une autre cellule, avec un noyau bien apparent, des mitochondries et ce que l'on identifie être des dépôts de lipofuscine (dépôts arrondis plus clairs) ainsi que de nombreux axones entourés de myéline (claire).

Malheureusement, la zone scannée au FIB-SEM n'a pas révélé la présence d'un vaisseau tel que nous l'attendions (dimensions, orientation). Nous identifions cependant des cellules, et des axones, ainsi qu'un petit vaisseau. Des dépôts opaques aux électrons, ressemblant à des « oursins » de Gd ont été observés le long de ce vaisseau, ainsi que les pigments de lipofuscine.

Cette technique n'a donc pas permis de répondre à notre question. La zone analysée étant très petite et en surface, une erreur de quelques dizaines de microns, ou la présence du vaisseau attendu plus en profondeur dans l'échantillon (seuls 40  $\mu\text{m}$  sur les 500  $\mu\text{m}$  de profondeur ont ici été analysés), peuvent expliquer nos résultats.

### *C. Conclusion*

Sur les DCN de l'un des animaux ayant reçus 12 mmolGd/kg répartis en 20 injections de gadodiamide pendant 5 semaines, nous avons observé un rehaussement T1 en IRM, permettant de confirmer la capture de Gd dans les noyaux cérébelleux profonds. Ce rehaussement du signal T1 est apparu clairement sur l'IRM après 7 semaines de « wash-out », plus nettement que sur celle suivant directement la période d'injections. Cela suggère un changement de la forme Gd au cours du temps, vers des espèces de plus haute relaxivité.

Alors que la TEM-EELS n'a mis en évidence aucune trace de Gd dans une coupe de l'échantillon, la présence de cet élément a été confirmée par fluorescence à rayons X à 9 keV, sur la ligne Nanoscopium du synchrotron SOLEIL. Bien que la cartographie XRF indique la présence de Gd globalement dans toute la zone des DCN, la répartition de cet élément n'est pas homogène. En effet, une zone de Gd plus concentrée a été observée autour de ce que l'on pense être un vaisseau sanguin. Dans ce que serait la lumière du vaisseau, on observe beaucoup de chlore, certainement apporté par l'infiltration de résine. L'environnement de la structure riche en Gd est riche en fer également. Les photons de fluorescence traversant la plupart de notre échantillon, épais de 500 $\mu\text{m}$ , la résolution en profondeur étant de l'ordre de 500  $\mu\text{m}$ . Cela ne nous permet donc pas de conclure à une colocalisation (ou à l'exclusion) stricte du Gd et du Fe.

L'étude de l'échantillon en microscopie électronique à balayage n'a pas permis l'identification de cette structure d'accumulation du Gd, certainement à cause d'une zone d'analyse trop restreinte.

Un second passage sur la ligne Nanoscopium, dans le cadre d'un projet collaboratif, nous a été accordé afin de nous permettre de confirmer et d'approfondir nos observations initiales. D'autres structures telles que le cortex cérébelleux et les plexus choroïdes vont pouvoir être étudiées, ainsi que la structure anatomique, grâce aux techniques de contraste de phase ou spectre d'absorption qu'offre la ligne, ce qui n'était pas possible dans ce premier essai.



## 5. Deuxième étude : Analyse par fluorescence X de structures cérébelleuses de rats ayant reçus des injections multiples de gadobénate

### A. Introduction

Les objectifs de cette deuxième étude sur la ligne de lumière Nanoscopium dédiée à l'imagerie X-dur étaient de reproduire et d'approfondir les observations précédentes, après optimisation du modèle. En effet, nous avons souhaité réduire l'épaisseur de l'échantillon pour un meilleur accès à la microanatomie, et avons modifié le mode de préparation de l'échantillon.

L'agent de contraste étudié ici est le gadobénate, un chélate de Gd linéaire ionique, associé à une accumulation de Gd cérébral plus faible que celui étudié précédemment (cf Publication 2). Nous avons souhaité étudier ici un tissu **n'ayant pas été déshydraté**, afin d'optimiser la concentration et la diversité des espèces de Gd observables. Les premières observations étaient en effet réalisées sur un échantillon inclus en résine, et donc supposé dépourvu de toutes les espèces solubles de Gd. De plus, plusieurs structures anatomiques d'intérêt ont été ici préparées : les noyaux cérébelleux profonds, mais aussi le cortex cérébelleux et les plexus choroïdes.

La potentielle colocalisation ou l'exclusion du Gd avec d'autres éléments endogènes a de nouveau été considérée, et nous avons souhaité renseigner la morphologie ou l'ultrastructure des zones analysées, grâce au spectre d'absorption total, ou encore grâce à la technique de contraste de phase. Cela devait nous permettre l'identification des structures d'accumulation du Gd et/ou la localisation précise des dépôts de Gd dans les structures microanatomiques.

### B. Matériel et Méthodes

#### a) Réalisation de l'expérimentation

Deux rats ont été inclus dans cette étude. Comme précédemment, il s'agissait de femelles (souche Sprague-Dawley, OFA, Charles River) ici âgées de 11 semaines lors des administrations intraveineuses des produits. Le produit de contraste testé a été le gadobénate. L'induction du modèle a été la même que précédemment (12 mmolGd/kg cumulés). Les administrations ont été suivies d'un ou trois mois de « wash-out » (1 rat/durée).

A l'issue de cette période post-injection, une euthanasie par exsanguino-perfusion cardiaque de sérum physiologique puis de PFA 4% a été réalisée, sous anesthésie gazeuse.

#### b) Préparation des échantillons

Le cervelet prélevé a été fixé pendant la nuit dans du glutaraldéhyde 2,5% - tampon cacodylate 0,1M. Après un rinçage par le tampon cacodylate, le cervelet a été découpé en tranches de 150 à 300  $\mu\text{m}$  à l'aide d'un vibratome. L'épaisseur des coupes a été choisie comme un compromis entre une épaisseur suffisante pour la détection de Gd, mais permettant l'accès à l'ultrastructure de l'échantillon et sa corrélation aux cartographies élémentaires obtenues. Sur ces coupes, les zones d'intérêts ont été sectionnées en zones de 2 à 3 mm de côté. Ces échantillons ont été placés dans des supports (décrits ci-dessous) préparés au préalable, maintenu hydraté dans tampon cacodylate, et refermés de façon relativement hermétique.

#### c) Préparation du support pour fluorescence X

L'échantillon devant être présenté verticalement, collé sur un support horizontal, nous avons choisi, dans la première étude, de coller un bloc de résine façonné, à l'aide de vernis à ongle. Ici, nous





voulions travailler sur un échantillon ayant subi peu de préparation et maintenu hydraté à l'aide d'un tampon cacodylate de sodium. Pour ce faire, nous avons, dans un premier temps, pensé aux membranes de nitrure de silicium utilisées sur la ligne de lumière pour l'étude de cultures cellulaires. Il s'agit d'une structure rigide de silicium contenant une fenêtre ouverte recouverte d'un film de nitrure de silicium. Cependant, le choix des dimensions était limité (fournisseur Silson : <http://www.silson.com>), et consistait en des fenêtres de 200  $\mu\text{m}$  d'épaisseur au maximum (ce qui était trop faible pour nos coupes prévues jusqu'à 300  $\mu\text{m}$ ). De plus, les côtés biseautés, peuvent interférer avec les détecteurs et ainsi être la source d'artefacts lors de l'analyse. Nous avons donc décidé de fabriquer nos propres supports à fenêtres, en polymère PEEK (polyétheréthercé-tone), à l'aide d'une imprimante 3D dont dispose Nanoscopium. La fenêtre est refermée de part et d'autre de façon étanche (sur l'échantillon) par une membrane de Kapton (polyimide) fixée au support à l'aide de colle cyanoacrylate.

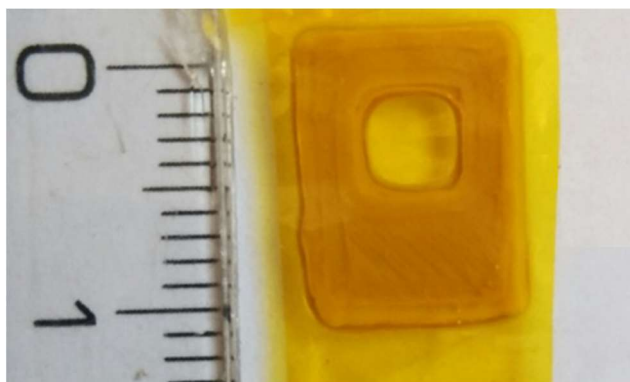


Figure 69 : Support en PEEK obtenu par impression 3D, recouvert d'un film de Kapton (polyimide) (jaune). Les dimensions de la fenêtre ainsi obtenues sont de 3  $\mu\text{m}$  x 3  $\mu\text{m}$ , pour une épaisseur d'environ 300  $\mu\text{m}$ .

#### d) Etude histologique

Après l'analyse en fluorescence X, les échantillons ont été inclus en paraffine afin de procéder à l'étude histologique.

Les échantillons ont été déshydratés puis inclus en paraffine. Un bloc de paraffine contenant la coupe d'échantillon a ensuite été coupé au vibratome (coupes sériées de 7  $\mu\text{m}$ ) pour l'histologie. Les coupes ont été déparaffinées et réhydratées.

Certaines lames ont été dédiées à une coloration par hématoxyline-éosine, tandis que d'autres au marquage immunohistologique CD34 (« cluster of differentiation 34 », une glycoprotéine d'adhésion), pour le marquage de l'endothélium des vaisseaux sanguins (anticorps anti-CD34, Lapin, Abcam ab81289), suite à un démasquage antigénique au four à micro-ondes.

### C. Résultats

#### a) Analyse de l'échantillon par fluorescence X

Les conditions d'expérimentation ont été similaires à celles de l'étude précédente : énergie de 9 keV pour se placer au-dessus du niveau d'énergie d'activation de la couche L de l'élément Gd.

La stratégie suivante a été adoptée, afin de repérer des structures d'accumulation spécifique de Gd :



- Un premier scan assez large (400  $\mu\text{m}$  x 400  $\mu\text{m}$ ), non optimal en termes de résolution et de sensibilité (300 ms et 1  $\mu\text{m}$  de pas) a été réalisé, sur une zone choisie aléatoirement dans la structure d'étude.

- Si du Gd est observé et s'il ne s'avère pas être distribué de façon homogène (bruit de fond), mais accumulé en une petite structure, un second scan, plus résolu et centré à ce niveau a été effectué. Sinon, on a réitéré l'opération un peu plus loin. Après plusieurs scans sans succès, on change de structure ou d'échantillon.

Nous avons dû faire face à différents obstacles au cours des différents essais :

-Les éléments observés (outre le Gd) étaient répartis de façon très homogène au sein des zones scannées. Nous nous attendions à ce que leur distribution reflète l'ultrastructure microanatomique de l'échantillon, cela n'a pas été le cas.

-Le sodium et le potassium n'ont pas pu être observés. Il est apparu que les énergies attendues pour ces éléments étaient dans la fenêtre d'absorption du Kapton (perte d'intensité liée à l'absorption du signal de fluorescence dans les 12,5 $\mu\text{m}$  de Kapton).

-Nous avons donc inclus un échantillon en résine pour comparer la distribution de ces éléments endogènes (puisque une telle observation n'avait pas été faite lors de la 1<sup>e</sup> étude sur résine). Il est alors apparu que la résine utilisée ici contenait du cobalt (ce qui n'est pourtant pas indiqué dans sa composition). Comme indiqué dans la première étude, le pic du cobalt se superposait au 2<sup>e</sup> pic du Gd, qui était celui que nous prenions en compte principalement pour la cartographie du Gd (le 1<sup>e</sup> pic étant superposé au le Ca endogène et le 3<sup>e</sup> avec le Mn). Nous avons donc poursuivi l'analyse de nos échantillons maintenus hydratés.

En procédant ainsi, nous avons observé, à différentes reprises, dans la zone des noyaux cérébelleux profonds, des structures fines et allongées, accumulant particulièrement du Gd (Figure 70 et Figure 71). La forme de ces structures suggère de nouveau qu'il s'agit de vaisseaux sanguins.

La recherche de colocalisation du Gd avec différents éléments endogènes (Fe, Zn, Cu, Mn, Cl, Ca, P, S) s'est révélée positive pour le calcium (Figure 70 et Figure 71). Alors que du calcium est observé de façon relativement homogène dans l'échantillon, on observe sa colocalisation avec le Gd sur différentes portions de la structure allongée. Il n'y a pas de doute qu'il s'agit bien de calcium et non d'un artéfact d'interprétation, car les pics d'énergie ne se recoupent absolument pas avec ceux du Gd. Les différentes analyses n'ont pas permis d'observer des structures de type vasculaire ne contenant que du calcium.



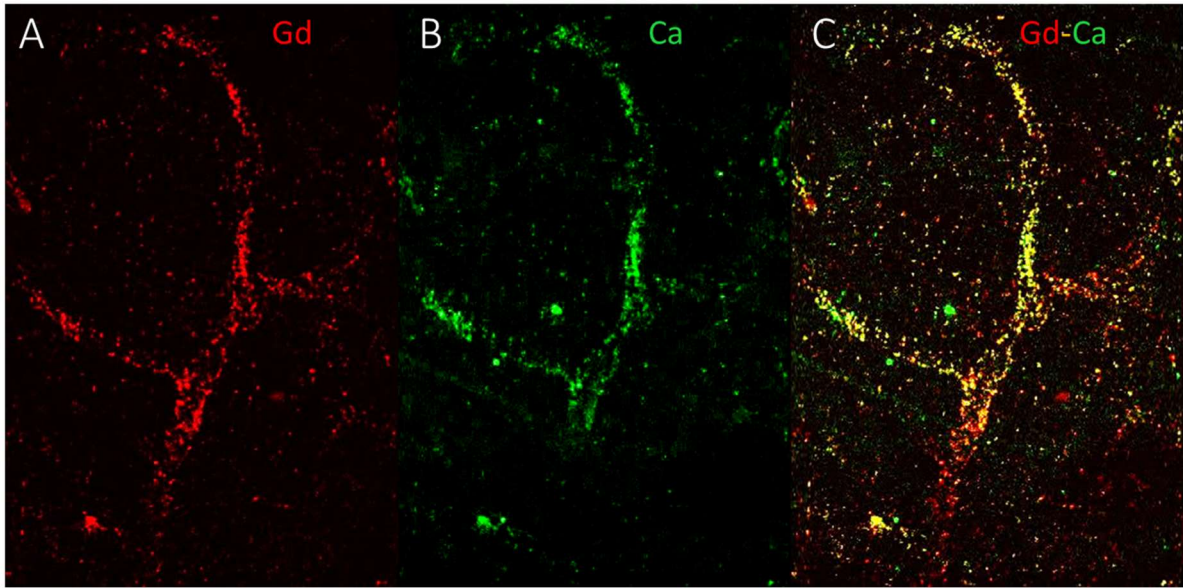


Figure 70 : Cartographie élémentaire du Gd (A), du Ca (B), et de leur superposition (C) (jaune-orangé quand fusionné avec le logiciel ImageJ) de l'échantillon G (300  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) (zone de 150x100  $\mu\text{m}$ ).

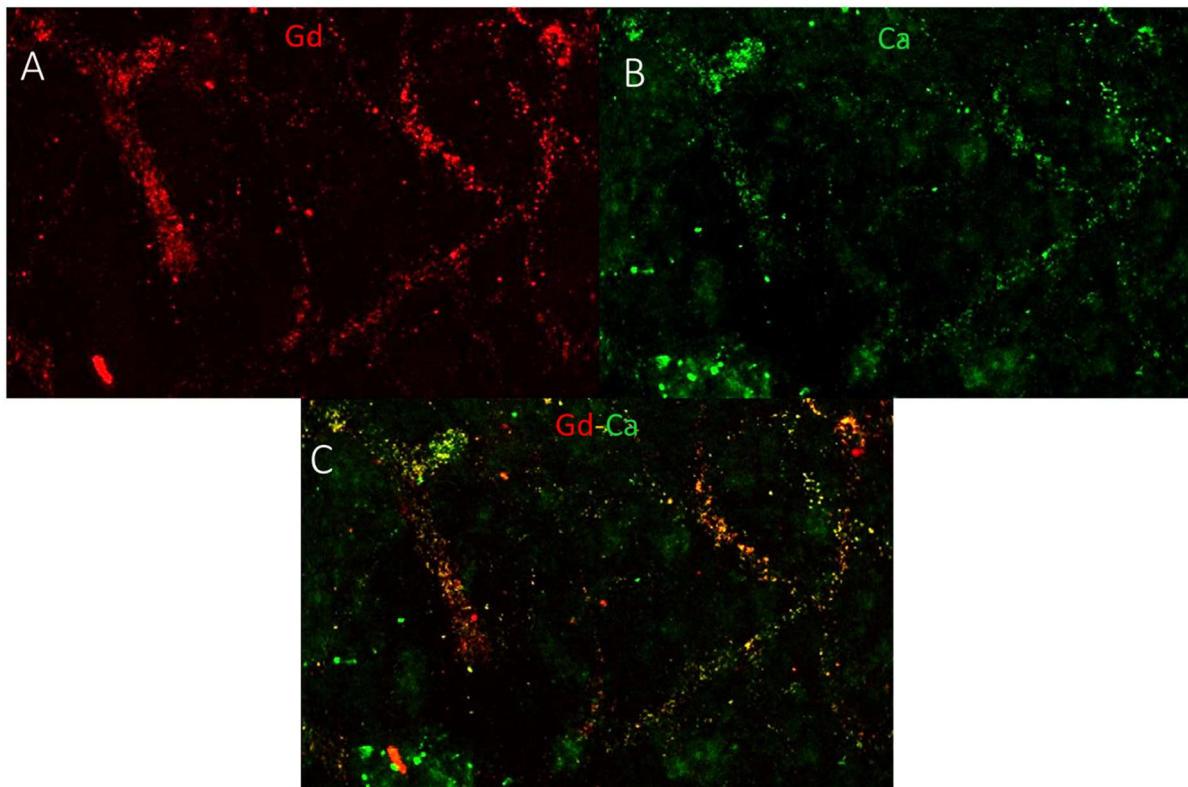


Figure 71 : Cartographie élémentaire du Gd (A), du Ca (B), et de leur superposition (C) (jaune-orangé quand fusionnées avec le logiciel ImageJ) de l'échantillon C (150  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) (zone de 100x150  $\mu\text{m}$ ).

Les quelques scans larges réalisés sur la zone corticale du cervelet n'ont pas révélé la présence de dépôts de Gd, et nous ne nous sommes donc pas attardés sur cette structure. Les plexus choroïdes n'ont pas non plus pu être étudiés dans le créneau disponible sur la ligne Nanoscopium.

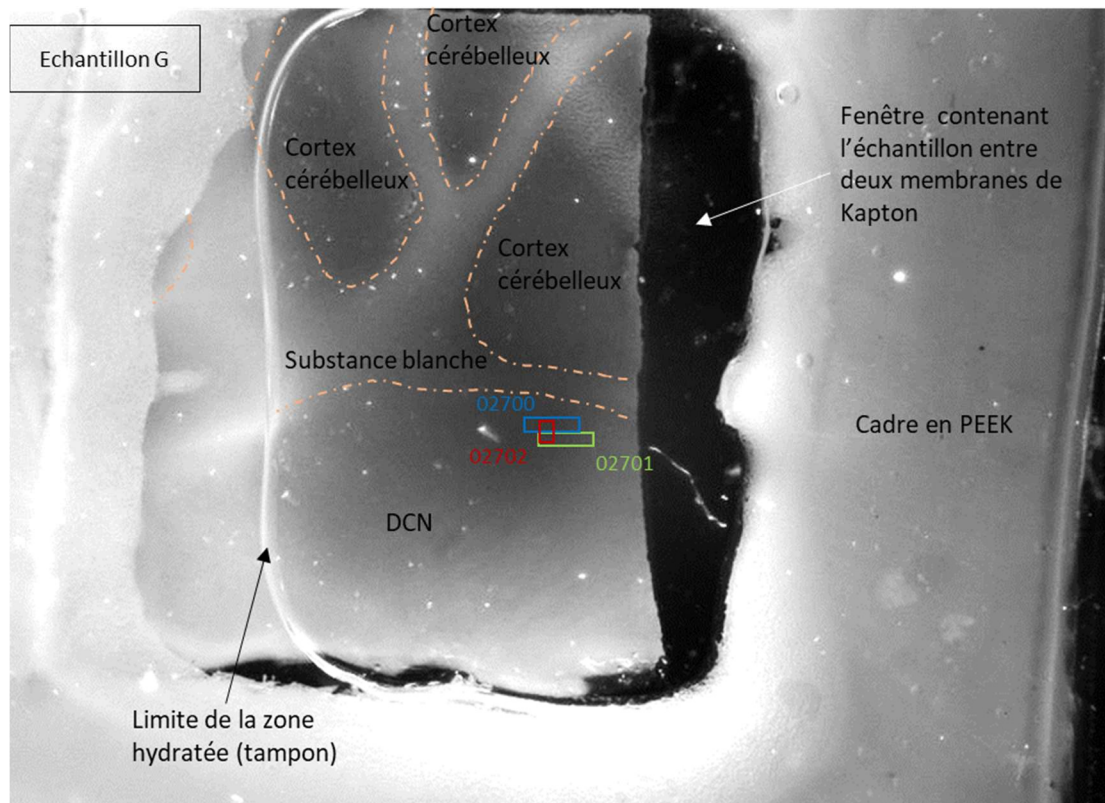


Figure 72: Image de l'échantillon G obtenue grâce à la caméra utilisée pour centrer le faisceau sur une zone d'intérêt. Le scan sur lequel du Gd a été identifié apparaît en rouge. Deux scans réalisés au préalable (en vert et bleu) ont permis de délimiter cette zone d'intérêt.

b) Recherche de l'ultrastructure par contraste de phase et absorption

La ligne Nanoscopium permet, en plus de la fluorescence X, de renseigner sur la composition structurale de l'échantillon. Les techniques de contraste de phase différentiel et de spectre d'absorption ont ainsi été utilisées pour caractériser notre échantillon au niveau des dépôts observés. La Figure 73 présente les résultats obtenus pour l'échantillon C. Malheureusement, l'épaisseur de nos coupes, couplée certainement à une composition du tissu examiné probablement trop homogène, n'ont pas permis la visualisation de structures microanatomiques.



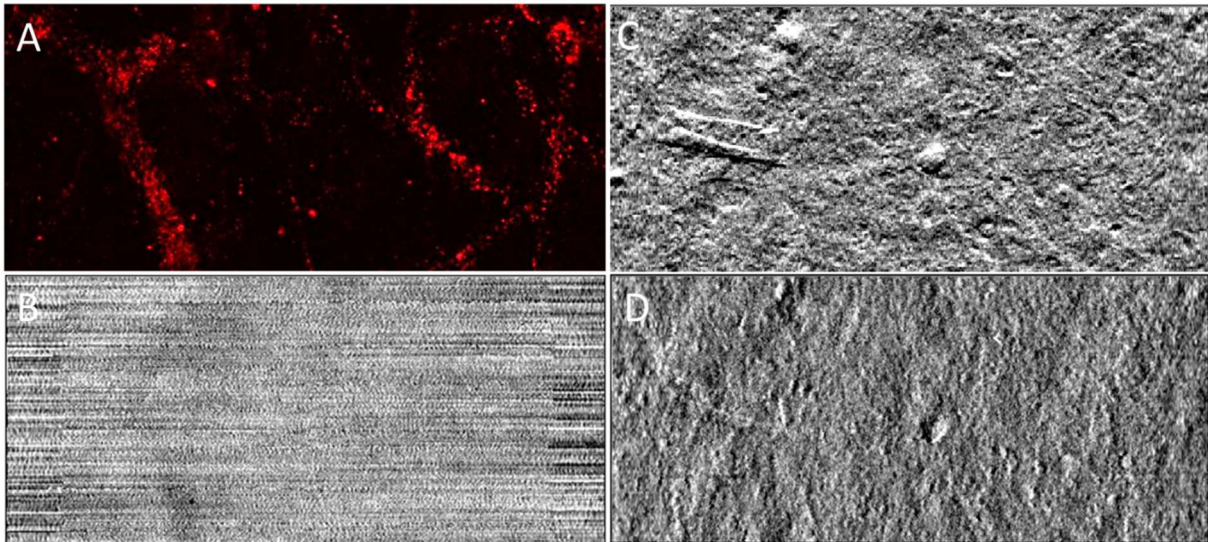


Figure 73 : Spectre d'absorption (B) et contraste de phase horizontal (C) et vertical (D) obtenus sur la partie haute de la zone de l'échantillon C (scan stoppé à 67%) (A). On croit peut-être repérer la structure en forme de Y dans le cadre B, sans plus d'informations.

### c) Histologie

Suite à l'échec des études de la morphologie des zones analysées et bien que les échantillons aient été maintenus hydratés pendant plusieurs jours dans leur montage, une analyse histologique a été envisagée. L'inclusion en paraffine de l'échantillon G de 300  $\mu\text{m}$  a été effectuée, mais celle de l'échantillon C, de 150  $\mu\text{m}$  seulement, n'a pas permis l'étude histologique ultérieure.

La zone bombardée par le faisceau synchrotron est parfaitement visible sur les coupes après coloration HE. En effet, une coloration bien plus marquée est observée dans les régions correspondant aux scans de longue durée de bombardement du faisceau pour l'analyse par fluorescence (Figure 74). Quelques noyaux autour d'une structure paraissant allongée sont visibles. Il peut s'agir d'une portion du vaisseau, réparti en profondeur parmi les différentes coupes de l'échantillon. Cependant, la coloration HE seule ne nous permet pas d'affirmer qu'il s'agit bien d'un vaisseau sanguin. Les coupes successives n'ont pas permis d'obtenir une meilleure identification de cette structure.

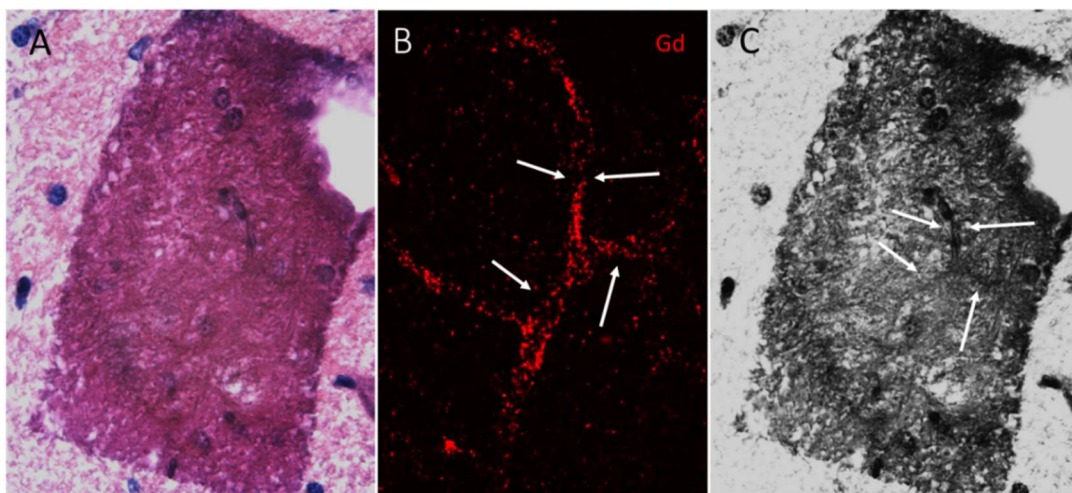


Figure 74 : (A) Coupe de 7  $\mu\text{m}$  de l'échantillon G (150 x 100  $\mu\text{m}$ ), en coloration HE, au microscope optique en grossissement x 63, laissant apparaître quelques noyaux cellulaires autour d'une structure paraissant allongée; (B) vaisseau sanguin supposé accumulant du Gd dans cette zone; (C) Coupe histologique en noir et blanc indiquant des repères cohérents avec la cartographie de Gd (flèches).



Un marquage de la molécule de surface CD34, a été choisi pour l'identification de l'endothélium vasculaire, bien que celle-ci ne soit pas entièrement spécifique (elle marque en effet les cellules souches hématopoïétiques (Civin, 1984) et endothéliales (Baumhueter, 1994) mais aussi les cellules dendritiques ou des fibroblastes (Sidney, 2014)). Idéalement, il aurait fallu faire un co-marquage avec les protéines d'adhésion CD31 ou CD146. Les essais d'immunomarquage CD34, bien que validés sur des échantillons de cerveau de Rat, ont échoué dans nos conditions expérimentales (autofluorescence du tissu, ou bien masquage de la fluorescence). Nous pensons que la fixation initiale de l'échantillon par le glutaraldéhyde (plutôt qu'avec du paraformaldéhyde, classiquement préconisé pour l'histologie), est à l'origine d'un masquage antigénique difficilement réversible. En effet, l'histologie n'avait pas été initialement envisagée lors de la conception de l'étude. Le glutaraldéhyde est connu pour altérer la structure protéique du tissu (il provoque une réticulation des protéines), ce qui réduit fortement l'accès des réactifs aux sites antigéniques (Mrini, 1995). Il existe des pistes de démasquage après une telle fixation au glutaraldéhyde (Tagliaferro, 1997), mais, à cause du faible nombre de coupes encore disponibles, nous n'avons pas jugé judicieux de tenter de nouvelles mises au point. Il faudrait refaire l'ensemble de l'expérimentation, avec une fixation au PFA pour qu'une histologie postérieure puisse confirmer la nature de ces structures d'accumulation de Gd observées de façon récurrente.

#### *D. Conclusion*

Sur ces échantillons de cervelet de rats traités par des administrations répétées de gadobénate, des structures d'accumulation de Gd fines et allongées ont été observés à plusieurs reprises dans la zone des noyaux cérébelleux profonds. Une observation cohérente avec celle-ci avait été faite lors de la première étude de fluorescence X. Cela renforce notre hypothèse qu'il s'agit de microvaisseaux sanguins. Une bonne colocalisation a été observée avec le calcium. Cette observation n'avait pas été faite dans l'étude précédente, peut-être à cause d'un mode différent de préparation de l'échantillon. Nous avons travaillé ici sur des échantillons très peu préparés afin de nous affranchir au maximum d'un lavage des entités solubles de Gd, pour observer éventuellement de nouvelles structures d'accumulation de Gd. Cela n'a pas été le cas.

Nous avons tenté d'accéder à l'ultrastructure de l'échantillon sur la ligne Nanoscopium, par l'étude du spectre d'absorption du faisceau, ainsi que par le contraste de phase. Cela n'a pas fourni d'informations exploitables. Cela est certainement lié à la superposition de microstructures sur toute l'épaisseur de l'échantillon.

Une étude histologique a alors été réalisée, après inclusion ultérieure des échantillons en paraffine, et recoupe en coupes sériées plus fines. Cependant, une coloration HE simple n'a pas permis une bonne visualisation des structures observées, certainement dispersées parmi les différentes coupes sériées. Un marquage spécifique des vaisseaux par la protéine CD34 a été réalisé, mais s'est avéré non-spécifique. Nous pensons que la fixation initiale du cervelet au glutaraldéhyde est à l'origine d'un masquage antigénique.



## DISCUSSION des résultats concernant la caractérisation de la rétention cérébrale de Gd

Le premier enjeu de cette thèse aura été de mieux comprendre et décrire le phénomène d'accumulation cérébrale du Gd, suite à des administrations intraveineuses de chélates de Gd.

L'accumulation cérébrale des chélates de Gd, principalement linéaires, a bien évidemment fait écho à la pathologie qu'est la fibrose systémique néphrogénique, décrite quelques années auparavant. Ici, la thématique, bien que certainement moins grave au vu du caractère invalidant de la FSN, inquiète beaucoup, de nouveau, le monde de la radiologie, puisqu'elle concerne cette fois-ci tous les patients, même sains, contre « seulement » les insuffisants rénaux sévères dans la FSN, et qu'il s'agit là d'une atteinte du système nerveux central. Il faut toutefois rappeler que les concentrations visiblement accumulées dans le SNC sont très faibles par rapport à ce qui pouvait être retrouvé dans la peau ou l'os chez les insuffisants rénaux. C'est également vrai chez le sujet sain.

Suite à la survenue des premiers rapports de cas cliniques, un modèle préclinique chez le Rat, a été mis au point chez Guerbet et a fait l'objet de la première publication préclinique sur le sujet (Robert, 2015). Cette étude menée chez le Rat sain, s'est avérée cliniquement pertinente puisqu'a reproduit (à 2,35 Tesla) l'hyper-signal T1 apparaissant progressivement, puis persistant comme observé en clinique, à la suite de 20 injections répétées de gadodiamide, chélate linéaire connu pour être le moins thermodynamiquement stable du marché. L'hyper-signal concerne cependant l'ensemble des 4 noyaux cérébelleux profonds chez le Rat, contre le seul noyau dentelé chez l'Homme, sans explication plausible à ce jour. Le gadotérate, un macrocycle, a également été étudié, et n'a pas révélé de rehaussement du signal. Une période de suivi d'un mois post-injection avait été incluse avant l'euthanasie. Les concentrations de Gd total des structures cérébrales disséquées étaient comprises entre  $2,3 \pm 0,5$  nmol/g (cortex cérébral), et  $3,7 \pm 0,9$  nmol/g (cervelet + tronc cérébral). Les concentrations de Gd total du groupe gadotérate elles, n'excédaient pas  $0,3 \pm 0,1$  nmol/g. De là, plusieurs études ont repris ce modèle, ouvrant la compréhension du phénomène à travers des études précliniques.

Le recours au Rat pour l'étude de l'accumulation cérébrale des chélates de Gd, alors qu'ils sont utilisés au quotidien chez l'Homme, pourrait sembler *a priori* peu cohérent. Cependant, les études chez l'Homme sur ce phénomène sont rétrospectives, les patients ont souvent reçus différents chélates de Gd, et les résultats sont très peu reproductibles. En préclinique, en revanche, les animaux reçoivent les mêmes doses, aux mêmes délais et âge, les produits de contraste y sont étudiés dans des groupes distincts, un suivi *in vivo* et le prélèvement d'organes sont aisés. La standardisation des conditions expérimentales permet donc une analyse rigoureuse contrairement aux études cliniques.

Si l'on compare l'Homme et le Rat sur les différents points clés de notre thématique, comme nous l'avons déjà évoqué, l'ensemble des noyaux cérébelleux profonds reproduisent le rehaussement du signal, contre seul le noyau dentelé chez l'Homme. Le *globus pallidus* n'a que très rarement été étudié chez le Rat. Jost n'a pas noté de modifications du rapport du signal T1 du *globus pallidus*/thalamus chez le Rat (Jost, 2016). Cette absence d'effet et le manque d'intérêt pour cette structure sont certainement dus à sa trop petite taille chez le rongeur. Il a ainsi été analysé avec le striatum. Les concentrations de Gd total mesurées *post-mortem* chez l'Homme sont bien plus élevées que celles obtenues en préclinique (McDonald, 2015 ; Kanda, 2015b). Les richesses en métaux des structures sont visiblement cohérentes entre les espèces. La voie d'élimination des produits est la même pour les différents chélates de Gd, à l'exception des agents hépato-spécifiques. En effet, le gadobénate, qui a une élimination hépatique de 3 à 5% chez l'Homme, voit cette valeur



frôler les 50% chez le Rat (Lorusso, 1999). La surface corporelle doit aussi être prise en compte pour assurer le caractère translationnel des études précliniques. Les recommandations sont d'appliquer un facteur de 6,2 entre l'Homme et le Rat pour corriger de la surface corporelle, de 12 pour la Souris (FDA, 2005). Cependant, quand les études comportent des mâles et des femelles, un effet lié au sexe (mâles > femelles) est observé dans les concentrations de Gd, que l'on peut annuler en rapportant ces concentrations au poids et donc à la dose injectée (données internes). Les rythmes biologiques du Rat sont généralement plus rapides que chez l'Homme. La demi-vie d'élimination d'un chélate de Gd, par exemple est de 20 minutes, contre 1h30 environ chez l'Homme (Aime, 2009), le renouvellement du liquide céphalorachidien est presque 4 fois plus rapide chez le Rat que chez l'Homme (Johanson, 2008). Sur cette base, les injections rapprochées de 24h chez le Rat, pourraient correspondre à des intervalles plus longs. Il a été estimé (Sengupta, 2013) qu'une journée, chez le Rat, correspond à 34,8 jours chez l'Homme. En clinique, les examens pour les suivis de pathologies sont généralement espacés de plusieurs mois.

La mise au point du modèle chez Rongeur a permis des études prospectives, plus maîtrisées, reproductibles et exemptes des biais que l'on observe souvent dans les études cliniques rétrospectives. En recoupant les résultats des cliniciens et des chercheurs, la compréhension du phénomène a ainsi pu avancer rapidement, ces dernières années.

### A. L'insuffisance rénale sensibilise à la capture cérébrale de Gd

Dans une première étude, nous avons souhaité étudier une population de rats insuffisants rénaux modérés, en comparaison à une population saine, dans un double objectif. D'une part, nous voulions savoir si cette catégorie de sujets pouvait être plus sujette à l'accumulation cérébrale suite à des injections de chélates de Gd. En effet, cette population n'est pas concernée par les restrictions émises par les autorités de santé suite à la FSN, et reçoit donc toujours potentiellement des produits classés « à risque élevé » (gadodiamide, gadopentétate et gadoversétamide), alors que la demi-vie d'élimination du produit y est plus lente que chez une population saine. Ils sont ainsi potentiellement plus exposés. Cela représente la plupart des patients âgés, nombreux à bénéficier d'examens IRM (Stevens, 2010 ; Duru, 2009). D'autre part, si c'est effectivement le cas, nous avons émis l'idée que ce modèle « sensibilisé » puisse ainsi permettre de mieux documenter le comportement des produits, en accentuant leur accumulation cérébrale.

Notre modèle d'insuffisance rénale modérée a consisté en une ablation des 5/6<sup>e</sup> du parenchyme rénal. Ce modèle, contrairement à celui de supplémentation de la nourriture en adénine par exemple, permet d'induire une insuffisance rénale qui n'est pas trop sévère et qui reste relativement stable dans le temps (Pietsch, 2009). Une diminution de la clairance de la créatinine de l'ordre de 58% a ainsi été obtenue, avec une certaine variabilité interindividuelle (publication 1). Dans la première étude, une légère amélioration de la fonction rénale avait été mesurée entre la 1<sup>e</sup> et la 6<sup>e</sup> semaine, alors que celle des animaux sains ne variait pas. Dans la deuxième étude, les valeurs de clairance de la créatinine endogène fluctuaient également au cours de l'étude, avec une amélioration de la fonction rénale entre la 1<sup>e</sup> et la 6<sup>e</sup> semaine, puis un retour à une valeur intermédiaire en semaine 10. Quoi qu'il en soit, les valeurs obtenues correspondaient toujours à une insuffisance rénale modérée.

Il apparaît qu'effectivement, les insuffisants rénaux modérés sont plus sujets à l'accumulation cérébrale de Gd, en tout cas sur le court terme étudié. En effet, en ce qui concerne le rehaussement du signal T1 dans les noyaux cérébelleux profonds, étudié cette fois-ci à 4,7 T, il a été observé plus précocement (dès 8 injections de gadodiamide, soit 4,8 mmolGd/kg cumulés, contre 12 injections quantitativement chez les rats sains), et de façon plus intense, que celui observé chez les sujets sains (rapport du signal T1 DCN/tronc de 1,12 versus 1,07). La cartographie T1 semble cependant moins sensible, puisque la différence concernant les vitesses de relaxation R1 calculées est faible, de 1,37 s<sup>-1</sup> contre 1,39 s<sup>-1</sup>. La concentration de Gd total a été dosée



dans un certain nombre de matrices cérébrales, 6 jours après la fin des injections. Les noyaux cérébelleux profonds ont été disséqués et poolés à cause de leur faible masse, pour un premier essai de détermination de leur concentration en Gd. Nous avons mesuré, dans ces structures d'intérêt, une concentration de Gd de 12,3 nmol/g dans la population saine, contre 19,9 nmol/g chez les rats insuffisants rénaux. Les concentrations de Gd total étaient doublées avec l'insuffisance rénale, dans toutes les structures cérébrales. La variabilité des clairances de créatinine nous a permis d'établir des corrélations significatives entre la clairance de la créatinine et la concentration de Gd pour toutes les structures étudiées (sauf, bien sûr, les DCN poolés). L'insuffisance rénale semble donc sensibiliser les animaux à la capture cérébrale du Gd/du chélate de Gd. Cette capture semble répondre au même mécanisme quelle que soit la structure étudiée. Une continuité du phénomène est observée, l'accumulation de Gd augmentant quand la fonction rénale décroît, avec une distribution similaire. La clairance du gadodiamide n'a pas été documentée, mais sa distribution semble donc dépendre principalement du paramètre cinétique, avec une circulation sanguine et donc une exposition prolongées dans le cadre d'une élimination rénale moins efficace. Cela a été retrouvé notamment à travers les dosages plasmatiques de Gd total : la concentration de Gd total circulant toujours 6 jours après la fin des injections était 8 fois plus élevée en moyenne chez les rats insuffisants rénaux que chez les rats sains. Sur ce modèle de néphrectomie des 5/6<sup>e</sup>, une exposition 3 fois plus importante a été rapportée comparativement à une population saine (Pietsch, 2009).

Une perte de la fonctionnalité de la barrière hématoencéphalique a été suggérée en cas d'insuffisance rénale chronique (Lau, 2017). Toutefois, sur un modèle de néphrectomie des 5/6<sup>e</sup> similaire au nôtre, la fonctionnalité de la BHE est maintenue (Naud, 2012). L'expression de certains transporteurs au niveau des cellules endothéliales des capillaires sanguins cérébraux était même diminuée, et les concentrations de substances exogènes atteignant le parenchyme cérébral étaient inchangées voire diminuées. La diminution de la clairance de la créatinine dans cette étude était, par ailleurs, de 80%, ce qui est plus sévère que ce que nous avons obtenu.

Sur un modèle d'insuffisance rénale obtenue par électrocoagulation chez la Souris, avec des doses injectées 4 fois supérieures aux nôtres il apparaît qu'alors que l'insuffisance rénale augmente effectivement l'accumulation de Gd dans les organes périphériques tels que la rate, le foie, les os et les reins, les concentrations de Gd dans le système nerveux central sont similaires à celle des souris saines (Kartamihardja 2016 a et b). Cela n'est pas cohérent avec nos données, et résulte peut-être des différences entre les espèces, les doses et le mode d'induction de l'insuffisance rénale. Néanmoins, nous nous sommes également intéressés à l'os dans notre première étude (Publication 1) (os pariétal du crâne et fémur). Ces structures semblent encore plus sensibles que le SNC à l'insuffisance rénale pour ce qui concerne l'accumulation à court terme de Gd. Les rapports de concentrations de Gd entre les groupes insuffisant rénal ou sain est, en effet, plus proche de 3, contre 2 dans les tissus cérébraux.

Une étude clinique comparant des patients hémodialysés à des sujets sains, a également rapporté des rehaussements du signal T1 plus importants dans les DCN et le *globus pallidus* pour ces premiers suite à des administrations de chélates de Gd linéaires, concluant, comme nous, à une sensibilisation de l'accumulation par l'insuffisance rénale (Cao, 2016). Nos conclusions semblent donc cliniquement pertinentes.

Dans la seconde étude sur le modèle d'insuffisance rénale (publication 2), nous avons reproduit les résultats obtenus sur la première pour le gadodiamide. L'insuffisance rénale induite était légèrement moins sévère que dans la première étude. Le rehaussement T1 est apparu qualitativement après 2 semaines d'injections également (3 semaines pour l'analyse quantitative). Le rapport de signal T1 DCN/tronc cérébral s'est révélé moins élevé juste après les injections (1,08 contre 1,12 dans la première étude). Les vitesses de relaxation R1 calculées depuis les cartographies étaient cependant similaires (1,38 vs 1,39 dans la première étude). Les concentrations de Gd total, obtenues 5 semaines après la période d'injection étaient légèrement plus faibles comparativement à la première étude (où les tissus ont été prélevés à un délai plus précoce), pour toutes les structures étudiées en commun (sauf les DCN). Cela peut s'expliquer par un léger « wash-



out » du Gd au cours de la période post-injections. Pour ce qui concerne les DCN, il s'agit certainement d'une amélioration de la technique de dissection lors de la 2<sup>e</sup> étude, une redistribution spécifique post-injection semblant peu probable.

## B. Accumulation de Gd dans les plexus choroïdes

Les plexus choroïdes peuvent être présentés comme étant un épithélium serré enfermant un stroma vascularisé, le tout formant une interface entre le compartiment sanguin et le LCR des ventricules cérébraux dans lesquels ils flottent (Strazielle, 2000). Dans notre première étude, un hypersignal T1 a été noté au niveau du 4<sup>e</sup> ventricule chez la quasi-totalité des rats insuffisants rénaux recevant le gadodiamide, apparaissant progressivement au sein des animaux à partir de 2 semaines d'injections et jusqu'à 6 jours post-injection (c'est à dire au sacrifice). Le rehaussement du signal était franc et situé au centre du 4<sup>e</sup> ventricule, ainsi que dans la cavité latérale du 4<sup>e</sup> ventricule. Le Gd total a été dosé dans le liquide céphalo-rachidien prélevé à l'issue de l'étude, alors que l'hypersignal était toujours présent. Seuls les LCR contaminés par un peu de sang contenaient une faible concentration de Gd, et nous en avons déduit que le Gd responsable du rehaussement T1 du 4<sup>e</sup> ventricule devait se situer dans les plexus choroïdes. Malheureusement, ceux-ci n'ont pas été prélevés pour le dosage.

Ce rehaussement T1 des plexus choroïdes a également été observé dans la deuxième étude, mais juste ponctuellement (quelques animaux, des semaines 4 à 6, soit pendant les 3 dernières semaines d'injection), dans les groupe gadodiamide et gadotérate. Ce phénomène n'a cependant jamais été observé avec le gadobénate. Nous n'avons pas d'explication pour cela. A notre connaissance, aucune étude préclinique n'a, à ce jour, étudié en détail la prise de contraste des plexus choroïdes après administrations répétées de chélates de Gd.

Dans le cas d'injection d'une plus forte dose (dose cumulée 50 mmolGd/kg) de gadodiamide ou de gadotérate à des animaux sains, cet hypersignal T1 du 4<sup>e</sup> ventricule a aussi été noté sur les images IRM effectuées juste après la dernière injection. Celui-ci avait cependant disparu sur le cliché ultérieur (un mois après). A l'issue de l'étude, cependant, 4 mois après les injections, la présence de Gd était toujours détectable dans les plexus choroïdes, à une concentration importante (12,6 nmol/g en moyenne pour le gadodiamide, et 3,9 nmol/g pour le gadotérate).

Dans l'étude de cas chez des patients hémodialysés, citée plus haut, un hypersignal T1 a aussi été observé au niveau des plexus choroïdes du ventricule latéral (7 patients sur 25), près du globus pallidus qui présentait lui-aussi un hypersignal, comme le noyau dentelé (Cao, 2016). Cet hypersignal T1 a été observé sur des clichés réalisés 4 mois après une injection unique, puis 4 mois après une deuxième administration, chez un patient.

Il semblerait donc que dans des conditions particulières, comme en cas de concentration sanguine importante de Gd ou en cas d'insuffisance rénale, du Gd/chélate de Gd se retrouve accumulé dans les plexus choroïdes, y induisant un rehaussement du signal T1. Le renouvellement du LCR s'effectue environ 4 fois par jour chez l'Homme, et 11 fois par jour chez le Rat (De Lange, 2013). Cela suggère donc qu'une circulation de Gd plus importante ou plus longue, augmente l'exposition des plexus choroïdes.

Certains ions métalliques sont connus pour s'accumuler dans les plexus choroïdes, comme le fer et le cuivre, mais aussi l'argent, l'or, le manganèse, le mercure organique (MeHg), ou l'arsenic (Zheng, 2001). Certains y ont des effets toxiques, en agissant sur des fonctions régulatrices des barrières, alors que d'autres, les « sequestered barrier toxicants » s'y accumulent sans que l'on en connaisse de conséquences toxiques. L'accumulation de ces métaux dans les plexus choroïdes est interprétée comme un mécanisme de défense (Zheng, 2002). Certains ions atteignent cependant aussi le parenchyme cérébral. Cependant, on les y retrouve souvent en plus faible concentration que dans les plexus choroïdes. Les conditions dans lesquelles un





hypersignal T1 du Gd est observé dans les plexus choroïdes correspondent à une résidence prolongée dans l'organisme (favorisant la dissociation des chélates dont la stabilité cinétique est la moins élevée), ou de plus fortes doses de Gd (donc, quantitativement, une probabilité accrue de présence de Gd déchélaté). La cinétique d'élimination des métaux accumulés est inconnue, tout comme leurs mécanismes d'accumulation (Zheng, 2001).

### C. Voie de passage des chélates de Gd du sang au SNC

Il était classiquement admis que les chélates de Gd ne traversent pas la BHE *stricto sensu* (Waubant 2006). Les récents travaux concernant la capture cérébrale de Gd ont remis en doute ce postulat. Cependant, certaines études que nous allons exposer, ont établi que, s'ils ne traversaient pas la BHE (ou pas préférentiellement en tout cas), les chélates de Gd traversaient tous la barrière sang-LCR, à travers les plexus choroïdes.

#### 1. Passage sang-LCR, à travers les plexus choroïdes

Classiquement, lors d'un examen IRM du système nerveux central, après injection de chélates de Gd, des rehaussements du signal T1 sont observés à différents niveaux (Menjot De Champfleuret Costalat, 2015). Un rehaussement net apparaîtrait dans les veines et gros vaisseaux, où le sang circule plus lentement que dans les artères, mais pas dans le parenchyme. Cela signerait l'absence de passage des chélates de Gd à travers la BHE, ce qui est d'ailleurs cohérent avec leur coefficient de partition octanol/eau ( $\log P < -2$  en moyenne), indiquant un passage très difficile des membranes lipidiques (Caravan, 1999). Un rehaussement du signal est également classiquement noté dans les plexus choroïdes, mais pas dans le liquide céphalorachidien. Cela témoigne d'un passage des produits dans les plexus choroïdes, mais pas leur passage dans le LCR. S'ils les traversent et accèdent en partie au LCR, leur concentration ne serait donc pas suffisante pour induire un rehaussement, sauf si la séquence FLAIR (pour « Fluid-Attenuated Inversion Recovery ») est choisie. Cette séquence (Bakshi, 2001) est basée sur la technique d'inversion-récupération. Le signal du LCR est supprimé et un long TE est sélectionné pour pondérer fortement cette séquence en T2. Cette séquence est ainsi très sensible à la présence de Gd dans le LCR (Mamourian, 2000 ; Naganawa, 2010 ; Levy, 2007). Enfin, un rehaussement serait observé dans les organes circumventriculaires, qui ne possèdent pas de barrière proprement dite, mais sont isolés du compartiment liquidien par les tanocytes (Menjot de Champfleuret Costalat 2015 ; Naganawa, 2018).

Plusieurs rapports de cas concernent des patients insuffisants rénaux ayant reçu une injection de chélate de Gd. Un hypersignal T1, mais aussi T2 FLAIR, attribué au Gd, a été observé dans les ventricules cérébraux, le liquide céphalorachidien, l'espace sous-arachnoïdien, ou encore les humeurs aqueuses et vitrées de l'œil (Lev et Schafer, 1999 ; Rai, 2001 ; Kanamalla, 2002 ; Maramattom, 2005 ; Ong et Yeh, 2007 ; Hui et Mullins, 2009). Ce phénomène suggère le passage du chélate de Gd dans le LCR par les plexus choroïdes, avec une réabsorption sous-arachnoïdienne. Le dosage de Gd présent dans le LCR a été réalisé dans un cas, et sa concentration s'élevait à 23  $\mu\text{M}$ , 24 heures après l'administration (Hui et Mullin 2009). Cette augmentation du Gd dans le LCR pourrait cependant s'expliquer aussi par une altération de la BHE, connue pour certains des patients, ainsi que par une perméabilisation de la BHE qui n'est pas exclue chez les insuffisants rénaux plus avancés.

Néanmoins, d'autres cas d'hypersignal T2 FLAIR dans les ventricules cérébraux ont été rapportés chez des volontaires sains (Bozzao, 2003 ; Morris, 2007 ; Naganawa, 2010 ; Naganawa, 2014), ce qui est cohérent avec des études précliniques (Mamourian, 2000 ; Iliff, 2013 ; Jost, 2017). Ces cas rapportent un passage effectif du Gd dans les plexus choroïdes après une injection intraveineuse, ainsi que dans le liquide céphalorachidien et l'espace sous-arachnoïdien. Un cas présentant des images acquises 24h et 48h après administration du chélate de Gd, voit disparaître le rehaussement du LCR entre ces deux IRM, laissant place à



un rehaussement de l'espace sous-arachnoïdien uniquement (Morris, 2007). Naganawa et coll. (2014) observent un pic de rehaussement T1 au délai 1h30 post-injection pour certaines compartiments liquidiens du SNC, et plus retardé pour d'autres. Chez le Rat, le pic de rehaussement apparaît entre 10 minutes (4<sup>e</sup> ventricule) et 30 minutes environ (espaces sous-arachnoïdiens) (Jost, 2017). Une équipe a prélevé du LCR chez des patients à la suite d'une injection de gadobutrol (Nehra, 2018). Des concentrations allant jusqu'à 6,4 nmol/mL, ont été retrouvées aux délais les plus précoces. L'élimination complète du produit a pris entre 4 et 8 heures chez la majorité des patients.

Un cas de rehaussement méningé a également été rapporté chez une patiente présentant une FSN. Cet hypersignal (associé à un épaississement dural) a été rapporté après des injections répétées d'un chélate de Gd linéaire (7 administrations au total), suggérant une capture à long terme du métal et sa présence sous forme soluble (Geara, 2010).

Ces études montrent la capacité du Gd, après injection intraveineuse, à passer précocement dans le LCR, à travers les plexus choroïdes, certainement sous sa forme chélatée intacte. L'élimination par réabsorption sous-arachnoïdienne peut, quant à elle, prendre plusieurs jours.

## 2. Passage du gadolinium entre le LCR et le parenchyme cérébral

Une fois présent dans le liquide céphalorachidien, qui serait donc la voie de passage privilégiée des chélates de Gd, il semblerait que le Gd (sous une forme encore indéterminée), traverse l'épendyme, ou bien emprunte la voie périvasculaire, pour arriver au niveau du fluide interstitiel cérébral et du parenchyme où il s'accumulerait.

Les cellules épendymaires constituant la séparation LCR-parenchyme cérébral, ne sont pas considérées comme une véritable « barrière » du SNC. Elles ne possèdent pas, ou peu de jonctions serrées, même si elles régulent le passage de l'eau, de certains ions et petites molécules (Bruni, 1998 ; Wang, 2010). Elles pourraient donc permettre le passage de chélates de Gd, jusqu'au parenchyme cérébral. Une étude a notamment montré que le nitrate de lanthane injecté par voie intracérébroventriculaire, traverse les barrières épendymaire et astrocytaire chez la Souris (Roales-Bujan, 2012). Du Gd qui serait déchélaté et sous forme soluble et de petite taille pourrait donc suivre cette même voie. La diffusion à travers l'épendyme de gadodiamide injecté en intraventriculaire a d'ailleurs été renseigné (Bui, 1999). Le taux de diffusion dans le parenchyme serait de  $0,066 \pm 0,017 \text{ mn}^{-1}$ . Des systèmes de pinocytose et transcytose existent également, et on peut imaginer qu'ils puissent permettre le transport non-spécifique de chélates de Gd vers le parenchyme (Jiménez, 2014). La ferritine (474 kDa) emprunterait, par exemple, ces deux dernières voies, mais seule une faible proportion atteindrait le parenchyme cérébral (Brightman, 1965). En effet, cette protéine s'accumulerait dans des vacuoles et les corps cellulaires des cellules épendymaires. Cela suggère que le passage de Gd associé à une macromolécule d'une masse moléculaire de cet ordre ou un peu inférieure, à laquelle le Gd dissocié pourrait se lier (Frenzel, 2017 ; Robert, 2018a), serait difficile.

Le système dit « glymphatique » est également une voie d'entrée du LCR dans le parenchyme cérébral, de façon périvasculaire le long des artères piales et des artérioles (dans l'espace de Virchow-Robin, situé entre la lame basale des péricytes ou, plus haut, des cellules musculaires lisses, et les pieds astrocytaires) (Jessen, 2015 ; Nedergaard, 2016). Ce flux serait induit par les contractions-dilatations du flux artériel. La continuité LCR-fluide interstitiel serait assurée par le passage du LCR à travers les canaux aquaporines AQP4, abondamment exprimés au niveau des extrémités des pieds astrocytaires. Par microscopie par excitation biphotonique et confocale, il apparaît que jusqu'à 40% du LCR sous-arachnoïdien pénètre dans le parenchyme cérébral en empruntant l'espace de Virchow-Robin, le long des artères pénétrantes (Iliff, 2012). Les



petites molécules (<800 Da environ), dont les chélates de Gd, se trouvant dans le LCR auraient la capacité de s'infiltrer dans le parenchyme en empruntant cette voie (Iliff, 2012).

D'autres travaux sont cohérents avec l'emprunt de la voie glymphatique par les chélates de Gd injectés par voie intraveineuse (Naganawa, 2017 ; Ohashi, 2018a). Le passage des chélates de Gd dans le parenchyme cérébral par cette voie a été observé chez le Rat (Iliff, 2013), mais aussi chez l'Homme (Eide, 2015 ; Öner, 2017 ; Freeze, 2017). Ces travaux ont en effet montré qu'après une injection intrathécale ou intraveineuse de chélate de Gd, un rehaussement apparaissait progressivement dans les tissus cérébraux, et pouvaient même être responsable d'un rehaussement du noyau dentelé et du *globus pallidus* pendant 2 à 12 ans après injection de gadopentétate (Öner, 2017). Cela renforce donc l'hypothèse de cette voie de passage pour les agents de contraste et le phénomène de capture cérébrale.

Notre étude de microscopie électronique (Publication 3) nous a permis de déterminer en partie la localisation subcellulaire du Gd supposé insoluble, accumulé un mois après la période d'injections. En effet, il est généralement admis qu'après la préparation de l'échantillon pour son inclusion en résine, la plupart des entités solubles sont éliminées (Thakral, 2009). Des dépôts à l'apparence d'oursins (que nous interprétons comme étant constitués de Gd insoluble) ont été observés dans l'interstitium cérébelleux et dans les lames basales le long des cellules endothéliales, ainsi que dans l'espace de Virchow-Robin. Des dépôts de Gd ont aussi parfois été identifiés au sein de cellules gliales, dans des pigments de lipofuscine intracytoplasmiques. Le Gd, à ce niveau, n'avait pas l'apparence d'oursin, mais de taches électron-denses diffuses, bien moins discernables. Des dépôts similaires ont été retrouvés dans d'autres études, cliniques et précliniques, dans ce qui était considéré comme étant des cellules endothéliales ou paroi vasculaire (sans plus de précision) (McDonald, 2015 ; Lohrke, 2017 ; McDonald, 2017a). Du Gd insoluble a aussi été identifié dans les noyaux de neurones supposés (McDonald, 2017b), ce que nous n'avons pas observé, dans nos conditions expérimentales. Les différentes localisations de ces dépôts insolubles de Gd semblent cohérente avec une distribution par la voie dite « glymphatique ». Le Gd observé dans notre étude serait donc le résultat d'une insolubilisation progressive, tout au long de son parcours à travers la voie glymphatique (lames basales, espace périvasculaire, interstitium, et cellules gliales).

Une étude récente a étudié l'influence du système glymphatique sur l'accumulation cérébrale chez le Rat. Le gadodiamide était administré soit le matin soit le soir, avec ou sans anesthésie (Taoka, 2018). En effet, le débit du LCR obéit au rythme circadien, et est plus important pendant le sommeil et l'anesthésie (Xie, 2013). La production de LCR est aussi plus importante lors du sommeil, et est réduite lors de l'éveil (Nilsson, 1992). Cela est valable également chez le rongeur, pour lequel la phase d'éveil correspond à la nuit (Kervezee, 2014). Cette étude a révélé que les concentrations de Gd accumulés dans le parenchyme cérébral étaient significativement plus élevées en cas d'administrations juste avant la phase d'éveil, et sans anesthésie, correspondant donc à une circulation glymphatique moindre (Taoka, 2018). Cela confirme donc l'implication de la voie glymphatique dans la distribution du chélate de Gd, et indique surtout que si la circulation glymphatique intervient dans la distribution des chélates de Gd dans le parenchyme, son rôle est plus important dans leur *élimination* de ce compartiment.

Il semblerait que la maladie des petits vaisseaux entraîne une dysfonction de cette circulation glymphatique (Mestre, 2017). Par ailleurs, la veine de Labbe semble être seconde voie de distribution du Gd dans le LCR, plus rapide que le système glymphatique (Ohashi, 2018b).

Cependant, l'existence de cette voie glymphatique reste controversée (Abott, 2018 ; Plog, 2018 ; Weller, 2018).



Les arguments allant à l'encontre de la voir glymphatique concernent surtout le rôle de l'AQP4 dans l'échange de molécules entre le fluide interstitiel et le LCR, stipulant que la convection depuis l'espace périvasculaire artériel vers l'espace périvasculaire veineux devrait uniquement dépendre de la pression hydrostatique et du gradient osmotique (Smith, 2015) ; que le passage de macromolécules n'est pas possible à travers AQP4 (canaux aux pores de 0,5 nm de diamètre, et dont la perméabilité est sélective de l'eau et de certaines petites molécules) (Gutiérrez, 1995) ; ou encore que la résistance hydraulique de l'espace extracellulaire devrait restreindre tout flux, en faveur d'une diffusion (Holter, 2017 ; Pizzo, 2017 ; Wolak, 2013).

De plus, certains auteurs (communications personnelles, Pr. RO Weller, Université de Southampton ; Albaroghy, 2018 ; Hannocks, 2018 ; Weller, 2018) stipulent que l'espace périvasculaire n'existe qu'au niveau des **artères des noyaux gris profonds** et de la **substance blanche**. Un espace de circulation existerait bien au niveau des artères et artérioles corticales, entre la pie-mère et la *glia limitans*, mais sans l'espace physique béant généralement rapporté, qui ne serait qu'artéfactuel. Un espace périvasculaire périveineux, post-capillaire, existerait également, et serait le lieu de circulation de lymphocytes et monocytes. Cependant, l'élimination de solutés depuis le parenchyme cérébral serait assurée par un drainage intra-pariétal, au niveau de capillaires puis d'artérioles, entre les cellules musculaires lisses, et non en périveineux comme décrit par le système glymphatique.

### 3. Cas de notre étude de la distribution de Gd par fluorescence X

Nos travaux de fluorescence X au synchrotron SOLEIL nous ont permis d'identifier du Gd amassé autour de ce qui nous semble être des microvaisseaux sanguins. Partant de cette hypothèse, la localisation précise du Gd par rapport à la paroi vasculaire n'est toutefois pas renseignée. Il peut s'agir de Gd ayant une origine sanguine, et se retrouvant piégé dans les cellules endothéliales, ou dans la lame basale comme retrouvé en microscopie électronique. Il peut également s'agir de Gd d'origine périvasculaire, empruntant l'espace sous-glial comme décrit précédemment, et qui serait piégé dans cet espace (comme les dépôts de Gd trouvés dans l'espace périvasculaire en TEM). Rappelons que la préparation de l'échantillon choisie dans la deuxième étude (fixation par perfusion chimique, puis maintien de l'hydratation par un tampon) fait donc que le Gd observé est aussi sous forme soluble.

L'argent, qui s'accumule notamment dans les plexus choroïdes peut y être retrouvé piégé dans les lames basales (Zheng, 2001). Ces dernières sont composées de laminines, de collagène IV, et de protéoglycanes, principalement l'héparane sulfate (Thomsen, 2017). Les lames basales permettraient le passage (par diffusion) d'ions, de neurotransmetteurs et d'ATP (Muoio, 2014), mais elles participeraient à la BHE, puisque leur absence est accompagnée de dysfonctions et pathologies neurologiques (Daneman, 2015). Il est intéressant de noter que l'affinité du Gd pour les glycosaminoglycanes, tels que l'héparine ou l'acide hyaluronique, a été décrite dans plusieurs études (Rej, 1990 ; Vercruyse, 2002 ; Taupitz, 2013).

En fluorescence X, nous avons observé une colocalisation du Gd avec du calcium (avec la limite d'une résolution de 500  $\mu\text{m}$ ). Or, l'unité neurovasculaire, comprenant les cellules endothéliales, les péricytes, les cellules musculaires lisses, les pieds astrocytaires, et leurs lames basales respectives, est riche en  $\text{Ca}^{2+}$  (McConnell, 2017). Le calcium intervient en effet dans la régulation de la vasodilatation des vaisseaux sanguins. C'est plus précisément à l'interface entre les pieds astrocytaires et les cellules musculaires lisses ou les péricytes que l'augmentation transitoire de la concentration du calcium conduit à l'activation de canaux potassiques  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendants, conduisant à une dilatation des artérioles (Muoio, 2014 ; Iadecola, 2017 ; Wang, 2009 ; McConnell, 2017). De plus, le  $\text{Gd}^{3+}$  est un compétiteur du calcium pour certains types de canaux calciques.



Il est bien connu, par exemple, que les lanthanides inhibent la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase dans le réticulum sarcoplasmique des fibres musculaires striées (Pałasz, 2000). On peut ainsi imaginer que le  $\text{Gd}^{3+}$ , dissocié de son ligand, puisse s'associer à des nombreux canaux ou transporteurs calciques, dans ces zones riches en calcium. Une association Gd-Ca-P avait déjà été rapportée dans les lames basales de vaisseaux (Thakral, 2009). Toutefois, en l'absence de démonstration rigoureuse que les structures le long desquelles on observe ces dépôts de Gd et de Ca sont des microvaisseaux, cela reste très spéculatif.

#### D. Chélate linéaire vs macrocyclique : effet classe

Dans notre étude comparative, l'hypersignal dans les DCN est apparu nettement après administrations de gadodiamide, un peu moins pour le gadobénate, et pas pour le gadotérate. L'effet classe qui avait été observé dans le cadre de la manifestation de la FSN semble être de nouveau applicable pour le phénomène de la capture cérébrale. En clinique, l'hypersignal T1 du noyau dentelé et du *globus pallidus* est, en effet, observé presque exclusivement dans le cas d'administrations de chélates linéaires de Gd (Kanda, 2015a ; Radbruch, 2016).

Concernant les concentrations accumulées dans les structures cérébrales, la même tendance est observée. La capture cérébrale ferait donc intervenir la cinétique de dissociation du chélate de Gd, qui distingue les complexes macrocycliques des linéaires, ainsi que la stabilité thermodynamique, qui explique les différences au sein des linéaires, entre chélates de Gd ioniques et non-ioniques (Port, 2008 ; Idée, 2009a). Les cinétiques de dissociation des chélates de Gd commercialisés macrocycliques sont en effet très lentes. En revanche, les agents linéaires ont tendance à se déchélater beaucoup plus rapidement, pouvant ainsi permettre la liaison du Gd dissocié à des molécules endogènes, susceptibles de conduire à sa rétention dans l'organisme. Au sein des chélates de Gd linéaires, les ligands non-ioniques ont une moindre affinité pour le Gd que les ligands ioniques. L'augmentation de l'exposition au chélate de Gd, en cas d'insuffisance rénale, favoriserait la déchélation, pouvant expliquer des concentrations de Gd accumulées deux fois plus importantes dans le cas du gadodiamide. Le gadotérate, administré dans notre seconde étude, présente de bonnes stabilités cinétique et thermodynamique, et figure parmi les agents s'accumulant le moins (Frenzel, 2008). Nous n'avons cependant pas la preuve que le Gd accumulé soit déchélaté.

Le gadobénate se distingue des autres chélates de Gd par sa capacité de liaison aux protéines. Ce paramètre pourrait éventuellement intervenir en facilitant son passage ou son accumulation cérébrale, ou au contraire le retenir dans la circulation sanguine. L'effet T1 observé pourrait être plus élevé, rapporté à la concentration accumulée, puisque le gadobénate, associé à l'albumine, a un effet T1 plus important. Cela n'a pas été le cas. Son profil d'accumulation tissulaire est similaire à celui des autres agents de sa classe (molécules linéaires et ioniques) (Robert, 2016 ; Jost, 2016 ; Frenzel, 2017). Nous ne pensons donc pas que sa liaison à l'albumine intervienne. La seule différence observée est l'absence d'hypersignal du 4<sup>e</sup> ventricule dans la deuxième étude, contrairement aux animaux des groupes gadodiamide ou gadotérate. Nous ne disposons pas de suffisamment d'éléments pour discuter de ce point, l'hypersignal T1 dans ce ventricule étant transitoire et le LCR et les plexus choroïdes n'ayant pas été prélevés.

##### 1. Arguments en faveur d'une déchélation des chélates linéaires de Gd

La question de la dissociation des chélates de Gd, essentiellement linéaires, est essentielle à la compréhension de leur devenir dans le système nerveux central ainsi que dans les tissus périphériques. Elle est amplement discutée dans la littérature, mais sur la base d'éléments factuels relativement rares. La





dissociation *in situ* des chélates linéaires de Gd est très probable mais l'importance de ce phénomène reste mal connue (Gianolio, 2017).

Déjà, dans notre étude de la distribution du gadodiamide chez le Rat insuffisant rénal ou non (Publication 1), nous avons constaté la présence de Gd soluble et dissocié (dosage par LC-ICP-MS) dans le compartiment sanguin 6 jours après la dernière administration. Ce Gd pourrait être lié à des macromolécules circulantes non (ou peu) filtrées au niveau glomérulaire.

Dans notre étude étudiant le rôle des métaux (Publication 2), les excrétions urinaires du Fe, Zn et Cu ont été mesurées. Nous avons ainsi noté que, dans les heures suivant une administration de gadobénate ou de gadodiamide, mais pas de l'agent macrocyclique gadotérate, la zincurie augmentait fortement (de façon plus importante pour le gadodiamide). Une telle observation d'augmentation de la zincurie et de la cuprurie avait déjà été faite en clinique et préclinique, suite à des injections de gadodiamide, et de gadopentétate (dans une moindre proportion), mais pas dans le cas du gadotérate (Puttagunta, 1996 ; Corot, 1998 ; Kimura, 2005). Cet effet témoigne certainement d'une association entre le ligand libre ajouté à la solution pharmaceutique et le pool labile du zinc de l'organisme. Cependant, alors que dans le cas du gadodiamide, du ligand (le caldiamide) est présent en excès dans la solution pharmaceutique (25 mmol/L) et peut expliquer en partie l'augmentation de la zincurie, ce n'est pas le cas du gadobénate (Port, 2008). Pour ce dernier, l'excrétion de zinc témoigne donc certainement d'une transmétallation systémique, et peut-être aussi, pour une part de l'effet observé dans le cas du gadodiamide (sur la base des constantes de stabilité thermodynamiques (Port, 2008)). Les concentrations plasmatiques de zinc total (55-125  $\mu\text{mol/L}$ ) et de son pool libre sont en effet plus importantes que celles du fer et du cuivre (McBean, 1972 ; Kimura, 2005 ; Zalewski, 2006 ; Mills, 2010). Le fer est mobilisé par des protéines de transport ou de stockage telles que la ferritine, la transferrine ou l'hémoglobine, et peu de  $\text{Fe}^{3+}$  se trouve alors sous forme « labile », c'est-à-dire aisément disponible. Quant au  $\text{Cu}^{2+}$ , il semble probable qu'il n'est pas présent en concentration suffisante (1-10  $\mu\text{mol/L}$ ) pour avoir une grande influence sur l'équilibre ligand-Gd. Les concentrations plasmatiques de calcium ionisé (environ 1,25 mmol/L) sont, quant à elles, contrebalancées par des constantes d'affinité plus élevées des ligands pour le cuivre (par exemple,  $\log K_{\text{therm}} \text{Zn-DTPA-BMA}$  de 12,04, contre 7,17 pour le  $\text{Ca-DTPA-BMA}$ ) (Idée, 2009a). La déchélation du Gd peut être facilitée par la formation d'espèces intermédiaires, comme avec l'anion  $\text{PO}_4^{3-}$  ou des macromolécules, qui déplacent alors l'équilibre (Tweedle, 1991 ; Taupitz, 2013 ; Laurent, 2001 ; Idée, 2014).

Aucune différence entre les groupes dans les concentrations des métaux cérébraux n'ayant été détectée (dans les limites de sensibilité de l'ICP-MS) dans notre étude, cette transmétallation semblerait être périphérique. Cela impliquerait alors que du Gd, sous une forme autre que chélatée à son ligand polyazapolycarboxylique, accède potentiellement au LCR ou au parenchyme cérébral.

Des études d'administration d'agents chélatants tels que le DTPA-Ca, réalisées par d'autres équipes, permettent aussi de mieux comprendre ce phénomène. Chez le Rat, après 3 administrations de DTPA-Ca espacées d'une semaine, l'excrétion urinaire de Gd est multipliée par 10 quand elle est mesurée 7 à 9 semaines après injection unique de gadodiamide (Boyken, 2019). Pour le gadobutrol, macrocyclique, étudié dans les mêmes conditions, l'excrétion urinaire de Gd reste inchangée. Pour le gadobutrol, cette excrétion urinaire est plus importante que celle du gadodiamide, alors que les concentrations tissulaires (dont le cerveau) de Gd sont nettement inférieures. Le DTPA-Ca a modérément réduit la quantité de Gd intracérébral du groupe gadodiamide. Dans le cerveau des rats, les espèces à partir desquelles le Gd a été mobilisé par le DTPA-Ca ne sont pas connues. Pour le gadobutrol, l'administration de DTPA-Ca n'a eu aucune influence sur la concentration tissulaire et l'élimination de Gd, ce qui suggère que le Gd dosé est sous la forme du gadobutrol intact. Cela est cohérent avec la haute stabilité cinétique de ce chélate macrocyclique. On note qu'entre 7 et 10 semaines après administration unique de ce chélate de Gd, du Gd reste excrété dans les urines, ce qui suggère une élimination physiologique du produit (dont la structure n'a cependant pas été vérifiée en spectrométrie de masse). Le DTPA-Ca n'a pas modifié notablement la concentration de Gd osseux des rats du groupe



gadodiamide, contrairement au cerveau et à la peau. Le DTPA-Ca accède difficilement à des compartiments de stockage prolongé comme l'os minéralisé (Guilmette, 2003).

Une autre équipe a étudié chez la Souris l'effet de l'administration de deux agents chélatants, ainsi que l'importance du moment où elle est réalisée, pour limiter l'accumulation de Gd tissulaire (après injection de citrate de Gd) (Rees, 2018). Les chélateurs étudiés ont été l'HOPO (ligand hydroxypyridinone octadenté), décrit comme figurant parmi les plus efficaces pour les ions actines et lanthanides, et le DTPA. L'administration d'un tel composé semble être plus efficace que le DTPA, en favorisant une excrétion majoritairement par les fèces. Le traitement semble avoir un meilleur effet lorsqu'il est administré en amont de l'injection de Gd (1h avant idéalement, mais fonctionne mieux 24h avant que 1h après par exemple). Cependant, l'excrétion n'a pas semblé concerner le Gd intra-cérébral. Une limite de cette étude est le choix du citrate de Gd, de faible stabilité thermodynamique ( $\log K_{\text{therm}} = 7,72$ ) (Smith et Martell, 1989).

## E. Où le Gd s'accumule-t-il et pourquoi ?

### 1. Structures d'accumulation du Gd

Comme nous l'avons déjà évoqué, le Gd s'accumule dans toutes les structures où il a été dosé. Cependant, des sites d'accumulation préférentielle apparaissent nettement. Chez l'Homme, au niveau cérébral, c'est principalement dans le noyau dentelé et le globus pallidus qui semblent accumuler du Gd après injections répétées de chélates, si l'on évalue ce phénomène très indirectement, par le rehaussement T1 détecté en IRM. Cette approche ne documente cependant que le Gd ayant accès aux protons de l'eau et susceptible d'en modifier le temps de relaxation. Cependant, il n'est évidemment pas aisé de prélever les différentes structures pour y doser le Gd, sauf *post mortem*. Sur les modèles précliniques, chez le Rongeur, le *globus pallidus* n'a jamais pu être étudié distinctement, en IRM ou par dosage, du fait de sa petite taille. Il est ainsi prélevé avec le striatum. Ce dernier constitue, en effet l'une des structures d'accumulation de Gd principales (Publication 2). Quant au noyau dentelé, un rehaussement T1 est retrouvé, mais il est accompagné de celui des noyaux voisins, les noyaux interposé et fastigial, regroupés sous le terme de noyaux cérébelleux profonds. Chez l'Homme cependant, le rehaussement des autres noyaux, bien plus petits que le dentelé, n'est pas exclu, puisqu'il est difficile de les distinguer sur la plupart des images.

Néanmoins, il est possible que du Gd s'accumule en grande quantité dans un tissu et que cela ne soit pas détecté par l'étude de son effet sur la relaxation, s'il est sous une forme qui ne permet pas son interaction avec les protons. C'est le cas dans les bulbes olfactifs par exemple sur notre modèle, dans lesquels des concentrations très élevées de Gd ont été mesurées, ce qui est cohérent avec d'autres travaux (Fretellier 2019 ; Kartamihardja 2016b). Chez l'Homme, à notre connaissance, aucun hypersignal n'a été relevé à ce niveau, et le dosage de Gd n'y a jamais été réalisé. Un hypersignal a en revanche été rapporté dans les bulbes olfactifs chez des soudeurs, intoxiqués au manganèse après en avoir inhalé (Sen, 2011). L'ordre d'accumulation du Gd entre les différentes structures du SNC analysées est globalement toujours le même dans les études concernant les chélates linéaires. Ce classement est logiquement beaucoup moins évident dans le cas des agents macrocycliques, car les concentrations de Gd total relevées sont très faibles et souvent du même ordre. Le mécanisme de distribution et d'accumulation semble donc être identique entre les différents chélates de Gd, bien que leur profil pharmacocinétique puisse différer. Le gadobénate se lie à l'albumine sanguine mais cela ne semble donc pas intervenir sur sa distribution relative selon les structures cérébrales. On trouve, pour les chélates linéaires de Gd, l'ordre suivant : Bulbes olfactifs  $\geq$  DCN > Striatum > Plexus > Cortex cérébelleux  $\geq$  Thalamus  $\geq$  Hypothalamus  $\geq$  Mésencéphale > Cortex cérébral  $\geq$  Hippocampe  $\geq$  Tronc cérébral  $\geq$  Amygdale. Cela est globalement cohérent avec les données rapportées chez la Souris (Kartamihardja, 2016b), et d'autres travaux cliniques ou précliniques ayant étudié moins de structures (Murata, 2016 ; McDonald, 2015 ; Lohrke, 2017).



Une étude de la localisation fine, a été réalisée au moyen de la technique de LA-ICP-MS (Lohrke, 2017 ; Jost, 2018 ; Fingerhut, 2018a ; Fingerhut, 2018b). Cette technique permet la cartographie du Gd, quelle que soit sa forme, sur une coupe de tissu. Cette approche a permis l'observation de Gd chez le Rat, comme attendu au niveau des DCN, du 4<sup>e</sup> ventricule, mais aussi dans une couche corticale, que l'on identifie comme la couche granulaire (Paxinos et Watson, 2007) (Lohrke, 2017 ; Jost, 2018). Les concentrations de Gd y étaient qualitativement équivalentes à celles mesurées dans les DCN pour le gadodiamide, et moindres pour le gadopentétate (Lohrke, 2017). En IRM préclinique, aucun effet T1 n'est observé dans le cortex cérébelleux et les différentes couches cellulaires ne sont pas discernables. Cependant, les concentrations de Gd total dans le cortex cérébelleux sont parmi les plus importantes, en dehors des structures connues. C'est pour cette raison que nous avons inclus l'étude du cortex et plus précisément de la couche granulaire dans nos études de microscopie électronique et de XRF. Nous n'avons cependant rien identifié en XRF (mais cette structure n'a été que peu analysée), et seuls quelques dépôts de Gd insoluble ont été observés en microscopie électronique autour de vaisseaux, mais jamais dans le compartiment intracellulaire. Des données de LA-ICP-MS chez le Rat (non publiées) montrent que la distribution du fer, du cuivre et du zinc au niveau de ces couches du cortex cérébelleux est hétérogène. La couche granulaire contient la plus importante concentration de fer (mais inférieure à celle des DCN) et du zinc (autant que dans les DCN), tandis que le cuivre se trouve dans les cellules de Purkinje (légèrement plus que dans les DCN). Chez l'Homme, la distribution des métaux endogènes est moins nette que chez le Rat (Fingerhut, 2018b). L'accumulation de Gd au niveau de la couche granulaire du cortex est également bien moins importante chez l'Homme que chez le Rat comparativement aux DCN (Fingerhut, 2018b).

## 2. Hypothèses concernant l'accumulation préférentielle dans certains tissus

Quels sont les déterminants de cette distribution du Gd stocké à moyen terme ? Nous avons souhaité étudier le rôle des métaux endogènes dans ce phénomène (Cu, Fe, Zn). Nous avons alors mis en évidence une corrélation significative entre la concentration en Gd et la concentration en Fe, structure par structure, pour le gadodiamide et le gadobénate (Publication 2). Chez l'Homme, il a été noté qu'avec un nombre d'injections de chélates linéaires de Gd et donc une dose cumulée croissante, de nouvelles structures cérébrales présentaient progressivement un rehaussement du signal T1 (Zhang, 2017). Or, ces structures ont pour particularité commune d'être parmi les plus riches en fer (Hallgren, 1958 ; Höck, 1975 ; Hasan, 2012) : après le *globus pallidus* et le noyau dentelé, apparaissent le noyau rouge, la substance noire, le noyau caudé, le thalamus, le *putamen*. Si l'on considère que cette observation, commune à l'Homme et au Rat, n'est pas une simple coïncidence, plusieurs cas sont envisageables.

Le fer pourrait intervenir dans le phénomène de transmétallation, s'échanger localement avec le Gd, favorisant ainsi l'association de ce dernier à une molécule ou une entité endogène, et donc son accumulation. Cependant, pour participer à la transmétallation, le fer doit être labile, alors que nous mentionnions précédemment des concentrations de fer total. La part labile du fer (0,5 à 1,5  $\mu$ M au niveau intracellulaire dans le cerveau) est très faible par rapport au fer total (Cabantchik, 2015). Les constantes d'affinité du complexe ligand-Fe sont souvent supérieures à celles mesurées pour le complexe ligand-Gd ( $\log K_{\text{cond}} \text{ DTPA-Fe} = 23,4$  contre 17,7 pour DTPA-Gd, par exemple) (Port, 2008). Cependant, une transmétallation avec le Fe suppose une concentration locale de fer libre suffisante. Néanmoins, l'homéostasie du pool de fer labile est finement contrôlée, et on peut s'imaginer que des cellules ayant des stocks de fer mobilisable, entretiennent le phénomène en continu. L'absence de données sur les concentrations et les localisations des pools labiles de Fe dans les structures d'intérêt rend délicat une conclusion sur ce point.

Une autre option est que le Gd se retrouve concentré aux mêmes endroits que le fer parce qu'il emprunte les mêmes voies d'accès. Cela supposerait que le Gd, pour être accumulé, doit s'être préalablement déchélaté, et doit rester sous sa forme ionique, ou bien se lier aux protéines de transport du fer. Or



il a été décrit que le  $Gd^{3+}$  a la capacité de se lier à la transferrine, tout comme  $Al^{3+}$  ou  $Mn^{3+}$ , mais avec une faible affinité en comparaison avec celle de  $Fe^{3+}$  (Zak, 1988 ; Schmitt, 2011). Dans le cas du gadodiamide (ou DTPA-BMA-Gd), cela aboutirait à l'équation suivante :



(où Tf = transferrine).

La constante de stabilité thermodynamique de DTPA-BMA-Fe est supérieure à celle du DTPA-BMA-Gd (ou gadodiamide) ( $\log K_{\text{therm}}$  de 21,9 et 16,9 respectivement) (Port, 2008). Toutefois, il existe deux sites de liaison du fer  $Fe^{3+}$  avec la transferrine. Leurs constantes de stabilité thermodynamique sont élevées ( $\log K_{\text{cond}}(1) = 20,2$  et  $\log K_{\text{cond}}(2) = 39,3$ ) (Motekaitis, 1992). Un phénomène de transmétallation impliquant le premier site de liaison du fer sur la transferrine est, en théorie, envisageable mais nullement démontré.

Associé à la transferrine, le Gd pourrait directement traverser la BHE (Jefferies, 1984 ; Kissel, 1998), comme cela a été décrit pour le  $Mn^{3+}$  (Aschner, 1994).

Enfin, les noyaux cérébelleux profonds et le *globus pallidus* étant anatomiquement proches de ventricules cérébraux, une explication complémentaire pourrait consister en la proximité du liquide céphalorachidien avec ces structures. C'est, par exemple, l'une des hypothèses pour la toxicité du plomb dans l'hippocampe (Zheng, 2001). Après que le  $Pb^{3+}$  ait traversé les plexus choroïdes et se soit retrouvé dans le LCR, il s'accumule dans l'hippocampe, d'accès aisé depuis le LCR, et il y induit une toxicité, se manifestant cliniquement par des troubles mnésiques. Chez le Rat, on notera que les bulbes olfactifs baignent aussi dans le LCR.

Cependant, cette proximité anatomique des structures accumulant le Gd avec le LCR n'explique pas tout, puisqu'une diffusion simple n'explique pas cette distribution, qui favoriserait l'accumulation en périphérie du cortex cérébral et cérébelleux par exemple. De plus, le tronc cérébral, situé juste au-dessous du 4<sup>e</sup> ventricule et des DCN, est peu concerné par l'accumulation.

En cartographie par fluorescence X, le Gd était présent de façon éparse dans toute la zone étudiée des DCN, mais principalement accumulé dans des structures allongées que nous supposons être vasculaires. Fingerhut, à l'aide de coupes chez l'Homme scannées en LA-ICP-MS à haute résolution (4-7  $\mu\text{m}$ ), a également trouvé une forte concentration de Gd dans des (ou autour de) vaisseaux dans le noyau dentelé, avec des concentrations moyennes de 150  $\mu\text{g/g}$ , soit près de 1  $\mu\text{mol/g}$ , contre seulement 25  $\mu\text{g/g}$  dans la substance blanche environnante. La densité vasculaire y est bien plus élevée que dans la substance blanche, pouvant expliquer cette différence de concentration (Fingerhut, 2018b, données supplémentaires).

Chez le Rat adulte, la densité microvasculaire est identique dans les 3 couches du cortex (Koppel, 1981). Donc, la simple séquestration de Gd au niveau des vaisseaux ne peut expliquer le fait que la couche granulaire soit privilégiée. Dans la zone des noyaux cérébelleux profonds du Rat, il semble que le Gd soit plutôt localisé sur la partie dorsale que ventrale (données LA-ICP-MS, présentées en Annexe 4). Nous disposons cependant d'aucune donnée concernant la microvascularisation des DCN chez le Rat. Il aurait été judicieux, dans nos études, de prélever spécifiquement le système vasculaire (par des techniques dites de déplétion capillaire), pour déterminer la proportion de Gd accumulée dans l'espace vasculaire, et celle réellement accumulée dans le parenchyme cérébral.

Par ailleurs, on peut noter que du Gd a aussi été identifié dans un vaisseau sanguin cutané étudié en LA-ICP-MS (Clases, 2019). Il est donc possible que les constituants de la BHE, outre les cellules endothéliales, ne soient pas indispensables pour l'accumulation de Gd au niveau vasculaire.



## F. Localisation subcellulaire du Gd

En microscopie électronique (Publication 3), nous avons identifié du Gd dans les lames basales de vaisseaux et dans l'interstitium principalement, ce qui est certainement cohérent avec l'accessibilité des vaisseaux et de l'interstitium aux chélates de Gd, contrairement aux compartiments intracellulaires. Nous en avons tout de même parfois identifié dans l'espace intracellulaire, dans des cellules gliales mais jamais dans des neurones, contrairement à ce qui a déjà été rapporté par ailleurs (McDonald, 2017b). Les cellules microgliales n'ont dans notre cas jamais été identifiées, et nous ne pouvons donc conclure quant à la présence de Gd à ce niveau.

Dans les cellules gliales, les dépôts de Gd étaient présents au sein de pigments de lipofuscine. Ces pigments sont constitués de débris lipidiques et protéiques, produits de vacuoles autophagiques ayant fusionnées avec des lysosomes pour dégrader leurs constituants, et ils ne sont pas dégradables. Leur nombre s'accumule ainsi avec le temps, dans les neurones et cellules gliales. Ils sont riches en métaux de transitions, comme Cu, Zn, Mn, Ca, mais surtout en Fe (Milward, 2011). Nous n'avons aucun moyen de savoir si le Gd s'est lié au pigment déjà formé, ou s'il s'est retrouvé dans ces pigments après digestion de protéines auxquelles il aurait été associé. La formation de pigments de lipofuscine peut être vue comme un système de réponse protectrice, car sa formation augmente en cas de stress oxydatif (Brunk, 2002). Les astrocytes, en réponse à une augmentation anormale de métaux, séquestrent ces métaux exogènes, protégeant ainsi l'endothélium et le reste de la BHE (Zheng, 2002). De plus,  $Gd^{3+}$  pouvait entrer dans des cellules C6 et HTC (issues de gliome et d'hépatome), tandis que l'ajout de phosphate au milieu de culture, entraînant la formation de  $GdPO_4$ , réduit significativement cette internalisation (Cabella, 2006). Les chélates de Gd pourraient également rentrer en toute petite quantité, de façon non-spécifique, par pinocytose par exemple (Cabella, 2006).

Cette localisation intracellulaire et gliale est aussi cohérente avec l'hypothèse d'une circulation glymphatique, si le Gd parvient effectivement à y accéder à travers les aquaporines.

## G. Spéciation du Gd : sous quelle forme est-il accumulé ?

Il convient maintenant d'élucider la forme d'accumulation du Gd à moyen et long terme.

Commençons par les noyaux cérébelleux profonds. Une quantité non négligeable de Gd y est accumulée, essentiellement avec les chélates linéaires de Gd. Cela est associé à un effet de raccourcissement du T1, ainsi que des temps de relaxation T2 et T2\*, comme nous l'avons noté à 11,7 T. Les profils NMRD indiquent que les plus hauts champs sont plus sensibles aux relaxations transversales, tandis que les plus bas champs aux relaxations longitudinales. Il est donc cohérent que l'effet T2/T2\* soit plus difficilement vérifié dans nos études réalisées à 4,7 T. Le fait que l'on ait observé ces trois effets (T1, T2 et T2\*) de manière distincte selon les champs utilisés, peut être attribué à la présence de Gd toujours chélaté (surtout T1/T2). Cela peut aussi refléter la présence de Gd dissocié, mais soluble et, par exemple, associé à des macromolécules. Il n'est pas non plus totalement exclu que le complexe de Gd entier soit lié à une protéine, comme pour le gadobénate. Les effets sur les relaxations engendrés par ces espèces seraient croissants dans l'ordre suivant : chélate de Gd intact < chélate de Gd-Protéine ≤ Gd-Protéine (dépendant de l'accès aux protons). Enfin, l'effet T2\* peut témoigner de la présence de dépôts insolubles de Gd. En effet, en microscopie électronique, nous avons observé la présence de Gd que nous supposons insoluble. En effet, les nombreux bains de solvants et la déshydratation subis pendant la préparation sont censés éliminer toute espèce soluble. Cela est discuté par une autre équipe, qui a retrouvé des concentrations qualitativement semblables dans des échantillons inclus en paraffine puis déparaffinés ou en cryofixation (Fingerhut, 2018a). Ils expliquent cependant cela par le fait que la grande majorité des dépôts de Gd seraient insolubles, puisque la distribution du Gd semble superposée à celle du phosphore (Fingerhut, 2018b). Les dépôts de Gd observés, sous la forme de





ce que l'on a qualifié d' « oursins », laissent également à penser qu'il s'agit de Gd insoluble. Des dépôts d'aspect similaire ont été observés dans une étude *in vitro*, caractérisés comme étant du  $Gd_2O_3$  (Li, 2014). Grâce à la technique NanoSIMS, nous y avons identifié la présence franche de phosphore, ce qui suggère la présence de  $GdPO_4$  par exemple. Cependant, les analyses de pertes d'énergie indiquaient aussi parfois la présence d'azote et de calcium au niveau de ces dépôts. Il n'est pas impossible que du Gd insoluble, apparaissant au sein des structures en oursins sous forme de petits points plus opaques, soient emprisonnés dans une structure protéique. Ces dépôts de Gd ne devraient pas présenter d'effets T1 et T2, mais potentiellement un effet T2\*.

La mesure de la vitesse de relaxation longitudinale R1 dans les différentes matrices, permettant l'accès à la relaxation  $r_1$  après soustraction du R1 diamagnétique, et division par la concentration totale en Gd, n'a pas permis de fournir des données cohérentes. Les R1 présentés ici sont donc interprétables seulement de façon qualitative. Nous avons tenté une approche de quantification par la technique de relaxométrie, *ex vivo*. Les concentrations de Gd étaient trop faibles pour nous permettre de conclure.

Il n'est donc pas impossible que différentes espèces de Gd coexistent au sein des noyaux cérébelleux profonds, mais en partie soluble, responsable de l'effet T1 net en imagerie.

Les travaux de Fingerhut suggèrent cependant que le Gd serait en grande majorité insoluble, associé à du phosphore. Les mêmes observations sont faites dans au niveau des noyaux gris centraux du télencéphale (Fingerhut, 2018b). Dans ce cas, l'hypersignal T1 observé est plus difficilement explicable.

Les chélates de Gd macrocycliques s'y stockent bien moins, et n'engendrent pas d'effet T1. Il est difficile d'en conclure quant à leur forme, puisque la faible concentration explique certainement l'absence d'effet T1.

La spéciation quantitative du Gd après administrations du gadotéridol macrocyclique ou du gadodiamide linéaire, administrés de façon répétée chez le Rat, a été réalisée au moyen de LC-ICP-MS et d'ICP-MS. Dans le cas du gadodiamide, les espèces insolubles de Gd (53%) et le chélate intact (18%) mesurées dans le cervelet permettent d'estimer à environ 30% la proportion de Gd présent sous forme dissociée dans la fraction soluble (Gianolio, 2017). Ce Gd dissocié et probablement lié à des macromolécules est probablement responsable de l'essentiel de l'effet T1, la concentration de gadodiamide mesurée (1  $\mu M$ ) étant trop faible pour expliquer cet effet. Dans le cas du gadotéridol macrocyclique, gadotéridol (macrocyclique), la totalité du Gd retrouvé 3 jours après la fin des injections était sous forme chélatée (Gianolio, 2017).

Ces travaux ont fait suite à une première étude (Frenzel, 2017) qui a comparé la spéciation de Gd chez le Rat soit 3 jours soit 24 jours après la dernière administration de gadodiamide, gadobénate, gadopentétate, gadobutrol et gadotérate. Les macrocycliques sont restés sous forme intacte tout au long de l'étude alors que, dans le cas des chélates linéaires de Gd, une proportion importante du Gd était retrouvée dans la fraction insoluble et que, dans la fraction soluble, environ 15-20% du Gd était associé à des macromolécules au délai 24 jours (Frenzel, 2017).

Enfin, une autre étude, réalisée uniquement sur le cervelet de rats, a aussi documenté la cinétique de l'accumulation des différentes espèces de Gd. En effet, un suivi a été réalisé 1, 3, 5 et 12 mois après la période d'injection (20 injections de gadodiamide ou de gadotérate sur 5 semaines) (Robert, 2018a). La présence d'espèces de Gd de hautes masses moléculaires a été étudiée à l'aide de la SEC-ICP-MS. L'analyse de la spéciation a confirmé qu'avec le composé macrocyclique, la totalité du Gd retrouvée dans la fraction soluble (ici environ 70%) est sous forme chélatée, et qu'elle le reste au cours du temps. Pour le gadodiamide, seuls 4 à 5% du Gd sont retrouvés dans la fraction soluble, la majorité restant piégée dans le culot sous une forme indéterminée. De cette faible proportion, une partie a été identifiée comme étant encore chélatée, tandis qu'une autre, proportionnellement croissante avec le temps, s'est révélée être liée à des macromolécules, de taille supérieure à 66,5 kDa. La différence des rendements d'extraction dans la phase



soluble entre les deux produits indique soit une différence de localisation ne permettant pas son extraction, soit une différence de formes (ce qui semble plus probable). Nous ne pouvons pas en déduire pour autant qu'il s'agisse de Gd insoluble. Il semblerait que du Gd provenant du gadodiamide ait la capacité de se lier à des macromolécules, ce qui n'est pas observé avec le gadotérate. Le fait que la proportion associée à des macromolécules augmente avec le temps peut signifier que du Gd accumulé s'associe à ces dernières au cours du temps, ou bien que le chélate de Gd intact soit éliminé plus facilement que celui associé à des macromolécules.

En ce qui concerne le Gd observé dans le cortex cérébelleux, sa concentration mesurée en LA-ICP-MS est similaire dans la couche granulaire et les noyaux cérébelleux profonds, chez le Rat (Lohrke, 2017 ; Jost, 2018). La présence de Gd dans le cortex granulaire du cervelet a aussi été démontrée chez l'Homme (Roberts 2017). Aucun effet T1 n'y a pourtant été mis en évidence, mais nous avons observé un effet T2 et T2\* à plus haut champ. Cela peut encore une fois témoigner de la présence de Gd soluble, mais n'explique pas le manque de sensibilité en T1 à plus bas champ (nos mesures à 4,7 T). En microscopie électronique pourtant, nous y avons observé des dépôts insolubles de Gd, dans les lames basales de microvaisseaux seulement, et en moins grande quantité que dans les DCN pour le gadodiamide et jamais pour le gadobénate. Du Gd insoluble y serait donc présent, mais en plus faible proportion que dans les DCN. Comme nous l'avons indiqué plus haut, aucune différence de vascularisation n'a été rapportée au sein des couches de cortex cérébelleux, et ces dépôts de Gd ne sont probablement pas représentatifs du Gd observé sur les coupes de LA-ICP-MS. Il est donc possible que le Gd à ce niveau ait été sous forme soluble et éliminé lors de la préparation.

Pour ce qui concerne les plexus choroïdes, nous ne disposons que de peu d'éléments. Le dosage de Gd par ICP-MS fait de ces structures la 4<sup>e</sup> principale zone d'accumulation chez le Rat. Lors de leur prélèvement, il est quasiment certain que les capillaires de ces structures soient aussi prélevés. Du Gd accumulé et piégé à ce niveau pourrait expliquer ce résultat. En microscopie électronique, nous n'avons observé que peu de Gd insoluble à ce niveau, juste dans la membrane basale du côté apical des cellules endothéliales et épithéliales. Zheng et coll. parlent d'une « séquestration » de certains ions métalliques dans les plexus, il est donc probable qu'il s'agisse de Gd<sup>3+</sup>, déchélaté, qui reste capturé dans les plexus, sous forme soluble. Le Cd pourrait se lier aux métallothionéines des plexus (Zheng, 2002). L'intoxication par le Cd entraînerait aussi une augmentation des métallothionéines dans les plexus choroïdes et les astrocytes (Nishimura, 1992 ; Kramer, 1996).

Pour les autres structures, notamment télencéphaliques, nous ne pouvons que spéculer sur la forme et la localisation du Gd.

Des études ont cependant récemment étudié la spéciation du Gd de façon plus large, dans le cervelet, le cortex cérébral et la partie sous corticale du télencéphale (Gianolio, 2017 ; Robert, 2018a).

Dans l'étude de Gianolio citée précédemment et réalisée chez le Rat, pour le gadodiamide, seuls 4-5% du Gd total mesurée étaient retrouvés sous forme intacte dans le télencéphale, tout le reste étant dans le culot et donc supposé insoluble (Gianolio, 2017).

La cinétique d'élimination, ainsi que les molécules susceptibles de lier le Gd, seront discutées ultérieurement.

En plus de la concentration et la localisation, nous pouvons poser l'hypothèse que, selon la forme du Gd séquestré, la toxicité locale sera différente. L'évaluation de cette potentielle neurotoxicité fera l'objet de la partie suivante.



## H. Choix de la zone de référence pour l'évaluation du rehaussement en IRM

L'apparition d'un rehaussement du signal T1 de structures cérébrales à la suite d'administrations répétées de chélates de Gd a été quantifiée par le rapport du signal sur celui d'une zone de référence. Cette dernière ne présente bien entendu pas de rehaussement T1 visible à l'œil nu, et est présente sur la même coupe IRM que les structures d'intérêt. Ont ainsi été initialement choisies en clinique, le pont pour le noyau dentelé, et le thalamus pulvinaire pour le *globus pallidus*. En préclinique, le pont étant bien plus petit et n'étant pas situé sur les coupes qui comporte les DCN, le rapport a été classiquement effectué contre le signal du tronc cérébral. Il convient cependant de discuter du choix de cette zone de référence.

Les rapports de signal ainsi calculés ont permis de mettre en évidence un rehaussement avec les chélates linéaires, et très rarement avec les chélates macrocycliques (voir les tableaux cliniques en Annexes 1 et 2). Cependant, comme nous l'avons vu, l'accumulation de Gd a été mise en évidence dans toutes les structures cérébrales, certes en proportions différentes selon la structure. Aucune zone ne peut donc être parfaitement considérée comme étant une zone de référence. Nous avons remis en doute la pertinence du tronc cérébral dans une de nos études (Publication 1), en présentant également le rapport de signal des DCN sur le parenchyme cérébelleux environnant. Cependant, le rehaussement du signal T1 croissant avec le temps, est apparu moins évident quand le rapport était effectué sur le signal du cortex cérébelleux. Nous avons ainsi conclu que la référence sur le tronc était meilleure. Les concentrations de Gd total étaient en effet environ 2 fois plus faibles dans le tronc cérébral que dans le cortex cérébelleux. Néanmoins, comme nous l'avons évoqué, la répartition du Gd dans le cortex cérébelleux n'est pas homogène. Le Gd y est bien plus concentré dans la couche granulaire. Même si aucune évidence de rehaussement franc du cortex cérébelleux n'a ainsi été notée, ce moins bon rapport du signal des DCN contre cette zone est une preuve indirecte de son léger rehaussement T1 au cours du temps. Nos travaux ont, par la suite, toujours été rapporté au signal du tronc cérébral. Pour être encore plus justes, nous avons réalisé des essais contre des tubes fantômes, placé à côté de la tête des rats dans l'antenne de l'IRM. Ces tubes contenaient du gadotérate à la concentration de 25  $\mu\text{mol/L}$ . Nous pensions ainsi pouvoir corriger ce biais. Cependant, alors que 2 tubes étaient placés et présents sur nos coupes, le signal de l'un et de l'autre différaient parfois de façon significative, et les courbes se référant à ces signaux n'ont pas présenté le rehaussement T1 de façon exemplaire. Ces essais n'ont donc pas été pris en compte. L'absence de raccourcissement des temps T2 et T2\* du tronc cérébral, étudié à 11,7 T (présenté en Partie II) témoigne tout de même que cette référence semble peu affectée par la présence de Gd. Néanmoins, une étude rétrospective clinique très récente a comparé les signaux de différentes zones, par rapport à celui du thalamus pulvinaire et à la substance blanche du cortex frontal (Kelemen, 2018). En comparant ces rapports entre groupes de patients ayant reçu des nombres d'administrations différents de gadobutrol, les auteurs ont mis en évidence une augmentation des rapports de signal du globus pallidus, du putamen, du noyau caudé, du noyau dentelé et du thalamus pulvinaire, avec un nombre d'injections croissant, quand la zone de référence choisie était la substance blanche frontale, et non le thalamus pulvinaire habituellement utilisé. C'est la première étude rapportant clairement un hypersignal T1 à la suite d'administrations d'un agent macrocyclique. Ainsi, près de 4 ans après le début de l'étude du phénomène, ces auteurs suggèrent que la zone de référence classiquement choisie peut être à l'origine d'interprétations biaisées. Il reste cependant que, quand les deux catégories de produits sont comparées dans des conditions strictement similaires, ce qui est encore plus simple dans les études précliniques, la différence entre agents linéaires et macrocycliques est manifeste et très reproductible.



## Partie III : Evaluation des conséquences neuro-toxicologiques de cette accumulation

### Chapitre 1 : Voies de signalisation et fonctions du *globus pallidus* et des noyaux cérébelleux profonds

#### A. Les noyaux gris centraux

##### 1. Fonction des noyaux gris centraux

Les noyaux gris centraux assurent, pour leur fonction principale, le contrôle fin de l'information sensori-motrice (Marsden, 1982 ; Mink, 1996). Cependant, au fil des années, on a découvert leur implication dans les voies fonctionnelles associatives (informations relevant du domaine cognitif, en général préalables à l'exécution de l'action, comme la planification et l'anticipation des différentes phases de cette dernière), et limbiques (traitant des émotions et de la motivation) (Middleton et Strick, 2000 ; Temel, 2005), parfois à travers des travaux réalisés chez des patients parkinsoniens (Nassery, 2016 ; Gillies, 2017). Le *globus pallidus* interagit avec les autres noyaux pour assurer un rôle d'intégration des signaux en provenance du cortex cérébral. Il est principalement responsable de l'inhibition du noyau pédonculopontin du tronc cérébral, et du thalamus, qui renvoie l'information au cortex.

Les noyaux gris centraux sont compartimentés en différents territoires selon les axes antéro-postérieur et dorso-ventral), intervenant selon que les informations proviennent de l'une ou l'autre des zones corticales (motrice, oculomotrice, préfrontale, cingulaire...) (Alexander, 1990). Cependant, ils assurent tous l'intégration complexe des mêmes grandes voies signalétiques : les boucles cortico - noyaux gris centraux – thalamo – corticales.

##### 2. Connexions des noyaux gris centraux

Trois grandes voies de signalisation s'organisent de façon parallèle autour du *globus pallidus* et des noyaux gris centraux. Elles comportent des fibres afférentes et efférentes, et résultent en l'intégration de messages complexes et contradictoires, inhibiteurs et excitateurs. Elles sont représentées sur la Figure 75.

En effet, la plupart des neurones des noyaux gris centraux synthétisent le GABA, principal neurotransmetteur inhibiteur, et sont donc dits « GABAergiques ». Cependant, le noyau sous-thalamique possède des neurones excitateurs, qui ont pour neurotransmetteur le glutamate. Les neurones de la substance noire compacte synthétisent, quant à eux, la dopamine, également excitatrice.

La première des voies signalétiques est appelée voie **directe**. Elle consiste en la projection directe inhibitrice du *striatum*, principale voie d'entrée des noyaux gris centraux (depuis le cortex surtout, mais aussi le *thalamus* et la substance noire compacte (SNc)), sur le *globus pallidus* interne (GPe) et la substance noire réticulée. Ceux-ci inhibent en retour le thalamus, qui, quant à lui, active des zones corticales. La double inhibition successive de cette voie résulte donc en la synthèse de glutamate excitateur par le *thalamus* vers les projections corticales.



La seconde est dite **indirecte**. Elle implique, avant de rejoindre la voie directe, le *globus pallidus* externe (GPe) et le noyau sous-thalamique (STN). Le striatum, en inhibant la transmission GABAergique du *globus pallidus* externe, va activer la voie glutamatergique du noyau sous-thalamique. Celui-ci renforcera alors l'effet inhibiteur du *globus pallidus* interne (GPI) et de la substance noire réticulée (SNr) sur le thalamus.

Une troisième voie, dite **hyperdirecte**, relie directement le cortex au noyau sous-thalamique, qui constitue ainsi une autre voie d'entrée des noyaux gris centraux. Les projections du cortex et celles du noyau sous-thalamique sont glutamatergiques, de telle façon que l'activation de cette voie va renforcer, elle aussi, l'inhibition du thalamus par le *globus pallidus* interne et la substance noire réticulée (Nambu, 2002).

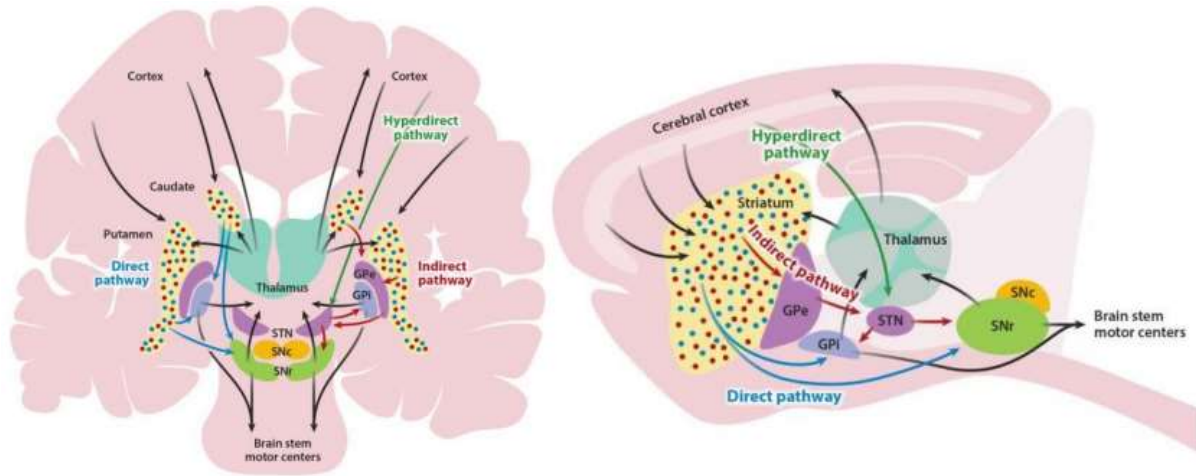


Figure 75 : Structures des noyaux gris profonds et leurs connexions via trois grandes voies (directe, indirecte et hyperdirecte). Coupe coronale à droite, sagittale à gauche, schématisant respectivement l'organisation structurelle du Primate et du Rongeur (Nelson et Kreitzer, 2014). Les abréviations sont explicitées un peu plus haut dans le texte.

Si l'on résume ces 3 voies, la voie directe lève l'inhibition des efférences des noyaux gris centraux, et est donc activatrice du mouvement, ou plutôt désinhibitrice. La voie indirecte va, au contraire, inhiber le mouvement, par l'activation des voies GABAergiques (Figure 76). La voie hyperdirecte, enfin, renforcera cette voie inhibitrice, ayant pour effet, en quelque sorte, de stopper le mouvement.

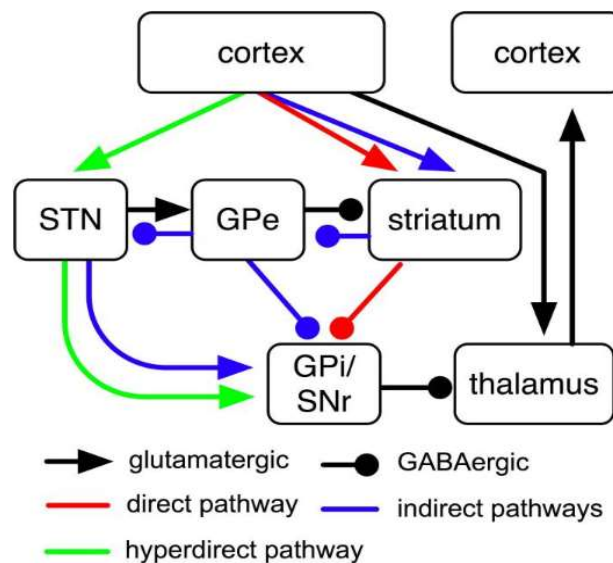


Figure 76 : Connectivités des noyaux gris centraux au sein de la boucle cortico – noyaux gris centraux – thalamo – corticales, **avec le *globus pallidus* en son centre**. Le contrôle des voies principales serait initialement dopaminergique, puis GABAergique (Schroll, 2013). Les abréviations apparaissent plus haut dans le texte.





La réalisation de mouvements finement planifiés sera alors assurée par l'intégration continue de ces voies, permettant l'orientation de certains mouvements, et inhibant d'autres mouvements non désirés.

## B. Les noyaux cérébelleux profonds

### 1. Connexions des noyaux cérébelleux profonds

Afin d'assurer les fonctions motrices tout en traitant des informations cognitives, le cervelet est au cœur de nombreuses connexions. Le cortex cérébelleux reçoit les informations de la part des systèmes sensorimoteurs et cognitifs, le relai est fait aux noyaux cérébelleux, véritable carrefour du traitement de l'information. Les DCN sont impliqués dans un grand nombre de réseaux, impliquant le striatum, le noyau thalamique, l'hypothalamus, et le cortex sensorimoteur et associatif en retour (Manto, 2010a). La Figure 77 explicite les connexions des noyaux cérébelleux profonds avec ces structures.

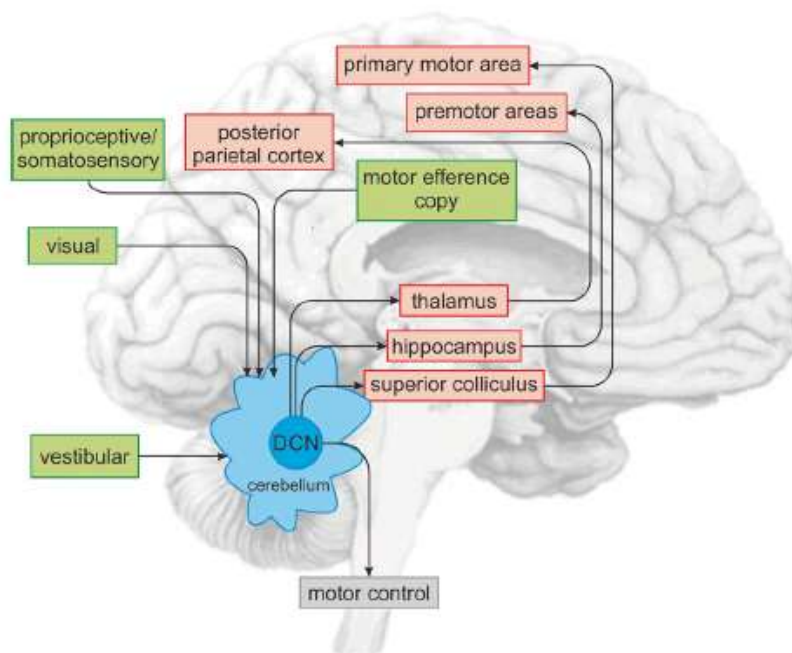


Figure 77 : Le cervelet intègre des projections de multiples systèmes sensitifs (en vert). Les neurones sortant du cervelet par les noyaux cérébelleux profonds (DCN), projettent vers le thalamus, l'hippocampe, le collicule supérieur, eux même connectés aux régions corticales motrices du cerveau (en rouge) (Baumann, 2015)

Les DCN représentent un véritable carrefour, seule voie de sortie du cervelet vers le mésencéphale et le télencéphale, sur lequel ils exercent un rétrocontrôle grâce à des voies efférentes inhibitrices (voie GABAergique) et excitatrice (voie glutamatergique). Ils intègrent, au sein du cervelet, des informations en provenance des cellules du cortex cérébelleux par les cellules de Purkinje (voie inhibitrice GABAergique), ainsi que des fibres moussues et des fibres grimpantes (fibres glutamatergiques excitatrices) (Figure 78).



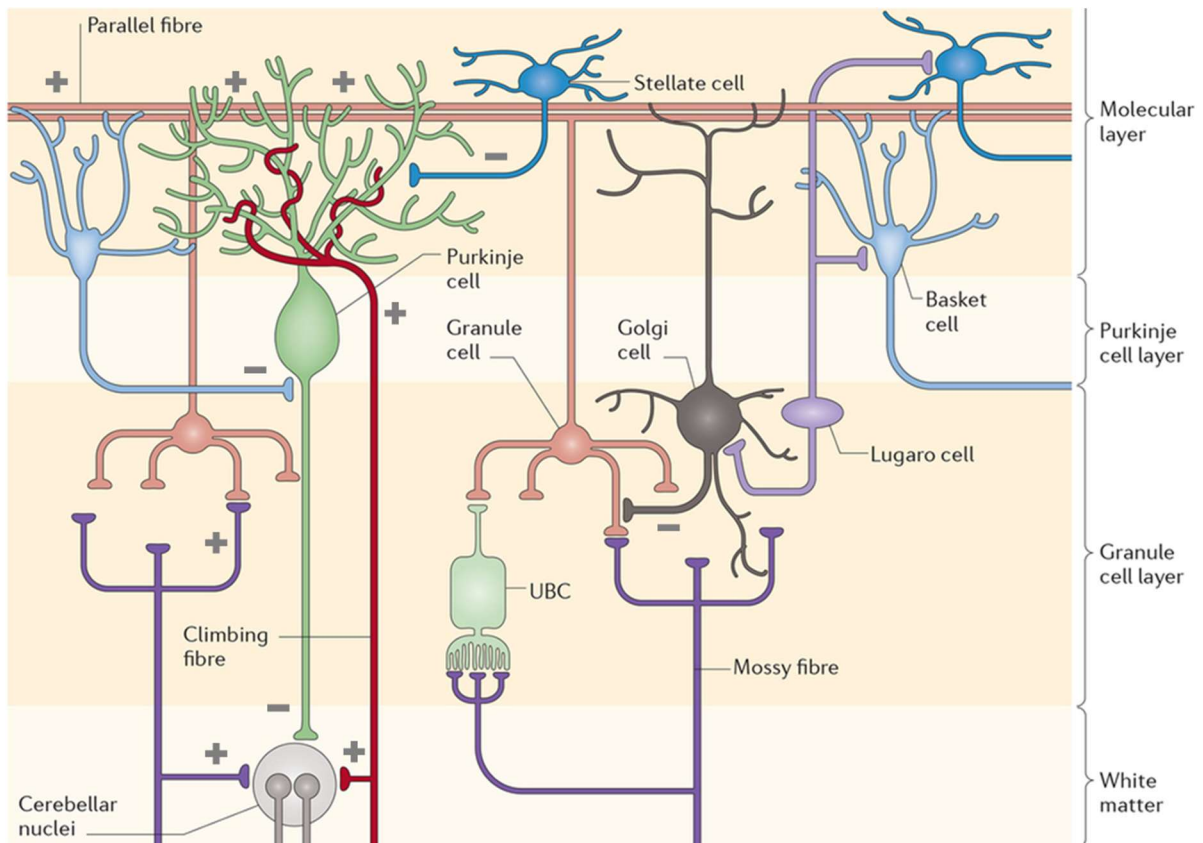


Figure 78 : Cytoarchitecture du cervelet : organisation en microzones (UBC : « unipolar brush cell », ou cellule unipolaire en brosse). Les fibres grimpantes (en rouge), proviennent de l'olive bulbaire du tronc cérébral, et les fibres moussues des autres noyaux du tronc et de la moelle épinière (Cerminara, 2015).

Le cervelet joue un rôle essentiel dans la coordination, l'ajustement, la planification et l'automatisation des mouvements, dans la modulation des réflexes ou encore dans certaines fonctions cognitives, comme nous l'avons précédemment indiqué. Il va donc devoir recueillir des informations à la fois motrices et sensorielles, provenant aussi bien du cortex cérébral que du reste du corps. Ces informations sont relayées vers le cortex cérébelleux et les DCN *via* les fibres grimpantes et les fibres moussues (Thèse Chaumont J, 2014).

- Des **fibres moussues pontines** assurent le relai des **informations motrices cérébrales**, qui se rejoignent au niveau du noyau pontin *via* les fibres corticopontines. Leur voie d'entrée dans le cervelet est le pédoncule cérébelleux moyen (Figure 79 A).
- Les **fibres moussues du faisceau spinocérébelleux et les fibres grimpantes**, quant à elles, assurent une sorte de « **feedback** » en provenance du **système nerveux périphérique**. Elles relaient, en effet, respectivement les informations provenant de l'olive inférieure du bulbe, et celles de la moelle et des autres noyaux du tronc (Figure 79 A). Leur voie d'entrée est le pédoncule cérébelleux inférieur.
- Une fois l'ensemble des informations motrices et périphériques intégrées, les **fibres efférentes des DCN** passent par le pédoncule cérébelleux supérieur. Elles projettent d'une part vers le **noyau rouge** du mésencéphale, qui fait un retour à l'olive bulbaire inférieure puis au noyau dentelé : c'est la boucle olivo-cortico-nucléaire. D'autre part, des fibres font synapse avec le **thalamus** qui assure un rétro-contrôle de l'information au cortex moteur, corrigeant ainsi le mouvement : c'est la boucle rétroactive cérébello-thalamo-corticale (Cerminara, 2015) (Figure 79 B).



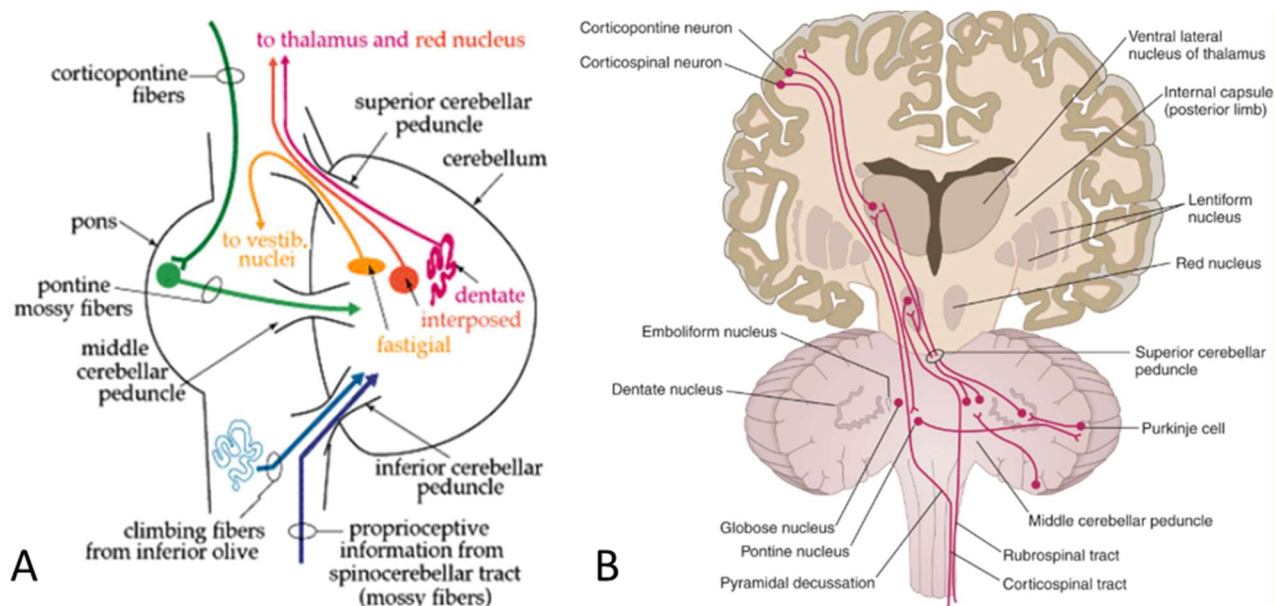


Figure 79 : (A et B) Principales fibres afférentes et efférentes des noyaux cérébelleux profonds chez l'Homme et leurs voies d'accès. Elles forment deux boucles aux fonctions rétroactives, avec le thalamus et le cortex moteur d'une part ; le noyau rouge et l'olive bulbaire d'autre part (site internet 15).

## 2. Fonction des noyaux cérébelleux profonds

Le rôle des noyaux cérébelleux profonds, incluant le noyau dentelé, est similaire à celui des noyaux gris centraux et du globus pallidus. Il est en effet responsable de la planification, de l'initiation et du contrôle des mouvements volontaires. Cependant, comme c'est aussi le cas des noyaux gris centraux, on lui décrit de plus en plus de fonctions non-motrices, dans la douleur, les émotions, l'addiction, ou les fonctions visuo-spatiales (Strick, 2009 ; Koziol, 2012 ; Schmahmann, 2010).

- Le **noyau dentelé** est impliqué dans la force d'agrippement, l'initiation et le contrôle fin des mouvements volontaires des extrémités (Manto, 2012a), et dans l'apprentissage de compétences motrices et la planification (Manto, 2010a). En effet, alors qu'il est peu activé au cours des tâches motrices simples (Küper, 2011), son activation est déclenchée par la complexité des tâches, surtout lors de celles impliquant la discrimination sensorimotrice (Habas, 2009). L'analyse de ses connectivités fonctionnelles suggère son implication dans l'attention, la mémoire de travail, le raisonnement procédural (la représentation et l'exécution de plans et de procédures) et même dans la détection de la satiété (Habas, 2010).
- Le **noyau fastigial** serait responsable du contrôle du mouvement des yeux, de l'orientation de la tête, de la posture et la fluidité de la démarche (Manto, 2012a ; Martin, 2000).
- Le **noyau interposé** (composé du noyau globuleux et du noyau emboliforme) a un rôle de modulation des réflexes, de rétroaction sensorielle, de la vitesse des mouvements et enfin de l'estimation des distances (Casabona, 2010).

Le cortex cérébelleux modulerait toutes ces fonctions. On sait notamment que le codage temporel (la définition d'une référence temporelle permettant la synchronisation d'évènements) est assuré



par la couche granulaire du cortex (D'Angelo et De Zeeuw, 2009). Le cortex cérébelleux serait aussi impliqué dans le langage (Marien, 2014). Le contrôle des mouvements des membres supérieurs serait assuré par les lobules IV à VI, tandis que ceux des membres inférieurs, par les lobules III et IV (Manto, 2012a).

### 3. Communication fonctionnelle entre les noyaux cérébelleux profonds et les noyaux gris centraux.

Les deux ensembles structuraux impliqués dans la capture cérébrale de Gd seraient en étroite interaction, selon des modalités qui restent encore à préciser (Bostan et Strick, 2018). Cette communication existerait à la fois pour les fonctions motrices et non motrices. Cela devrait, dans l'avenir, permettre de mieux comprendre la contribution des circuits cérébelleux dans les pathologies impliquant les noyaux gris centraux (Maladie de Parkinson, dystonies).



## Chapitre 2 : Troubles neurologiques associés à ces structures

Le noyau dentelé et le *globus pallidus* sont donc impliqués dans des boucles fonctionnelles de régulation de la coordination motrice fine, impliquant la gestion des notions de distances, de vitesse, de planification. Ces voies sont également reconnues pour leurs implications dans les fonctions cognitives, mais aussi la parole, la vision, la personnalité et l'humeur.

L'accumulation d'un métal exogène, le gadolinium, dans ces structures, pourrait ainsi se traduire par des signes de neurotoxicité, infracliniques ou cliniques. Les manifestations cliniques connues de l'atteinte de ces structures sont résumées ci-dessous.

### A. Manifestations cliniques de la lésion du noyau dentelé et du cervelet

Le cervelet peut être la cible de nombreux agents toxiques, solvants, aérosols, pesticides, métaux, alcool et agents stupéfiants (Manto, 2012b). Les DCN sont notamment la cible privilégiée du métronidazole (agent antibiotique/antiparasitaire). Ils sont aussi impliqués dans le cadre de certaines pathologies infectieuses, inflammatoires, neurodégénératives, et métaboliques (Khadilkar, 2016). Une accumulation de métaux intervient dans plusieurs cas : neurodégénérescence associée à une accumulation de fer ; maladie de Wilson, causée par un dépôt progressif de cuivre et associée à des hypersignaux du noyau dentelé en IRM FLAIR (Woimant, 2010) ; syndrome de Fahr, une pathologie rare caractérisée par des calcifications localisées dans les noyaux gris centraux et le noyau dentelé, le plus souvent associées à des troubles du métabolisme phosphocalcique. Les DCN y sont cependant rarement la seule zone atteinte, ni même la zone prioritaire. En effet, ces pathologies sont surtout connues pour leur atteinte du *globus pallidus*, notre deuxième structure d'intérêt privilégié.

#### 1. Syndromes cérébelleux

Selon le Collège des Enseignants en Neurologie, le syndrome cérébelleux se définit comme l'ensemble des symptômes et signes résultant d'une atteinte du cervelet lui-même ou des voies cérébelleuses (péduncules cérébelleux supérieur, moyen et inférieur). La sémiologie inclut :

- L'ataxie, correspondant à une incoordination ou incohérence des mouvements (ataxie kinétique), une démarche anormale avec déviation lors de la marche (ataxie locomotrice), une perte d'équilibre au repos, avec augmentation du polygone de sustentation et une tendance à la chute et démarche ébrieuse (ataxie statique) ;
- Des troubles oculomoteurs, ou nystagmus (mouvements involontaires rythmiques et conjugués des yeux) ;
- Des troubles de la parole, ou dysarthrie (parole scandée ou « pâteuse ») ;
- Un tremblement intentionnel souvent associé à un tremblement d'attitude ;
- Une dysmétrie, trouble de la coordination des mouvements, qui sont exagérés et dépassent toujours leur but ;
- Une altération de la force musculaire (hypotonie), du rythme et de la précision des mouvements.





## 2. Syndrome de Schmahmann

Le **syndrome de Schmahmann** (on parle parfois aussi de « syndrome cognitivo-émotif de type cérébelleux ») dépeint les troubles cognitifs associés au cervelet : il s'agit d'atteintes des fonctions exécutives, spatio-temporelles, linguistiques, affectives et du comportement (Schmahmann, 2007).

### B. Manifestations cliniques de la lésion des noyaux gris centraux et du globus pallidus

Une atteinte des noyaux gris centraux se manifeste en général par une difficulté de planification et d'exécution des mouvements volontaires. Parmi les manifestations des pathologies affectant les noyaux gris centraux, les troubles parkinsoniens ressortent particulièrement. Ils consistent en des tremblements au repos, une bradykinésie, la rigidité des membres ainsi qu'une instabilité posturale (Srivanitchapoom, 2018).

#### 1. La maladie de Parkinson

Ainsi, une **hyperactivité** des structures inhibitrices, le **globus pallidus interne** et la **substance noire réticulée**, est observée. Le renforcement de l'inhibition se manifeste ainsi par une **hypokinésie** (une diminution de l'activité motrice). Des tremblements des mains apparaissent, les membres sont plus rigides, les mouvements spontanés plus rares et lents (la **bradykinésie**).

Des troubles cognitifs accompagnent également cette altération motrice, montrant l'implication de ces voies striatales dans la cognition et le système limbique. Parmi ceux-ci figurent la dépression, l'anxiété et des troubles de la cognition, tels qu'un déficit du raisonnement, une altération de la mémoire et de l'attention, ou encore des hallucinations ou des troubles du langage (Srivanitchapoom, 2018 ; Goldman, 2018). L'administration de la L-DOPA et d'agonistes dopaminergiques permet d'améliorer ces manifestations cliniques.

#### 2. Maladie d'Huntington

A l'opposé de la maladie de Parkinson, la maladie d'Huntington favorise la levée de l'inhibition GABAergique: elle est **hyperkinétique** (elle est associée à une augmentation de l'activité motrice).

Caractérisées par une importante dégénérescence de neurones du striatum et une **perte de l'inhibition du globus pallidus externe**, les manifestations cliniques des premiers stades de la pathologie consistent en des changements subtils tels qu'une diminution du seuil d'anxiété, une humeur changeante, des troubles oculomoteurs, des petits mouvements involontaires (Caron, 1998). Les stades plus avancés sont de type choréique avec des mouvements involontaires bruts, courts et répétitifs, une dysarthrie, une perte cognitive, et des troubles psychiatriques.

#### 3. Pathologies d'accumulation de métaux affectant les noyaux gris centraux

Certaines pathologies liées des troubles de l'homéostasie de métaux sont associées à un syndrome parkinsonien :

- La **maladie de Wilson**, pathologie impliquant des accumulations de cuivre dans le foie et le cerveau. L'accumulation cérébrale de cuivre est responsable de manifestations cliniques de type tremblement et ataxique, témoins de l'implication des ganglions de la base dans cette pathologie. Elle est



caractérisée en IRM par un hypersignal T2 du globus pallidus, du noyau caudé et du thalamus.

- La **neurodégénérescence avec surcharge cérébrale en fer** (ancien syndrome Hallervorden-Spatz) : maladies neurodégénératives rares (prévalence : 1 à 9/million) avec une accumulation de fer dans le *globus pallidus* et la substance noire principalement. Les manifestations cliniques correspondent essentiellement à une dystonie, une dysarthrie, des troubles de la démarche et cognitifs.
- Le **syndrome de Fahr**, qui consiste en la calcification des parois d'artéριοles et de capillaires, au niveau du *globus pallidus*, puis des ganglions de la base, du **noyau dentelé**, du striatum, ainsi que la matière blanche (Mufaddel, 2014 ; Jaworski, 2017). Les manifestations cliniques sont encore une fois des troubles parkinsoniens, tels que la chorée, des tremblements, une dystonie. Des troubles psychiatriques sont également caractéristiques du syndrome de Fahr et ils se manifestent sous forme de démence, d'hallucinations, ou encore d'un changement de personnalité (Jaworski, 2017).
- Le **manganisme**, se traduisant par une accumulation cérébrale du manganèse, localisée principalement dans les noyaux gris centraux, le *globus pallidus*, les noyaux subthalamique et dentelé, y entraîne un hypersignal T1 à l'examen IRM. Les troubles comportementaux sont de type parkinsonien, dystoniques, spastiques, mais pas cognitifs.

Des cas de manganisme ont été rapportés chez des mineurs ayant été exposés de façon répétitive, en inspirant des poussières de manganèse (Rose, 1999 ; Sen, 2011). Ils présentaient des troubles parkinsoniens dans une de ces deux études, et étaient asymptomatiques dans l'autre. Cette accumulation de manganèse induit un rehaussement du signal T1 des bulbes olfactifs, de la matière blanche frontale, du *globus pallidus*, et du *putamen* (Sen, 2011). Des légers troubles de coordination fine des membres ont été mis en évidence par l'étude, mais pas de signes d'ordre cognitif.

## C. Effets neurotoxiques des chélates de Gd

### 1. Injections intrathécales de chélates de gadolinium (neurotoxicité aigüe)

Des cas d'effets neurotoxiques consécutifs à une injection unique de chélate de Gd directement dans le liquide céphalorachidien ont fois été rapportés (Arlt, 2007 ; Kapoor, 2010 ; Turk, 2017). Ces rapports de cas présentent des troubles neurologiques, tels que des encéphalopathies et des troubles cognitifs et une perte de conscience.

### 2. Symptômes chroniques rapportés par les patients

La nouvelle de la découverte des hypersignaux T1 cérébraux, associés aux chélates de Gd, s'est rapidement répandue, pas seulement au sein de la communauté radiologique, mais aussi au sein des patients. Ceux-ci suivent en effet attentivement ce sujet, et se sont mobilisés sous forme de groupes dans les réseaux sociaux, dont quelques liens figurent ci-dessous :

<https://gadoliniumtoxicity.com/>

<https://www.facebook.com/gadoliniumtoxicity/>

Une enquête, directement menée auprès de patients ayant reçus des injections de chélates de Gd, sur l'un de ces sites, avait déjà rapporté en 2014 de nombreux troubles chroniques, neurologiques



ou non, se manifestant dans le mois suivant l'injection, pour la plupart. On trouve parmi ceux-ci des **douleurs et troubles musculaires, oculaires, dermiques, cognitifs, ORL, une baisse de la température corporelle, des troubles de l'équilibre et la survenue d'œdèmes** (Williams et Grimm, 2014 sur le site <https://gdtoxicity.files.wordpress.com/>).

Le *verbatim* de certaines citations est reproduit ci-dessous :

*“Constant pain and pressure inside my head. Short-term memory and concentration is getting worse. My low body temperature causes me to feel like I am freezing from inside my bones outward. It affects my ability to function normally and disrupts my daily life.”*

*“Both the fatigue and reduced cognitive function affect my job. My life has changed dramatically.”*

*“Cognitive issues have changed and gotten worse - inability to concentrate, impaired reasoning ability, inability to crunch numbers as I did prior to MRI with great ability.”*

Une nouvelle entité clinique, appelée **“Gadolinium Deposition Disease”** a été proposée par une équipe aux Etats-Unis. Les principaux symptômes rapportés sont des douleurs au niveau du centre du torse, des bras et des jambes, une confusion mentale et un épaissement de la peau (Semelka, 2016a ; Ramalho, 2016 ; Burke, 2016 ; Semelka, 2016b).



## Chapitre 3 : Méthodes d'évaluation d'une éventuelle neurotoxicité

Nous avons précédemment caractérisé le phénomène, après administrations répétées de chélates de Gd linéaires dans notre modèle préclinique. Le Gd passerait dans le liquide céphalorachidien, puis pénétrerait dans le parenchyme *via* le supposé système glymphatique. La rétention du Gd a lieu principalement dans les DCN, mais également dans toutes les structures étudiées, de façon proportionnelle à leur teneur en fer. Du Gd sous forme insoluble s'accumule dans les lames basales des vaisseaux sanguins, mais aussi dans l'interstitium et même dans des dépôts de lipofuscine de cellules gliales. Du Gd certainement soluble a été retrouvé tapissant ce qui semble être des microvaisseaux. L'étude de la cinétique d'accumulation du Gd ainsi que de sa spéciation a montré qu'une partie pouvait être éliminée au cours du temps, mais que l'élimination n'était certainement pas complète pour des chélates de Gd linéaires à l'issue de nos études (1 voire même 3 mois après l'arrêt des administrations). De plus, au cours du temps, le Gd des chélates linéaires se dissocie, et sa forme d'accumulation change : il s'associerait progressivement à des macromolécules.

Il paraît maintenant nécessaire de savoir si la présence du Gd, accumulé sur le moyen terme dans de nombreuses structures cérébrales, est à l'origine d'une neurotoxicité. Pour cela, nous disposons de différentes méthodes. Une première approche consiste en la recherche de modifications de molécules endogènes (concentrations, localisation, activité). L'évaluation comportementale de notre modèle préclinique devrait également permettre la détection de signes de neurotoxicité.

### A. Spectroscopie RMN

Si l'IRM se focalise essentiellement sur le pic des protons de l'eau, la RMN consiste en l'analyse du signal des protons (ou autre atome possédant un spin) **d'autres molécules**. La résonance des protons étant sensible aux couplages de spins (arrangements des spins) et au déplacement chimique (position du proton dans la molécule), une fois affranchis du signal de l'eau, l'identification de molécules devient en effet possible en RMN. **La spectrométrie RMN**, appliqué au domaine du vivant, est ainsi une technique non-invasive visant à la détection et la quantification de certaines molécules identifiables dans les tissus. Elle voit ses applications neurologie et neuro-oncologie apparaître à la fin des années 1980 (Megyesi, 1988) et permet par exemple de mettre en évidence des changements métaboliques ou biochimiques (Le Bas, 1998), dans le cadre du suivi ou du diagnostic de certaines pathologies cérébrales.

Cette technique est quantitative, car l'aire sous le pic est proportionnelle au nombre de protons participant à la formation du signal RMN et est donc le reflet de la concentration du métabolite. Elle est notamment utilisée dans la détection, la caractérisation (temporalité d'apparition) ou la classification (bénin, malin) de différents types de lésions cérébrales (SEP, Maladie d'Alzheimer, épilepsie, tumeurs) (Faghihi, 2017).



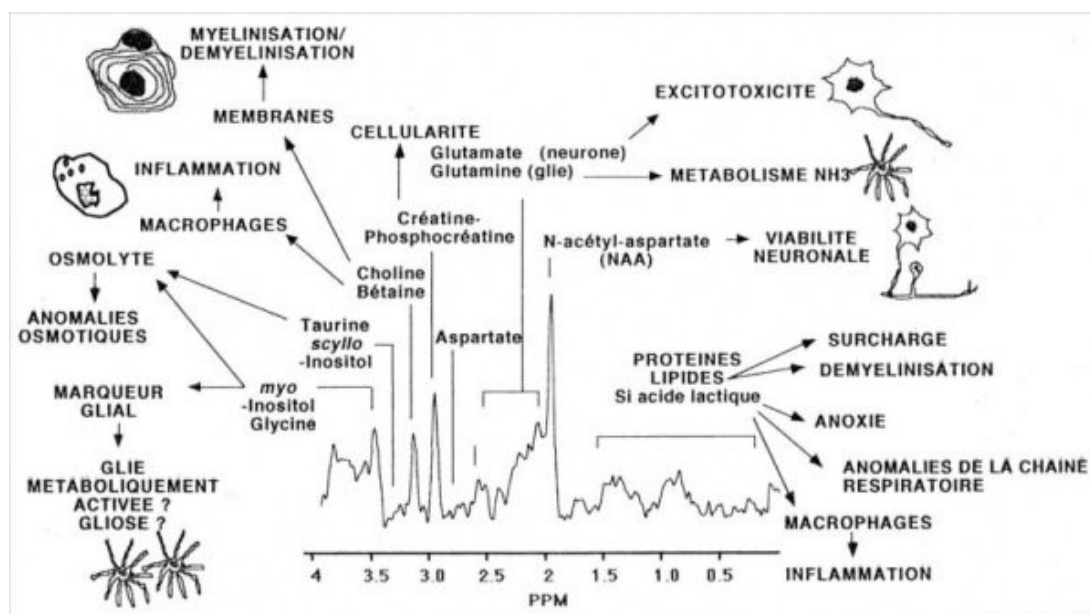


Figure 80 : Synthèse sur l'interprétation des marqueurs neurochimiques cérébraux (Didelot et Siwiec)

Tableau 11 : Caractéristiques et signification des métabolites cérébraux les plus communément observées en spectroscopie RMN (d'après Leite, 2010 et Salvan, 1997).

Métabolite	Signification cellulaire	Pic (ppm)
<b>N-acétyl-aspartate (NAA)</b>	Marqueur de la densité neuronale et du métabolisme neuronal (dérivé de l'acide aspartique, produit par les mitochondries, uniquement dans les neurones). Métabolite le plus abondant en situation normale	2,02 et 2,6
<b>Créatine (Cr)</b>	Reflète le système énergétique cérébral (source de phosphate pour la conversion mitochondriale de l'ADP en ATP). Comprend la créatine, la phosphocréatine et l'un des pics de l'acide $\gamma$ -aminobutyrique	3,03 et 3,9
<b>Choline (Co)</b>	Marqueur de souffrance membranaire. La choline et ses dérivés sont impliqués dans le métabolisme des phospholipides membranaires (phosphatidylcholine et sphingomyéline). Son augmentation reflète une démyélinisation, des dégâts membranaires ou un renouvellement membranaire anormalement élevé (prolifération cellulaire)	3,2
<b>Lactate (Lac)</b>	Marqueur de souffrance anoxique. Sa présence témoigne d'une dysfonction de la respiration oxydative, substituée par la glycolyse anaérobie (les causes sont ischémique, anoxique, ou affection mitochondriale par exemple)	1,32
<b>Lipides (Lip)</b>	Marqueur de nécrose (déstructuration membranaire ou arrêt de la myélinisation, observé dans les tumeurs cérébrales)	0,8 et 1,2-1,5
<b>Glutamate et glutamine (Glx)</b>	Neurotransmetteur excitateur et précurseur du GABA, ainsi que son métabolite formé en réaction avec l'ammoniac. Leurs signaux individuels ne peuvent pas être distingués	2,05-2,5 et 3,65-3,8
<b>Myo-inositol (mi)</b>	Marqueur de souffrance gliale (activation gliale ou une gliose). Sa diminution est parfois observée dans les phénomènes d'hyperosmolarité	3,56
<b>Taurine (Tau)</b>	acide aminé qui joue un rôle dans la neuroprotection en intervenant sur la stabilisation membranaire, l'osmolarité et la régulation du métabolisme calcique	3,36
<b>Acides aminés (aa)</b>	Ils comprennent la leucine, l'isoleucine et la valine (produits de dégradation des protéines). Très évocateurs d'abcès cérébraux	0,9





## B. Microdialyse

La **microdialyse** est une technique consistant à faire circuler, à travers une sonde, un « perfusé », de composition proche du liquide céphalorachidien, dans la structure anatomique (ici cérébrale) étudiée, à l'aide de la stéréotaxie, et d'en récolter le « dialysat ». Ce dernier contient ainsi des molécules de la zone ciblée (quelques mm<sup>3</sup>), ayant diffusé à travers une membrane semi-perméable (perméable à l'eau et aux petites molécules dont la fourchette de masses moléculaires peut être définie) (Figure 81). La membrane représente l'interface entre le milieu de perfusion et le milieu interstitiel du tissu, et les échanges s'y réalisent par simple diffusion, selon un gradient de concentration ainsi que les propriétés spécifiques de la membrane (le seuil de coupure de la membrane est le seuil de masse moléculaire maximale d'une molécule susceptible de la traverser). Cette technique permet le dosage quasi-instantané ou *a posteriori* de métabolites et neuromédiateurs en provenance directe de la structure étudiée, et ainsi d'identifier une potentielle souffrance neuronale ou une modification de la communication neuronale (surexpression ou inhibition de certaines voies).

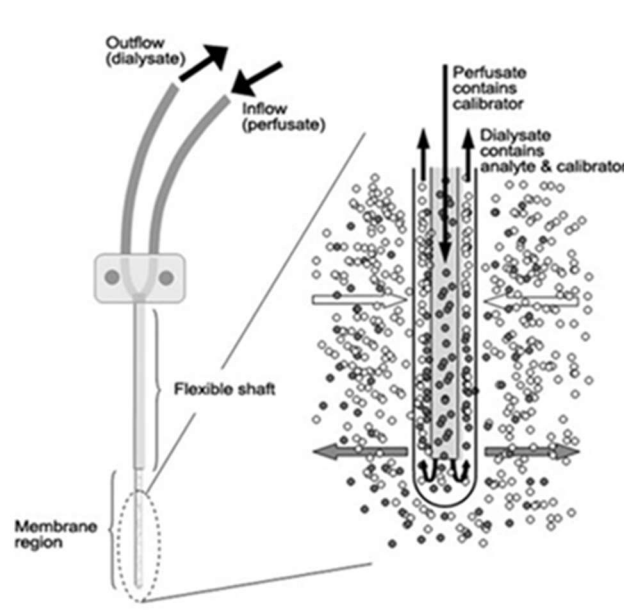


Figure 81 : Principe de la microdialyse : circulation d'un perfusé, échanges à travers la membrane semi-perméable et récupération du dialysat (Charasia, 2007).

Tableau 12: Eléments pouvant être dosés dans les dialysats à l'issue de la microdialyse, et signification biologique.

Biomarqueur	Intérêt
Glycérol	Marqueur de lipolyse / lésions membranaires, de déficit énergétique, du stress oxydatif
Pyruvate	Marqueur de la glycolyse
Lactate	Indice d'utilisation locale du glucose
Ratio Lactate/Pyruvate	Etat d'oxydoréduction intracellulaire / fonctionnement mitochondrial
Glutamate	Neuroexcitateur (fibres moussues et grimpantes), ouvre les canaux Ca <sup>2+</sup>
Glucose	Reflète du métabolisme énergétique (balance entre utilisation et apport)
Aspartate	Neurotransmetteur excitateur
GABA	Neurotransmetteur inhibiteur
Dopamine & métabolites	Neurotransmetteur des noyaux gris
Sérotinine	Neurotransmetteur inhibiteur
Adénosine	Neurotransmetteur inhibiteur



## C. Marqueurs histologiques de toxicité

Une étude histologique conventionnelle, avec coloration standard hématoxyline/éosine/safran, permet la distinction des principales populations cellulaires cérébrales, ainsi que la mise en évidence de lésions éventuelles. Elle permet également une analyse histomorphométrique (mesures de dimensions caractéristiques de couches ou structures), ainsi qu'une semi-quantification de certains paramètres (densité cellulaire, morphologie cellulaire, etc.).

En parallèle, le recours à de nombreux marqueurs (circulants ou histologiques), spécifiques d'une population cellulaire ou de leur bon fonctionnement est une approche judicieuse pour la mise en évidence d'une éventuelle neurotoxicité, et peut orienter la réflexion pour une bonne compréhension du mécanisme de toxicité. Le tableau en Annexe 5 liste un certain nombre de marqueurs, sélectionnés comme pouvant être pertinents pour une approche exploratoire de la neurotoxicité des chélates de Gd, ou bien orientée, selon les résultats des tests comportementaux par exemple.

La mise en évidence de ces marqueurs de toxicité peut être réalisée par coloration histologique adaptée, ou par marquage immunohistochimique, directement sur coupe. On peut aussi utiliser des techniques immunoenzymatiques, de fluorescence, de western-blot, RT-PCR (réaction en chaîne par polymérase), ou bien encore chromatographique. La nature des échantillons étudiés peut aussi être très variable, un lysat cellulaire, du plasma, du sérum, du liquide céphalorachidien, ou encore l'urine.

## D. Evaluation comportementale

Le Rat est un bon modèle pour évaluer une éventuelle toxicité neurocomportementale et il est donc classiquement et très largement utilisé dans ce but (Cenci, 2002 ; Shah, 2010). Les noyaux cérébelleux profonds et le globus pallidus étant impliqués dans le contrôle de nombreuses fonctions motrices et cognitives, comme nous l'avons vu précédemment et l'impact de l'accumulation de Gd à leur niveau étant pour le moment totalement inconnu, une large batterie de tests classiquement utilisés peut être utilisée afin de déceler d'éventuelles anomalies neurocomportementales. Ils balayent ainsi l'étude de l'activité des animaux, leur anxiété, mémoire, leurs capacités d'apprentissage ou sensorielles, ainsi que leur coordination motrice.

### 1. Observations générales et activité

En tout premier lieu, lors d'une évaluation neuro-comportementale, il est important d'observer l'aspect et le comportement général de l'animal, dans sa cage, ses interactions avec ses congénères etc. On peut également s'intéresser à sa prise de nourriture et vérifier sa bonne hydratation.

L'activité, la motricité, la locomotion en général sont à évaluer également, puisque peuvent interférer avec d'autres tests. On va ainsi regarder si l'animal a une démarche et une posture normale, puis son état d'excitation ou de sédation dans sa cage. Lors des tests, on prêtera attention à ses déplacements, les distances qu'il parcourt, ou encore les temps d'immobilité qu'il marque.

### 2. Anxiété

L'anxiété implique principalement le système limbique, donc l'hippocampe, l'hypothalamus, l'amygdale et le gyrus cingulaire (Duval, 2015) et met en jeu de multiples projections en vue de réponses aux stimuli aversifs.



Le principe des tests évaluant l'anxiété reposent souvent sur l'exploration différentielle de zones anxiogène et non-anxiogènes (plus lumineuse, absence de paroi et donnant sur le vide car surélevée...). La fréquentation plus ou moins importante de la zone anxiogène révèle l'état d'anxiété de l'animal.

### 3. La mémoire

La mémoire est multifactorielle, et dépend de nombreux systèmes neuroanatomiques difficilement dissociables. Il existe en effet différents types de mémoire. On peut distinguer d'une part la mémoire à court terme (stockage bref des informations, et de capacité limitée) et de travail (capacité à manipuler les informations maintenues en mémoire à court terme), de la mémoire à long terme (stockage prolongé de l'information, avec une trace mnésique > 24 heures). Ensuite, selon la nature de l'information à traiter (objet, odeur, information spatiale, information liée à une émotion...), une partie des régions cérébrales impliquées diffèrera.

Le cervelet et le striatum dorsal sont le siège de la mémoire procédurale, c'est-à-dire des automatismes moteurs et du savoir-faire, ainsi que dans la consolidation des souvenirs. Le cervelet est aussi impliqué dans certains apprentissages, comme le fameux conditionnement de Pavlov (conditionnement par un stimulus associé à un évènement positif). L'hippocampe intervient dans l'apprentissage, l'intégration d'informations nouvelles, et la formation des souvenirs. Le cortex rhinal, en communication avec l'hippocampe, gère la réception et le stockage des informations. Le cortex préfrontal dorsolatéral est impliqué dans la mémoire de travail, tandis que l'amygdale intervient dans la mémoire faisant intervenir une réponse émotionnelle (qu'elle soit bonne ou mauvaise).

Selon les tests de mémoire à disposition dans les batteries de tests disponibles, on testera un type de mémoire ou un autre. Les tests reposent par exemple sur les principes suivants : mémorisation de l'emplacement d'une plateforme dans une piscine, mémorisation des parties d'un labyrinthe déjà explorée, mémorisation d'un objet connu, mémorisation d'un schéma d'exploration à respecter... On peut parfois recourir à un système de récompense pour faciliter l'apprentissage et/ou la motivation.

### 4. L'apprentissage

L'évaluation de l'apprentissage est liée à celle de la mémoire, puisqu'un apprentissage implique la mémoire de travail, sur un exercice répétitif. C'est principalement l'hippocampe qui est en jeu dans ce cas.

Les principes des tests comportementaux de l'évaluation de l'apprentissage vont être les suivants : habituation aux conditions et à l'environnement, puis répétition, avec éventuellement le recours à un système de récompense (renforcement positif).

### 5. La coordination motrice

La coordination est la fonction la plus connue de nos structures d'intérêt : le cervelet (surtout les DCN), et le striatum. Ils assurent la coordination des mouvements dans l'exécution de mouvements moteurs fins. Sans eux, les mouvements seraient grossiers, peu précis et de vitesse inappropriée. Ces boucles de contrôle du mouvement sont GABAergiques, comme nous l'avons vu auparavant.

Les tests comportementaux évaluant cette fonction peuvent être divers, et reposer sur la réalisation de mouvements fins des pattes comme la préhension, mais aussi l'adaptation de la marche à la vitesse, au rétrécissement d'un support, etc.



## 6. Capacités sensorielles

Certains tests ont pour but l'évaluation des capacités sensorielles des animaux, comme la sensibilité, l'odorat, ou la vue, parfois prérequis au préalable d'autres tests faisant intervenir ces fonctions.



## TRAVAUX PERSONNELS : Evaluation neurotoxicologique des chélates de Gd administrés de façon répétée

### A. Introduction

Les effets neurotoxiques de l'accumulation cérébrale de Gd sont, pour le moment, inconnus. En effet, les patients suivis régulièrement par IRM injectées souffrent souvent de pathologies non anodines, ce qui induit de nombreux facteurs confondants. Il est essentiel d'évaluer une telle toxicité. Le recours à des études pré-cliniques présente l'avantage d'être prospectif et de permettre un suivi rigoureux des animaux étudiés au moyen de tests validés.

Pour rechercher cette éventuelle toxicité, nous avons choisi de réaliser cette étude préliminaire sur un modèle ayant reçu des doses plus élevées que celles des protocoles précédents, et sur des rats sains. En effet, nous n'avons pas souhaité utiliser ici le modèle sensibilisé par l'insuffisance rénale, pour éviter toute source de biais (Nongnuch, 2014). Ces exploratoire ont été réalisées pour des administrations répétées de plusieurs fois la dose clinique de chélates de Gd.

Les conséquences toxiques de l'accumulation de Gd peuvent se manifester à différents niveaux :

- Au niveau systémique, avec des altérations neuro-comportementales, des troubles moteurs ou cognitifs ;
- Au niveau tissulaire, avec par exemple une toxicité sur les cellules endothéliales des vaisseaux, ou encore l'induction d'une gliose, c'est à dire l'activation et la prolifération de cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes, microglie), ou une dégénérescence neuronale, etc. ;
- Au niveau moléculaire, avec la modification des concentrations de neurotransmetteurs, du système énergétique cellulaire, ou encore la circulation de marqueurs de toxicité.

Bien que reposant sur une rationnelle liée au métal étudié, le Gd, et aux structures principalement concernées par son accumulation, une large batterie de tests neuro-comportementaux, mais aussi de techniques expérimentales a ainsi été réalisée, afin de caractériser de façon large notre modèle sur le plan comportemental. La plateforme de comportement n'existait pas dans nos laboratoires et a donc été créée pour ces études.

Ainsi, les études neuro-comportementales étudieront la coordination motrice, principale fonction assurée par les noyaux cérébelleux profonds, mais également l'activité, l'anxiété, l'apprentissage, la mémoire, et des fonctions sensorielles. En effet, comme nous l'avons vu dans les études précédentes (publications 1 et 2), du Gd est retrouvé accumulé dans toutes les structures cérébrales étudiées, en proportions variables.

Des études histologiques et le dosage de certains métabolites et marqueurs de toxicité ont complété cette évaluation de la neurotoxicité éventuellement engendrée par l'accumulation cérébrale du Gd.





## B. Matériels et méthodes communs aux deux études

Les procédures des études ont été approuvées par le Comité Interne d’Ethique de l’Expérimentation Animale et par le ministère de la Recherche. L’étude a été réalisée conformément à la Directive Européenne 2010/63/EU et à la législation française (articles R214-87 à R214-137 du code rural).

### 1. Conditions d’hébergement

Une semaine d’acclimatation était accordée aux rats à leur arrivée, avant d’initier l’étude. L’hébergement était réalisé dans des conditions standards, dans une animalerie conventionnelle agréée, dont la température ambiante était fixée à 22°C, l’hygrométrie à 55% et dont le cycle obscurité/lumière était de 12/12 heures (non-inversé). Les rats avaient accès à l’eau et à la nourriture *ad libitum*. Un suivi clinique et un suivi du poids ont été effectués hebdomadairement. Le change de la litière étant un élément perturbateur du comportement du Rat, il n’a été effectué qu’une fois par semaine, une fois les tests terminés.

### 2. Injections et organisation générale de l’étude

Les rats (Sprague Dawley, femelles, Charles River) ont reçu soit une solution saline NaCl 0,9% (300 mOsm/kg d’eau), soit un chélate de Gd, à raison de 4 injections par semaine pendant 5 semaines. La dose clinique, adaptée à l’espèce Rat (après correction par la surface corporelle), correspond à 0,6 mmolGd/kg. L’injection a été réalisée dans la veine caudale, sous anesthésie à l’isoflurane.

### 3. Étude comportementale

Plusieurs tests comportementaux ont été menés pour renseigner à la fois l’activité générale des rats, leur mémoire, leur niveau d’anxiété et leur coordination motrice après administration répétée de chélates de Gd, en comparaison au groupe témoin. Ces tests ont tous été effectués sur une même plage horaire (l’après-midi), dans une pièce à 22°C. L’ordre des rats était randomisé chaque jour afin que l’heure ou l’ordre de passage n’influencent pas les résultats. Tous les tests ont été filmés, les vidéos étudiées *a posteriori*, soit à la main, soit à l’aide d’un logiciel (ActualTrack®, ActualAnalytics, Edimbourg, Royaume Uni), toujours en aveugle.

Le protocole des différents tests est présenté dans la section « choix des méthodes ».



Tableau 13 : Résumé des tests comportementaux choisis (deux études confondues)

Comportement testé	Test sélectionné
<b>Comportement général</b>	Irwin modifié Open Field Actimétrie
<b>Anxiété</b>	Labyrinthe en croix surelevé Openfield
<b>Mémoire</b>	Piscine de Morris Labyrinthe en Y Reconnaissance de nouveaux objets
<b>Apprentissage</b>	Protocole d'apprentissage dans le labyrinthe en Y
<b>Coordination motrice fine</b>	Balance Beam Staircase Catwalk Rotarod
<b>Test sensoriel</b>	Sensibilité/Douleur : Von Frey Olfaction : Pellet caché

### E. Comportement général

#### a) Irwin modifié

Le Test d'Irwin modifié (Irwin, 1968 ; Roux, 2005) consiste en l'observation de l'animal dans son lieu d'hébergement avec ses congénères, pour évaluer son comportement général dans un lieu connu (aspect général, état d'excitation ou de sédation, éventuel comportement agressif etc.). Des tests sensitivo-moteurs ont aussi été effectués sur l'animal sorti de sa cage (réaction au pincement de la patte, évaluation du tonus musculaire ou du réflexe palpébral ...). Sa force d'agrippement sur une grille a ensuite été évaluée : les pattes avant du rat étaient placées sur le haut d'une grille et celui-ci était tiré vers le bas par l'expérimentateur. La résistance de l'animal et donc sa force d'agrippement étaient cotée de 0 à 2 (0 : aucun agrippement, 1 : faible agrippement, 2 : forte résistance et agrippement). Enfin, un test de suspension à une barre placée horizontalement en hauteur a évalué de façon générale le tonus musculaire, la capacité de traction et l'équilibre de l'animal. Ses pattes avant étaient placées sur la barre, et l'on a évalué pendant 90 secondes, par un système de score sur le temps de chute, la capacité du rat à rester accroché, sachant qu'il avait la possibilité de monter ses 4 pattes sur la barre voire même de rejoindre les barres verticales pour se laisser glisser jusqu'en bas. Le test a été répété 3 fois à 1 minute d'intervalle.

#### b) Openfield

L'openfield est un test permettant de mesurer les activités locomotrices de l'animal et son anxiété (Walsh, 1976). Pour cela, le rat était placé pendant 10 mn dans un espace vide d'un mètre carré entouré d'une paroi de 60 cm de haut (Bio-Concept Technologies). Le sol était quadrillé en carrés de 20 cm de côté afin de délimiter l'espace central de la périphérie. Naturellement, le Rat se sent plus à l'aise, car moins exposé, près des parois, en périphérie, et y passera plus de temps (thigmotaxie). La différence de luminosité entre le centre et la périphérie accentue la zone anxiogène qu'est le centre. Un rat se déplaçant moins au centre de l'openfield que des rats témoins était donc considéré comme étant plus anxieux. L'analyse à l'aide d'un logiciel, complétée par une analyse manuelle, ont permis l'enregistrement des durées de séjour dans les deux zones citées précédemment, des distances parcourues, du temps d'immobilité, ainsi que des petits comportements (toiletage, redressement, reniflement...).



### c) Actimétrie

La collaboration avec l'équipe de MIRCen au CEA de Fontenay-aux-Roses a permis d'étudier le comportement des rats pendant 46 heures grâce à des cages d'actimétrie PhenoTyper® (Noldus). Le rat était déposé, seul, dans une cage avec nourriture et eau *ad libitum* et il était filmé en permanence. Les variables mesurées par le logiciel EthoVision® étaient la distance totale parcourue ainsi que la distance parcourue heure par heure.

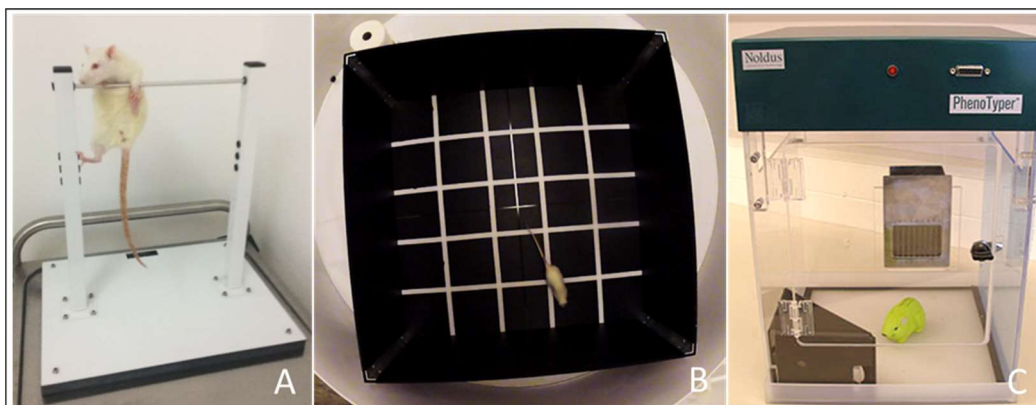


Figure 82 : Tests de l'évaluation comportementale générale : (A) Barre horizontale, (B) Openfield, (C) Cage d'actimétrie.

## F. Anxiété

### a) Labyrinthe en croix surélevée

Le test du **labyrinthe en croix surélevée**, utilisé pour évaluer l'anxiété, consiste en un labyrinthe surélevé de 70 cm, comportant deux bras opposés dit « fermés » et deux bras « ouverts » (Ennaceur, 2016). Les bras « fermés » sont entourés de parois opaques de 30cm de haut, les bras « ouverts », quant à eux, n'ont aucune paroi. Les bras font tous 50 cm de long sur 15,5 cm de large. Le rat a été déposé au centre de la croix et il a pu se déplacer librement pendant 10 minutes. Tout comme le principe de l'openfield, un rat anxieux visite moins les bras ouverts, plus anxiogènes. Etaient comptabilisés le temps passé dans chaque type de bras et leur fréquentation (nombre d'entrée dans chaque type de bras), ainsi que les petits comportements.

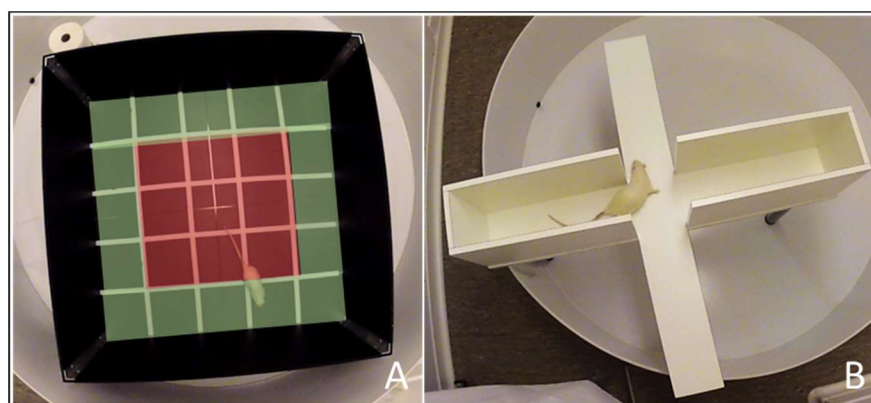


Figure 83 : Tests permettant l'évaluation de l'anxiété : (A) Openfield (1 x 1 m), avec des repères de couleur indiquant la zone anxiogène (rouge) et la zone périphérique (verte), (B) Labyrinthe en croix surélevée, avec les deux bras ouverts et les deux bras fermés.

## G. Mémoire

### a) La piscine de Morris

La **piscine de Morris** permet d'évaluer la mémoire spatiale à long terme du Rongeur (Morris, 1984). Il s'agit de faire nager l'animal dans une piscine de 1,80 m de diamètre, remplie de 30 cm d'eau à  $20 \pm 1$  °C. La piscine est délimitée en 4 quadrants. Une petite plateforme immergée de 2-3 cm était placée dans l'un d'entre eux (Figure 84 A). Un entraînement de 4 jours a permis à l'animal d'apprendre où est située la plateforme, par rapport à des repères muraux. Chaque jour, l'animal était placé dans les 4 quadrants, dans un ordre aléatoire, et il nageait jusqu'à rencontrer la plateforme (un délai de 90 secondes lui a été accordé afin de la trouver, sans quoi il était guidé vers celle-ci par l'expérimentateur). Une fois monté dessus, le rat pouvait regarder autour de lui et remarquer 3 indices spatiaux de formes et de couleurs différentes, affichées sur le mur, qui l'aidaient à s'orienter. Le jour du test, la plateforme a été retirée, mais le reste de la procédure s'est déroulée comme lors des entraînements : le rat a été déposé au départ d'un des 4 quadrants, et a nagé librement pendant 1mn 30. Le temps passé dans le quadrant où était initialement la plateforme, a été mesuré durant la première minute d'exploration. Si l'animal a correctement mémorisé l'endroit initial de la plateforme, il y passera la majorité du temps, à la chercher en vain. Les performances des 4 premiers jours peuvent servir à l'évaluation de la capacité d'apprentissage.

### b) Labyrinthe en Y : test de mémoire

Ce test permet de tester la mémoire à court terme de l'animal (Deacon, 2006). Le Rat était tout d'abord placé au centre d'un **labyrinthe à trois bras, dit « en Y »**. Deux des bras étaient ouverts à l'exploration pendant 5 minutes, tandis que l'accès au 3e était condamné (Figure 84 B). Le rat a alors été replacé dans sa cage pendant 3 minutes. Ensuite, l'animal a été alors placé dans le labyrinthe pendant 3 minutes avec, cette fois-ci, les 3 bras à sa disposition. Si sa mémoire à court terme est satisfaisante, la curiosité naturelle de l'animal doit l'amener à explorer en premier le bras auquel il n'avait pas accès lors du premier passage. Les durées de séjour dans chaque bras ont également été mesurées.

### c) Reconnaissance d'objet nouveau

La curiosité est un comportement naturel chez le Rat, qui, mis en présence d'un nouvel objet, l'explore d'avantage qu'un objet dont il a l'habitude (Léger, 2013). Comme le labyrinthe en Y, ce test est donc un test de la mémoire, où l'on évalue si l'animal se souvient de ce qu'il a vu auparavant. L'animal était mis en présence de 2 objets identiques pendant la durée nécessaire pour atteindre 20 secondes d'exploration totale, sans excéder 10 minutes. Le lendemain, le même test était réalisé mais avec un des deux objets différent de la veille. S'il le rat se souvient de l'objet connu, il ira d'avantage observer l'objet inconnu (Figure 84 C).



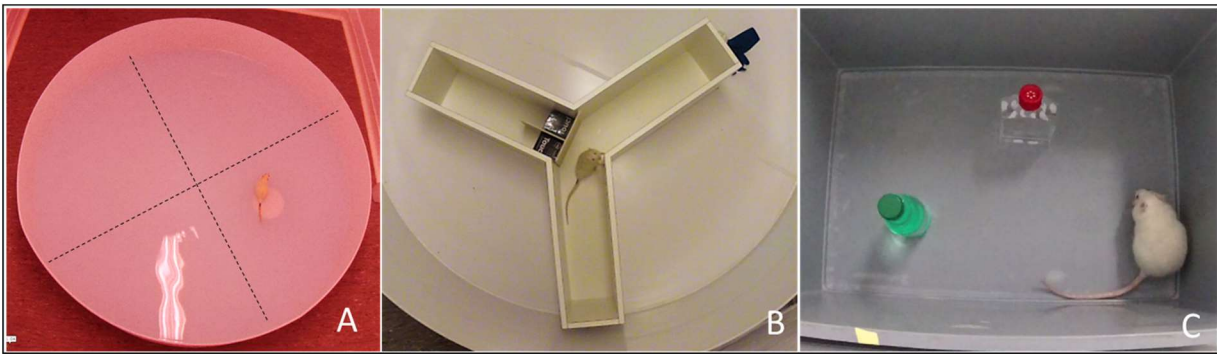


Figure 84 : Tests de mémoire : (A) Piscine de Morris, (B) Labyrinthe en Y, (C) Reconnaissance d'objet nouveau.

### H. Apprentissage

Afin d'évaluer la capacité d'apprentissage, nous avons testé un protocole alternatif dans le labyrinthe en Y. Grâce à un système de renforcement positif, le test vise à apprendre à l'animal à aller systématiquement dans le bras de droite (par exemple), quel que soit le bras dans lequel il a été placé au départ (Ferbinteanu, 2016 ; Asem, 2015). Cet exercice s'est déroulé sur 2 semaines et chaque jour le rat faisait 5 passages avec des départs randomisés (c'est-à-dire un départ depuis le bras A, B ou C). Un pellet de saccharose a été placé dans le bras droit afin que l'animal apprenne qu'il est dans le « bon bras ».

Plusieurs paramètres ont été mesurés : la réussite de l'exercice (établissement d'un score de 0 à 1, 1 étant la réussite), le temps écoulé avant de manger la récompense et le nombre de bras visités avant de consommer cette friandise.

### I. Coordination motrice

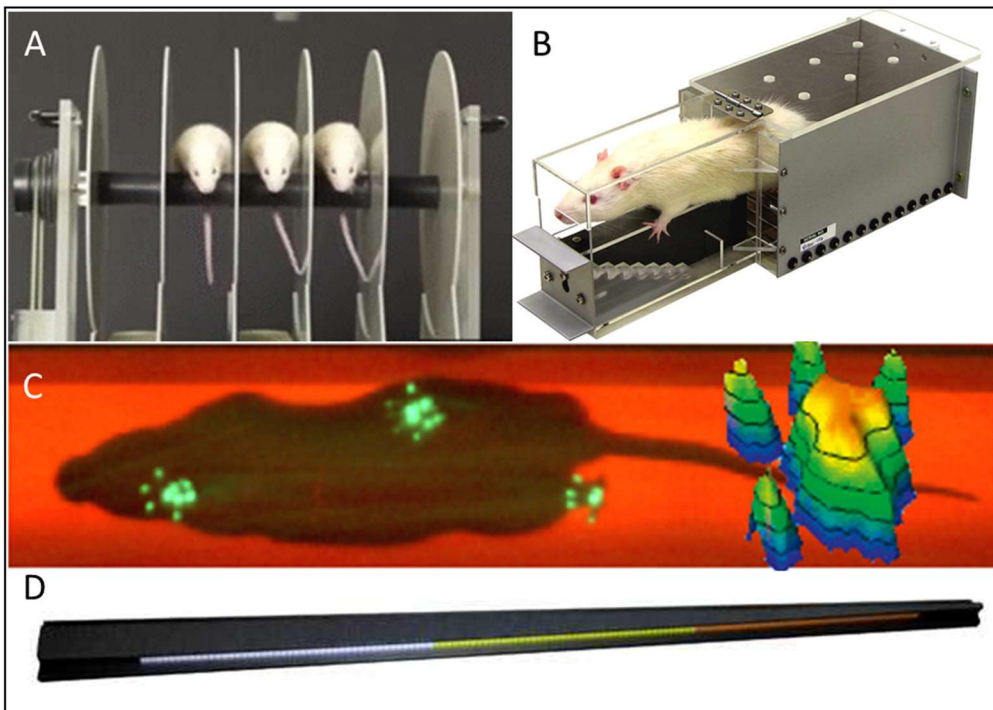


Figure 85 : Tests permettant d'évaluer la coordination motrice du rat. (A) Rotarod, (B) Staircase, (C) Catwalk, (D) Balance beam (site internet 16).



#### a) Staircase

Ce test permet d'évaluer la dextérité, la coordination motrice fine ainsi que la latéralité du rongeur (Montoya, 1991). Il s'agit d'une boîte assez étroite en plexiglass transparent, dans laquelle est placé le rat, mis à jeun la veille au soir, ou rationné en nourriture solide. L'animal circule alors vers l'extrémité de celle-ci où se trouve une planche surélevée, avec, de part et d'autre, un escalier de 7 marches, situé au-dessous du niveau de la planche (Figure 85 B). Le rat doit marcher sur la planche pour ensuite atteindre des friandises chocolatées (Chocapic®) disposées sur les marches en contrebas.

Le nombre de friandises mangées ou déplacées ainsi que leurs marches correspondantes sont les variables mesurées dans ce test. Un rat qui réussissait à atteindre les marches basses était considéré comme ayant une meilleure coordination motrice que ceux qui peinaient à attraper les friandises placés sur les premières marches.

Chaque côté a été testé séparément pendant 5 minutes, c'est-à-dire que la friandise était d'abord déposée pendant 5 minutes sur l'escalier droit, puis sur l'escalier gauche. Un entraînement de 3 ou 4 jours a été nécessaire, avant le jour du test. L'ordre droite/gauche a été modifié d'un jour à l'autre, de façon aléatoire.

#### b) Balance Beam Test

Il s'agit d'un test évaluant également la coordination motrice fine, la démarche et l'équilibre de l'animal (Luong, 2011). Placé sur une tige étroite surélevée, horizontale, d'un mètre de long, et de largeur de plus en plus réduite (3 cm au départ puis 1 cm à la fin), le rat doit la traverser pour arriver sur une plateforme plus stable et large, du côté étroit de la tige, où les animaux pouvaient se réfugier dans une boîte (Figure 85 D). Les animaux présentant une bonne coordination motrice n'ont pas de mal à traverser en adaptant la position de leurs pattes à la largeur de la planche. A l'inverse, ceux présentant un trouble de la coordination motrice fine peinent plus à s'adapter au support, et effectueront des « fautes ». Une patte qui n'était pas placée correctement sur la planche et qui glisse, entraînant un déséquilibre a été considérée comme une faute.

Pour ce test, les rongeurs doivent être entraînés 3 jours avant le 4<sup>e</sup> jour du test. Sont comptabilisés dans ce test le nombre de fautes et leurs distances sur la planche, et la durée nécessaire pour atteindre la plateforme. Une friandise était placée sur cette plateforme en guise de motivation.

#### c) Catwalk

Le système **Catwalk** permet l'analyse fine de la démarche de l'animal et la détection d'anomalies subtiles (Chen, 2014 ; Maricelli, 2016).

Nécessitant 2 jours d'entraînement, le test consiste à faire marcher les rats dans un tunnel surmontant une caméra, permettant d'enregistrer les empreintes des pattes et de les étudier ultérieurement (Figure 85 C). Au bout du tunnel se trouvait une boîte noire contenant une récompense ainsi que sa cage dans laquelle était placé son congénère. Tous ces éléments sont des motivations qui poussent l'animal à traverser le tunnel, d'autant plus que les rats ont été mis à jeun les veilles des sessions de test et d'entraînement. Une traversée n'a été prise en compte que si le rat ne s'est pas arrêté au milieu, et si sa vitesse n'a pas été trop variable au cours de la traversée du tunnel (évaluation visuelle par le manipulateur). Quatre à 7 traversées correctes ont été enregistrées pour chaque rat. Les traversées ont, par la suite, été traitées au moyen du logiciel Catwalk® (Noldus). Un grand nombre de paramètres très fins de la démarche ont été calculées, tels que l'écartement des pattes, la longueur de la foulée, la puissance d'appui, le pattern de marche utilisé, etc.



#### d) Rotarod

Le **Rotarod** est un axe rotatif sur lequel le rat est placé et doit nécessairement avancer pour ne pas tomber (Figure 85 A). Deux modes d'évaluation sont possibles : à vitesse de rotation constante ou en accélération (Haelewyn, 2007).

Ce test permet d'évaluer la motricité de l'animal. Une habitude est nécessaire de façon à mesurer réellement la capacité motrice, puisque le test peut être anxiogène et nécessite la coopération de l'animal. L'habitude a été faite à J1 (jour 1) sur la roue immobile puis à une vitesse constante de 15 RPM (rotations par minute) pendant 2 minutes. Le test a ensuite été répété 5 jours de suite.

Pour ces tests deux types de protocoles ont été réalisés : dans le premier, la vitesse de rotation de la roue était croissante, alors que pour le deuxième, plusieurs plateaux de vitesses ont été testés pendant 3 minutes chacun. Ces deux types de tests ont permis d'analyser l'adaptation à une vitesse de rotation et l'endurance pour un plateau de vitesse donné. Les rats ont été étudiés par groupes de quatre sur l'appareil, pendant 4 jours. La roue tournait à une vitesse progressive de 4 à 40 tours/mn (RPM) pendant 2 minutes ou, dans le second protocole, à une vitesse constante de 20, 28, 35 ou 40 RPM, pendant 3 minutes.

### J. Test sensoriels

#### e) Test d'olfaction

L'odorat de l'animal a été évalué par la mesure du temps qu'il a mis à retrouver et consommer 2 friandises cachées dans la litière d'une cage d'hébergement propre (Nathan, 2004). Un premier jour d'habitude à la cage, de 4 minutes, est nécessaire. Le lendemain, jour du test, chaque rat a disposé de 5 minutes pour trouver les 2 récompenses cachées. Une friandise était laissée au-dessus de la litière, afin de s'assurer de l'intérêt de l'animal pour la friandise.

#### f) Test de Von Frey

Les **filaments de Von Frey** permettent de déterminer le seuil de sensibilité de l'animal (Alamri, 2018). On a appliqué une pression sous les pattes arrière du rat à travers une cage grillagée, à l'aide de filaments plastiques de diamètre croissant. On a alors noté le diamètre minimal pour lequel l'animal soulève la patte.

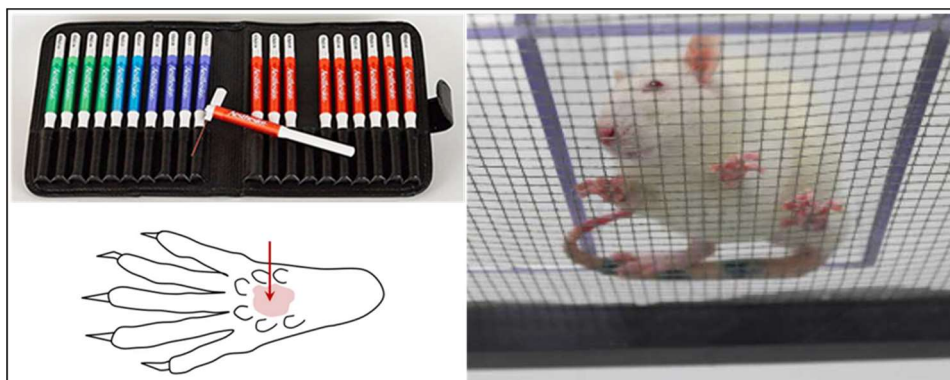


Figure 86 : Le test de Von Frey, consistant en l'application de filaments sous la patte du rat placé sur une grille, afin d'évaluer son seuil de sensibilité (d'après Ferrier, 2016).

#### 4. Euthanasies et prélèvement pour analyse histopathologique

Les rats dont les cerveaux étaient destinés à l'histologie ont été euthanasiés par exsanguino-perfusion cardiaque, après anesthésie par l'isoflurane (5%). Après section de l'oreillette droite, 50 mL de sérum physiologique ont été perfusés par le ventricule gauche (12 mL/min) suivi d'une perfusion de 150 mL de PFA 4% (12 mL/min), pour fixer les tissus. Les cerveaux ont été prélevés *post-mortem*, conservés dans du PFA 4% avant envoi dans un laboratoire spécialisé en histopathologie (Atlantic Bone Screen, Saint Herblain).

Pour rappel, à l'issue de cette étude, des rats ont été dédiés au dosage du Gd total dans les différentes zones du SNC. Ces résultats, ainsi que le suivi en IRM, ont été présentés en Partie II.

#### 5. Tests statistiques

Les tests statistiques ont été effectués au moyen du logiciel GraphPad Prism® 6.0. Pour chaque résultat, la normalité a été d'abord vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. Par la suite, différents tests ont été effectués (Tableau 14). Les résultats sont représentés sous forme de valeurs individuelles, et/ou moyenne  $\pm$  SD (écart-type standard). Les résultats des tests, s'ils sont significatifs, sont indiqués sur les graphes de la façon suivante : \* pour  $p < 0,05$  ; \*\* pour  $p < 0,01$  ; \*\*\* pour  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* pour  $p < 0,0001$ .

Tableau 14 : Choix des tests statistiques

Nombre de paramètres	Normalité	Valeurs appariées	Test	Post-test (si test significatif)
<b>1 paramètre et 2 groupes</b>	Oui	Non	Test t de Student	-
	Non	Non	Mann-Whitney	-
<b>1 paramètre et &gt; 2 groupes</b>	Oui	Non	ANOVA à un facteur contrôlé	Tukey
	Non	Non	Kruskal-Wallis	Dunn
<b><math>\geq 2</math> paramètres</b>	Oui	Non	ANOVA à deux facteurs	Sidak
	Oui	Oui	ANOVA pour mesures répétées	Sidak



## C. ETUDE 1 : Etude préliminaire de la manifestation d'une neurotoxicité, suite à l'injection répétée et à forte dose de gadodiamide (36 mmolGd/kg)

### 1. Introduction

Cette étude exploratoire a été réalisée pour des administrations répétées de 3 fois la dose clinique de gadodiamide. Le cumul de la dose injectée correspond en clinique à environ 60 examens IRM. Nous avons volontairement choisi des doses élevées, dans le but de potentialiser la survenue de signes de neurotoxicité et ainsi faciliter leur détection. La période d'étude post-injections était ici de 4 à 5 mois, ce qui peut être considéré comme un suivi sur le moyen terme.

Les rats étant des animaux nocturnes, et donc plus actifs dans l'obscurité, la question de réaliser les tests en cycle inversé (obscurité dans les laboratoires pendant la journée) a été évoquée. Cependant, il n'a pas été possible de l'appliquer dans notre animalerie. En compromis, nous avons choisi de travailler en lumière rouge pour l'analyse comportementale. En effet, les rats albinos ne voient pas dans le rouge, leurs yeux sont dépigmentés et ils sont aveuglés en cas de forte luminosité.

Des tests évaluant le comportement général, le niveau d'activité, l'anxiété, la coordination motrice, la mémoire, ainsi que l'apprentissage, ont été réalisés.

L'étude histologique a consisté en la recherche de lésions tissulaires, d'une astrogliose, de l'activation de la microglie, ainsi que d'une éventuelle abondance des dépôts de lipofuscine, comme observés en microscopie électronique (publication 3).

En complément, une étude plus fine de la recherche de marqueurs de toxicité ou de modifications d'ordre biochimique a été réalisée grâce à la spectroscopie RMN au niveau des noyaux cérébelleux profonds.

Une microdialyse a été effectuée pour évaluer l'impact de la rétention cérébrale de Gd sur les concentrations et la présence de certains neurotransmetteurs ou de marqueurs de toxicité, localement dans les noyaux cérébelleux profonds. Nous avons aussi recherché l'éventuelle présence de gadolinium stocké, s'il est possible de l'extraire sous sa forme de stockage, et ainsi de tenter d'en déterminer l'espèce (ou les espèces) présente(s) en spectrométrie de masse.



## 2. Matériel et Méthodes

### A. Modèle de l'étude

L'étude a été réalisée sur 32 rats femelles Spague-Dawley (OFA, Charles River). Les rats étaient initialement âgés de 6 semaines et pesaient entre 180 et 200 g.

Dans cette étude, il a été choisi de séparer les animaux en deux groupes, pour éviter les multiples anesthésies gazeuses nécessaires aux IRM susceptibles d'avoir un impact sur le comportement des rats :

- *le groupe « comportement »*, constitué de 20 animaux, qui ont entre autres passé la batterie de tests comportementaux (n=10 rats/produit injecté, hébergés par 2).
- *le groupe « IRM »*, constitué de 12 rats, sur lesquels les examens IRM (résultats présentés dans la Partie II) et les prélèvements sanguins ont été réalisés (n=6 rats/ produit injecté, hébergés par 3).

Les différentes expériences effectuées sur chacun de ces deux groupes sont présentées dans le Tableau 15. La répartition des rats par groupe et par traitement a été randomisée et la totalité de l'étude a été effectuée en aveugle.

Tableau 15 : Paramètres étudiés selon les groupes (\* : ces paramètres ont été présentés en Partie II).

Paramètres étudiés	Groupe comportement (n=10/traitement)	Groupe IRM (n=6/traitement)
Tests neuro-comportementaux	X	
Microdialyse des noyaux cérébelleux profonds	X	
Spectroscopie RMN	X	
Dosage du Gd total dans le cerveau*	X	
IRM*		X
Histologie		X
Dosage de marqueurs de toxicité plasmatiques		X

### B. Injections et organisation générale de l'étude

Les 32 rats ont reçu soit une solution saline NaCl 0,9% (300 mOsm/kg d'eau) (3,6 mL/kg), soit du gadodiamide (Omniscan®) à la dose de 1,8 mmolGd/kg, à raison de 4 injections par semaine pendant 5 semaines. Cela correspond donc à dose cumulée administrée de 36 mmolGd/kg. La dose de Gd reçue à chaque injection de gadodiamide correspond à 3 fois la dose clinique.

Une fois les injections terminées pour les deux groupes, le groupe « comportement » a été étudié au moyen d'une batterie de tests s'organisant sur une période de 10 semaines. Par la suite, ce groupe a été transféré au centre de recherches du CEA de Fontenay-aux-Roses, au sein de l'unité MIRCen. Après une nouvelle semaine d'acclimatation, nous y avons réalisé deux nouveaux tests comportementaux (actimétrie et Catwalk) ainsi qu'une analyse par spectroscopie RMN. Enfin, nous avons procédé à la microdialyse des DCN avant l'euthanasie des animaux.

Parallèlement à ces études, des prélèvements sanguins (sublinguaux, 650 µL) toutes les semaines pendant la période d'administration, puis toutes les 3 semaines ensuite, sur les rats du groupe « IRM » (Figure 87). A l'issue de ces études, les animaux ont été euthanasiés et une étude histologique cérébrale a été réalisée.





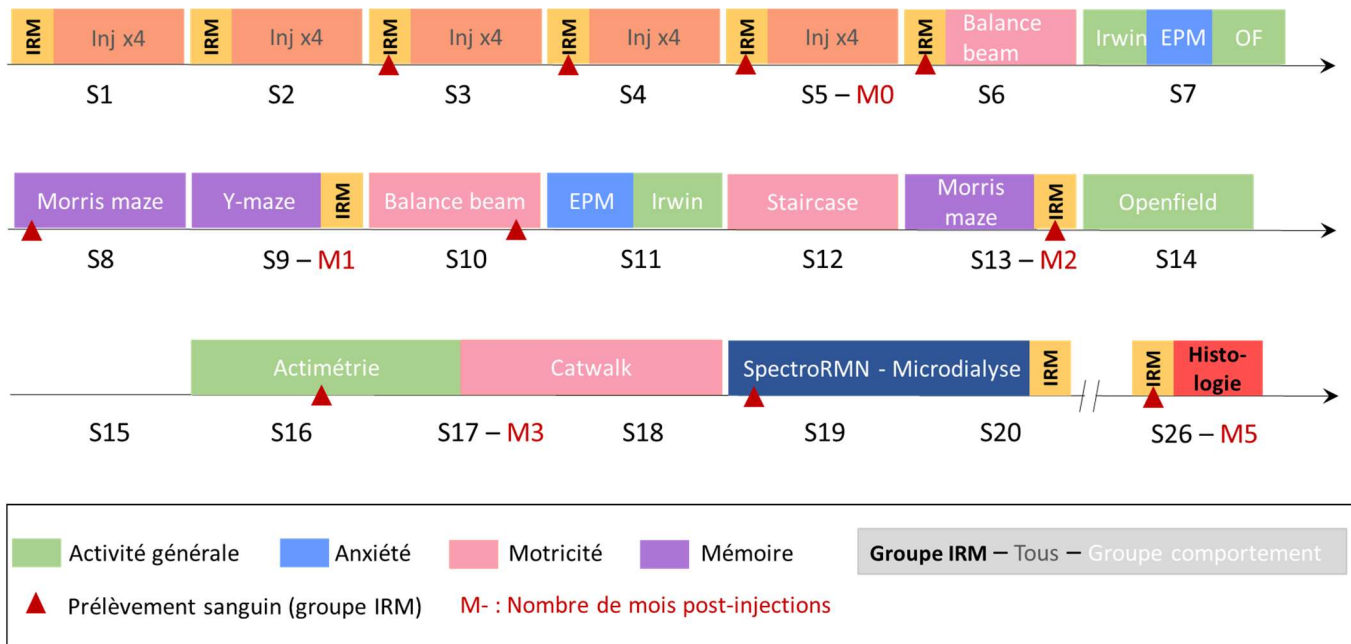


Figure 87 : Chronologie générale de l'étude (Inj : injection ; OF : Openfield, EPM : « Elevated Plus Maze » ou labyrinthe en croix surélevée). Le groupe concerné est indiqué par la couleur de l'écriture (voir légende).

### C. Étude comportementale

Différents tests comportementaux (présentés en Tableau 16) ont tous été effectués l'après-midi, en lumière rouge (luminosité comprise entre 80 et 170 lux selon les tests).

Tableau 16 : Résumé des tests comportementaux choisis

Comportement testé	Test sélectionné
Activité générale	Irwin modifié Open Field Actimétrie
Anxiété	Labyrinthe en croix surélevée (EPM) Open Field
Mémoire	Piscine de Morris Labyrinthe en Y
Coordination motrice fine	Balance Beam Staircase Catwalk

### D. Spectroscopie RMN

La spectroscopie RMN a été effectuée sur les rats du groupe « comportement » au laboratoire MIRCen, sur une IRM Bruker Biospec® 11,7 Tesla.

Les animaux anesthésiés à l'isoflurane ont tout d'abord été imagés par IRM avant spectroscopie RMN. Le voxel de 9mm<sup>3</sup> pour la spectroscopie a été placé sur un des DCN. Les séquences réalisées ont donc été les suivantes :



- Localizer : Image de repérage pour le positionnement des coupes
- Flash pondérée-T1 : Résolution =  $125 \times 125 \times 500 \mu\text{m}^3$ , 15 coupes de  $500 \mu\text{m}$ , TE = 2 ms, TR = 120 ms, FA =  $50^\circ$
- Cartographie Bo + shim : Séquence nécessaire pour la procédure Mapshim
- Laser-métabolites : Voxel =  $4 \times 1.5 \times 1.5 \text{ mm}^3$ , Positionnement sur le noyau droit. TE = 20 ms, TR = 5000 ms.
- Laser-macromolécules : Voxel =  $4 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$

Les mesures du signal ont été faites sur une ROI rectangulaire de  $3 \times 1,5 \times 1 \text{ mm}$ , situé au niveau des DCN de l'hémisphère droit.

### E. Microdialyse

Une procédure de microdialyse a été effectuée sur les rats du groupe « comportement », afin d'évaluer l'impact de la rétention cérébrale sur la présence et les concentrations de certains neurotransmetteurs ou de marqueurs de toxicité dans les noyaux cérébelleux profonds.

#### a) Implantation du guide

Après administration préalable de buprénorphine par voie sous-cutanée ( $1,7 \text{ mL/kg}$  de Buprécare® à la concentration de  $0,03 \text{ mg/mL}$ ), et anesthésie par isoflurane ( $4\%$  pour l'induction puis  $2,5\%$  pendant la chirurgie) de l'animal, celui-ci est installé sur le cadre stéréotaxique. Une fois le crâne rasé et désinfecté par la povidone iodée (Vétédine® solution), le rat a été analgésié au moyen de  $0,4 \text{ mL}$  de xylocaïne sans adrénaline, en 2 points d'injection sous-cutanés. L'analgésie agit dès 5 minutes post-injection. La peau du crâne a alors été incisée au scalpel et les membranes ont été dégagées pour accéder aux os du crâne. L'incision doit permettre de visualiser le Bregma (point de jonction entre les os pariétaux et l'os frontal) et le Lambda (point de jonction entre les os pariétaux et l'os occipital). La perforation de l'os occipital a été faite aux coordonnées des DCN (le noyau interposé était visé), calculées après relevé des coordonnées stéréotaxiques du Bregma (Antéro-Postérieur :  $-12,6 \text{ mm}$  / Latéral :  $+2,4 \text{ mm}$  / Hauteur :  $-5,6 \text{ mm}$ ) (Paxinos & Watson 2007). Grâce à une foreuse manuelle, l'os occipital et les os pariétaux ont alors été perforés pour l'insertion respectivement du guide et de 2 vis qui servent de point d'ancrage du ciment. Le guide était maintenu par collage au ciment dentaire (Dentalon®, Phymep) sur toute la surface découverte du crâne. Un tube a alors été déposé et collé autour du guide avec du ciment dentaire afin de le protéger et d'éviter son détachement par le rat à son réveil. Une fois le ciment séché, la peau du crâne était suturée autour du tube. Pour réhydrater le rat, une injection de  $4 \text{ mL}$  de Ringer Lactate en 2 points en sous-cutanée était faite avant son réveil en cage chauffée. L'analgésie post-opération a consisté en du paracétamol (Doliprane®) ajouté à l'eau de boisson ( $1,25 \text{ mL}$  de paracétamol +  $2 \text{ mL}$  de sirop de fruit pour  $200 \text{ mL}$  d'eau).

#### b) Dialyse

Afin d'humidifier les sondes (CMA-12, membrane de  $1 \text{ mm}$ , cut-off de  $20 \text{ kDa}$ ), celles-ci ont été perfusées entre 24 et 7h avant leur implantation, à  $0,5 \mu\text{L/min}$  avec du dialysat (CNS Perfusion Fluid®, Phymep). Le surlendemain de l'implantation, après anesthésie de l'animal par l'isoflurane (induction à  $4\%$ , puis  $2,5\%$  pendant la perfusion) et retrait du guide métallique, la sonde pré-perfusée a été insérée. La dialyse s'est déroulée pendant 2 h à un débit de perfusion de  $1 \mu\text{L/min}$ , avec changement de collecte toutes les 20 minutes



(soit, donc, 6 fractions collectées) (Marmolino, 2010). Le dialysat est collecté sur glace et chaque collecte est congelé à -80°C.

#### c) Eléments dosés dans le dialysat

Un automate de microdialyse (ISCUSflex<sup>®</sup>, 4med) a permis de doser, dans les 3 dernières fractions collectées, le glycérol, le pyruvate, le lactate, le glucose, le glutamate et l'aspartate (voir la description de ces molécules dans le chapitre III.3 « Méthodes d'évaluation d'une éventuelle neurotoxicité »).

#### d) Dosage de marqueurs circulants de neurotoxicité

Les biomarqueurs de toxicité ont été dosés dans le plasma des rats du groupe IRM. Les marqueurs qui ont été retenus sont le GABA et UCHL1 (voir chapitre III.3 « Méthodes »). Les dosages immunoenzymatiques ont été réalisés pour les prélèvements correspondant aux délais post-injection (M0, S6) (voir Figure 87), puis 1 mois (S10) et 3 mois (S19) après.

Les kits ELISA ont été réalisés sur du plasma pur pour UCHL-1, dilué 20 fois pour GABA (référence SEG945Ra et CEA900Ge, Cloud-Clone Corp.).

### F. Euthanasies

Pour les rats du groupe comportement, le sacrifice a eu lieu immédiatement après la microdialyse, sans réveil. A la suite des 2 heures de perfusion, un prélèvement de 1 mL de sang en sublingual ou en intracardiaque a été effectué. Les animaux ont ensuite reçu 0,4 mL de pentobarbital (Exagon<sup>®</sup> 400mg/mL, Richter Pharma) par voie intra-péritonéale. Le cerveau a été prélevé et finement disséqué pour récupérer les structures en vue d'un dosage du Gd total (résultats présentés en Partie II).

Les rats du « groupe IRM » ont été euthanasiés par exsanguino-perfusion cardiaque, après anesthésie par l'Isoflurane (5%). Les cerveaux ont été prélevés *post-mortem*, conservés dans du PFA 4% avant envoi dans un laboratoire spécialisé en histopathologie (Atlantic Bone Screen, à Saint Herblain).

### G. Histologie

L'examen histologique des cerveaux des animaux du groupe « IRM », prélevés 5 mois après la période d'injection, a été effectué en aveugle par un laboratoire spécialisé (ABS, Saint Herblain). Les marquages effectués sont présentés dans le Tableau 17.



Tableau 17 : Résumé des paramètres de l'analyse histologique

Marquage	Principe	Paramètres évalués
<b>HES (coloration)</b>	Coloration des divers organismes cellulaires : Noyau : bleu Cytoplasme de globules rouges : rouge Cellules immunitaires basophiles : pourpre	Présence d'anomalies tissulaires, lésions. Intensité scorée de 0 à 5
<b>Crésyl Violet (coloration)</b>	Coloration du noyau, des ribosomes et des corps de Nissl, tous très basophiles	Présence d'anomalies tissulaires, lésions. Intensité marquée de 0 à 5
<b>Lipofuscine (autofluorescence)</b>	Détection des pigments de lipofuscine par fluorescence (débris cellulaire lipidique)	Quantification de la fluorescence dans les DCN à l'aide d'un logiciel (ImageJ)
<b>GFAP (immuno-marquage)</b>	Protéine de certaines cellules gliales. Mise en évidence d'une astrocytose	Présence d'astrocytes hypertrophiés, marqué : 0 : aucune cellule 1 : rares cellules 2 : densité faible/modérée 3 : forte densité
<b>CD68 (immuno-marquage)</b>	Coloration de la glycoprotéine CD68 exprimée par les monocytes et les macrophages	Microglie périvasculaire activée, marqué : 0 : aucune cellule 1 : 0-1 cellule CD68+ / vaisseau 2 : 1-2 cellule(s) CD68+ / vaisseau 3 : >2 cellules CD68+ / vaisseau  Microglie activée dans le neuropile (diffus), marqué : 0 : aucune cellule 1 : rares cellules 2 : densité cellulaire faible/modérée 3 : forte densité cellulaire



### 3. Résultats

Le suivi de la prise pondérale n'a pas révélée de différence significative entre les groupes. Aucune mortalité n'a été notée. Si rien n'a été relevé chez les rats du groupe témoin, cinq de ceux traités par le gadodiamide ont présenté dès la semaine 7 de l'étude (soit 2 semaines post-injection) des lésions cutanées. Ces lésions étaient de petite taille (0,5 cm de diamètre en moyenne), rouges, non purulentes, et réversibles. Leur disparition a été constatée en moyenne 2 semaines après leur apparition (donc avant le début de l'étude comportementale, n'interférant donc probablement pas avec celle-ci). De plus, des « croûtes » blanches et rouges ont été observées sur les pattes de 3 rats du groupe gadodiamide. Ces croûtes ont également disparu dans les 3 semaines suivant leur apparition.

#### A. Comportement

##### a) Comportement général

###### (i) Test d'Irwin

L'observation des rats dans leur cage n'a montré aucun élément suspect, le comportement des rats semblait similaire, quel que soit le groupe. Les interactions sociales, les réponses aux stimuli sensitifs (pincement de la patte, vérification du tonus palpébral), ou encore leur agitation étaient identiques entre les groupes.

Pour le test d'agrippement, il apparaît que les rats ne coopéraient pas tous, mais arrivaient tous à s'accrocher à la barre (données non présentées). L'absence de dispositif nous permettant de mesurer la force développée par chaque animal pour s'agripper ne nous permet pas d'obtenir plus de données sur ce test.

Enfin, sur le test des barres parallèles, aucune différence majeure entre les deux groupes n'est ressortie. Assez rapidement, les rats ont réussi à se maintenir en équilibre sur la barre pendant plus de 90 secondes, se déplaçant plus ou moins sur toute la longueur de la barre.

###### (ii) Activité locomotrice

Le test d'actimétrie effectué sur 46 heures a permis de calculer la distance totale parcourue par les rats, mais aussi de mesurer leur distance parcourue heure par heure.

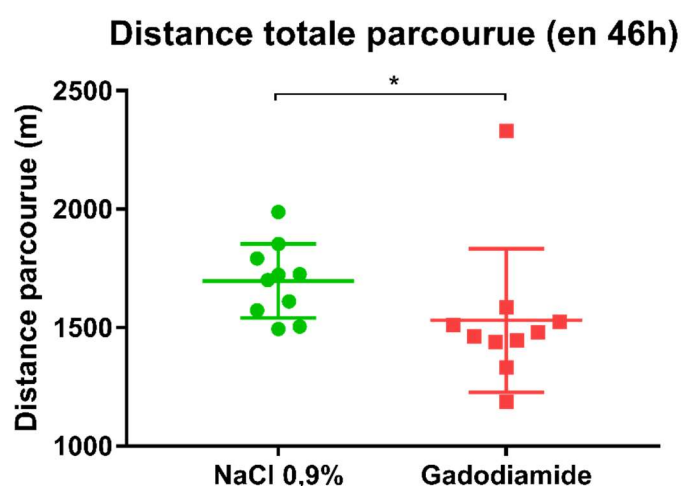


Figure 88 : Distance totale parcourue en 46h dans la cage d'activité (PhenoTyper® de Noldus). Les rats ont eu libre accès à l'eau et à la nourriture pendant 46 h et ont été séparés de leurs congénères. La distance totale parcourue est mesurée par le logiciel EthoVision® (Noldus).





La Figure 88 montre que les rats du groupe gadodiamide parcourent une distance plus faible en 46 h que les rats témoins ( $1697 \pm 156$  m pour les rats témoins vs.  $1530 \pm 303$  m pour le groupe gadodiamide ( $p = 0,0115$ ), ou  $1441 \pm 118$  m sans le rat au comportement distinct des animaux de son groupe).

Le détail des distances parcourues heure par heure montre plusieurs phases (Figure 89). Tout d'abord, les rats des deux groupes parcourent une grande distance pendant la première heure que durant le reste des 46 h, ce qui correspond très probablement à un comportement exploratoire de ce nouveau milieu. Par la suite, le cycle d'activité jour/nuit semble respecté quel que soit le traitement, les rats des deux groupes parcourent une distance plus importante pendant la nuit (période d'activité) plutôt que le jour, avec une activité locomotrice plus importante pour le groupe témoin (vert) que du groupe gadodiamide (rouge) (Figure 89).

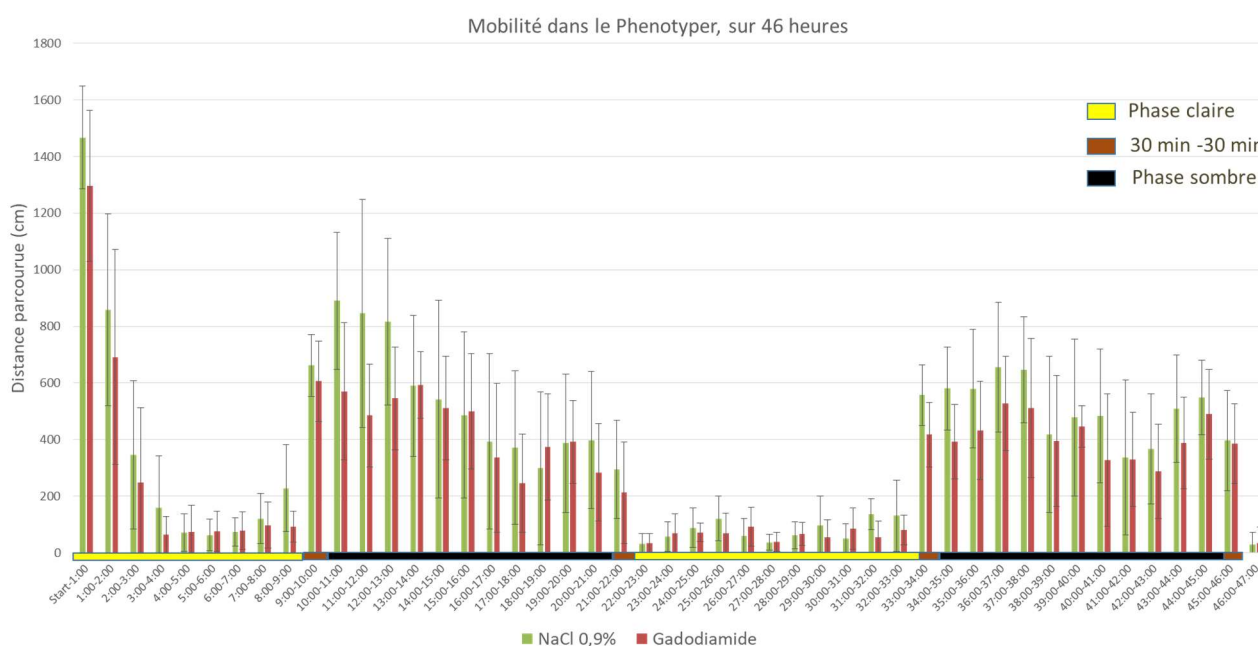


Figure 89 : Distance parcourue chaque heure pendant les 46h d'actimétrie. Les distances sont mesurées par le logiciel EthoVision® (Noldus). Pour chaque groupe, l'effectif est de  $n=10$  rats/groupe.

En conclusion, sur ce test d'actimétrie, on note une diminution significative de l'activité des rats traités par le gadodiamide comparativement aux animaux témoins.

### (iii) Openfield

Les résultats présentés sont issus de 2 sessions, séparées de 7 semaines (semaine 7 et semaine 14).



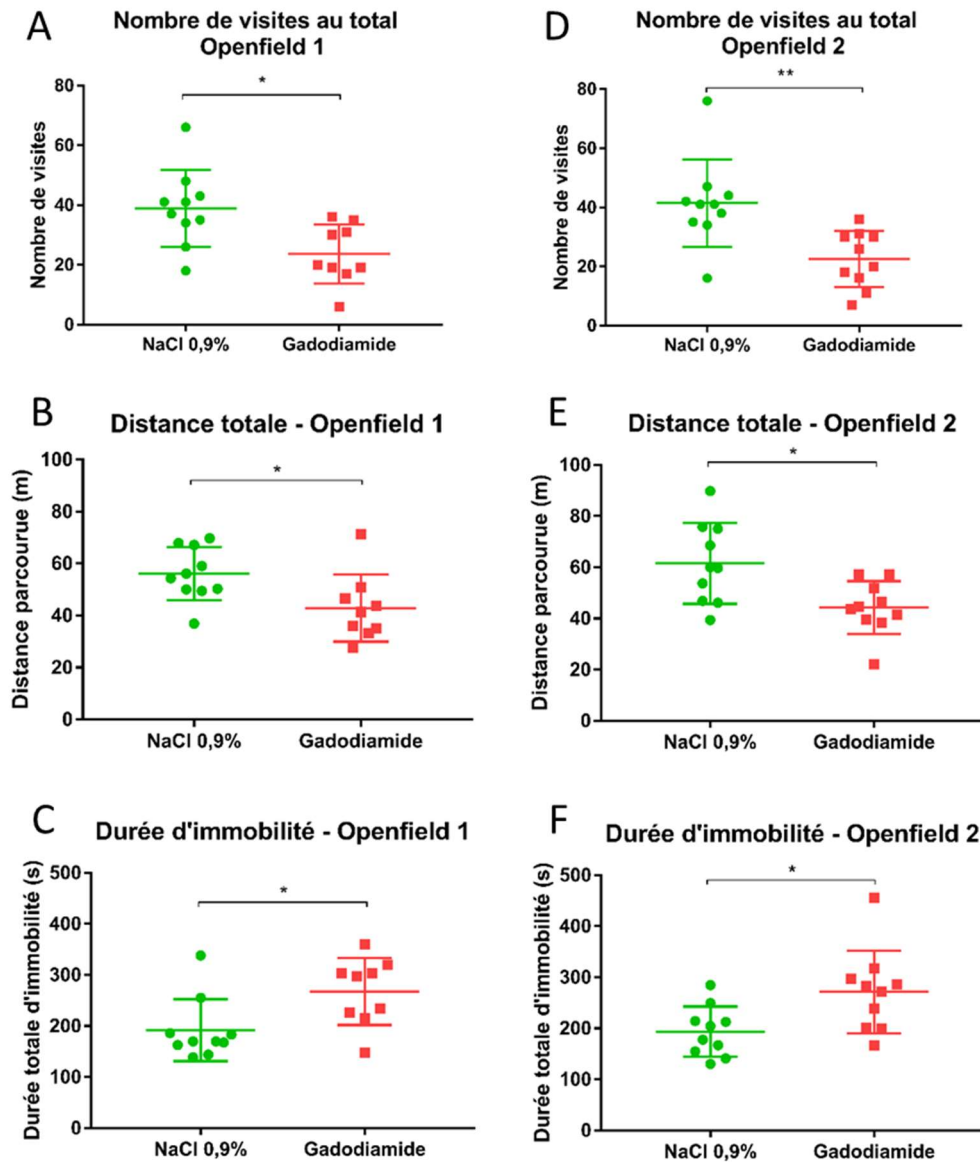


Figure 90 : Représentation de l'activité des rats placés en openfield selon les groupes et les sessions (Openfield 1 : semaine 7 ; Openfield 2 : semaine 14), à travers le nombre de visites des zones (transitions centre/périphérie) (A, D), la distance totale parcourue (B, E), et la durée d'immobilité totale (C, F), pendant les 10 minutes d'exploration.

Comme cela a été constaté précédemment par l'analyse de la locomotion des rats dans les cages d'activité, on note une diminution de l'activité des rats du groupe gadodiamide par rapport aux rats témoins. Les rats ont effectué moins de transitions entre les zones, ont parcouru une distance plus faible, ce qui est probablement dû à une durée d'immobilité cumulée plus longue. La vitesse enregistrée a ainsi été plus faible en périphérie (non présentée), mais identique (et plus rapide) au centre. Il ne semble donc pas s'agir d'un problème d'ordre moteur.

En conclusion, sur la composante « activité » de l'openfield, on observe une diminution significative de l'activité des rats traités par le gadodiamide par rapport aux rats témoins, pour les deux sessions expérimentales.



b) Anxiété

(i) *Openfield*

L'Openfield présentant une zone anxiogène (le centre) et une autre moins anxiogène (les bords), ce test permet aussi une évaluation de l'anxiété des animaux. Pour cela, le temps passé au centre de l'openfield a été relevé pour chaque session, ainsi que le nombre de visites de la zone. Une visite est comptabilisée quand les 4 pattes de l'animal sont placées dans la zone. Ainsi, le nombre d'entrées (ou transitions) dans les deux zones n'est pas identique.

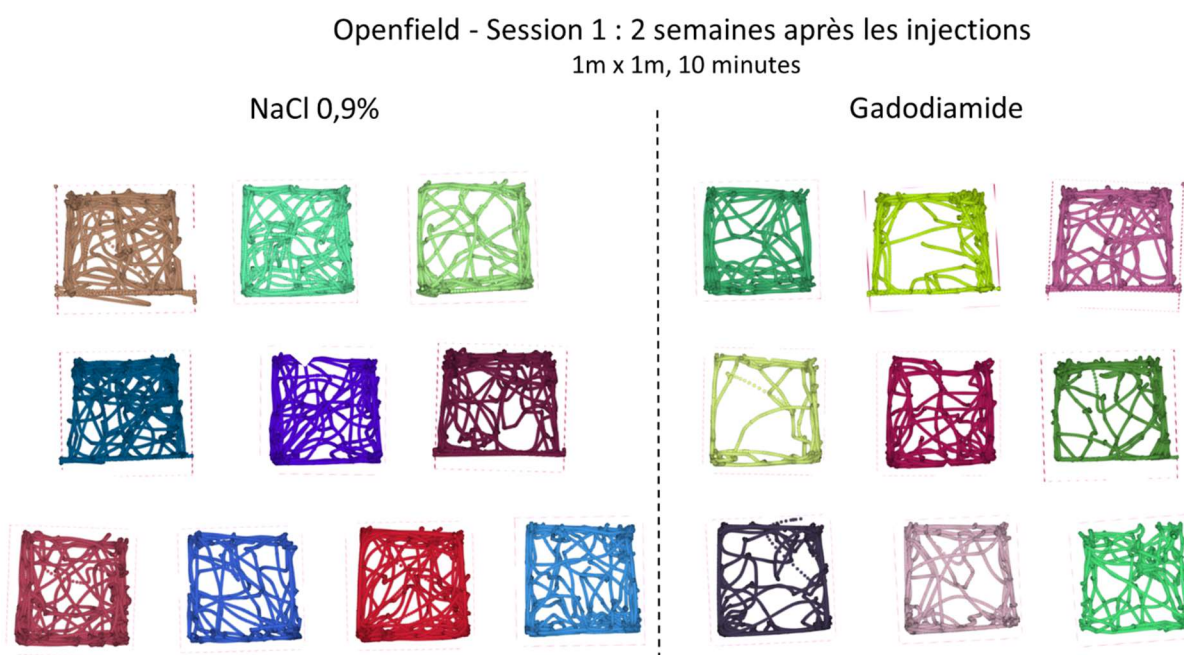


Figure 91 : Représentation (logiciel ActualTrack®) des tracés des déplacements des animaux dans l'openfield lors de la session 2 (semaine 14). Les rats du groupe gadodiamide semblent moins se déplacer, et rester plus en périphérie (zone non anxiogène, en opposition à la zone centrale). L'une des vidéos du groupe NaCl 0,9% n'a pas été enregistrée correctement, ce qui explique un effectif de 9 animaux.

Afin de s'affranchir de l'hypoactivité du groupe gadodiamide par rapport aux témoins, et de pouvoir étudier le caractère anxieux des rats sans ce biais, nous avons décidé de corriger de l'activité les paramètres de l'openfield classiquement présentés (durée et nombres de visites des zones). En effet, le nombre de visites total significativement plus faible pour le groupe gadodiamide. Nous avons donc normalisé par rapport à l'activité de chaque animal. Le pourcentage d'activité dans le centre a ainsi été calculé comme la durée d'activité dans le centre (animal non immobile), sur la durée d'activité totale (soit, donc, 10 minutes desquelles on a ôté la durée d'immobilité).

Si l'on s'intéresse d'abord au comportement des rats témoins sur ce test, nous observons que l'immobilité a presque exclusivement été observée en périphérie de l'openfield, et pas au centre (non présenté). Cela montre bien le caractère anxiogène du centre, où les rats ne s'attardent pas. Ils n'ont passé que 13% de leur durée d'activité totale au centre (Figure 92 A), et cette zone anxiogène n'a représenté que 21% de la distance parcourue (Figure 92 B) (session 1). En session 2, les rats témoins ont visité un peu plus cette zone centrale. Bien qu'il ait été réalisé en lumière rouge (rendant le centre moins lumineux et anxiogène qu'en lumière blanche), le test peut donc être considéré valide.



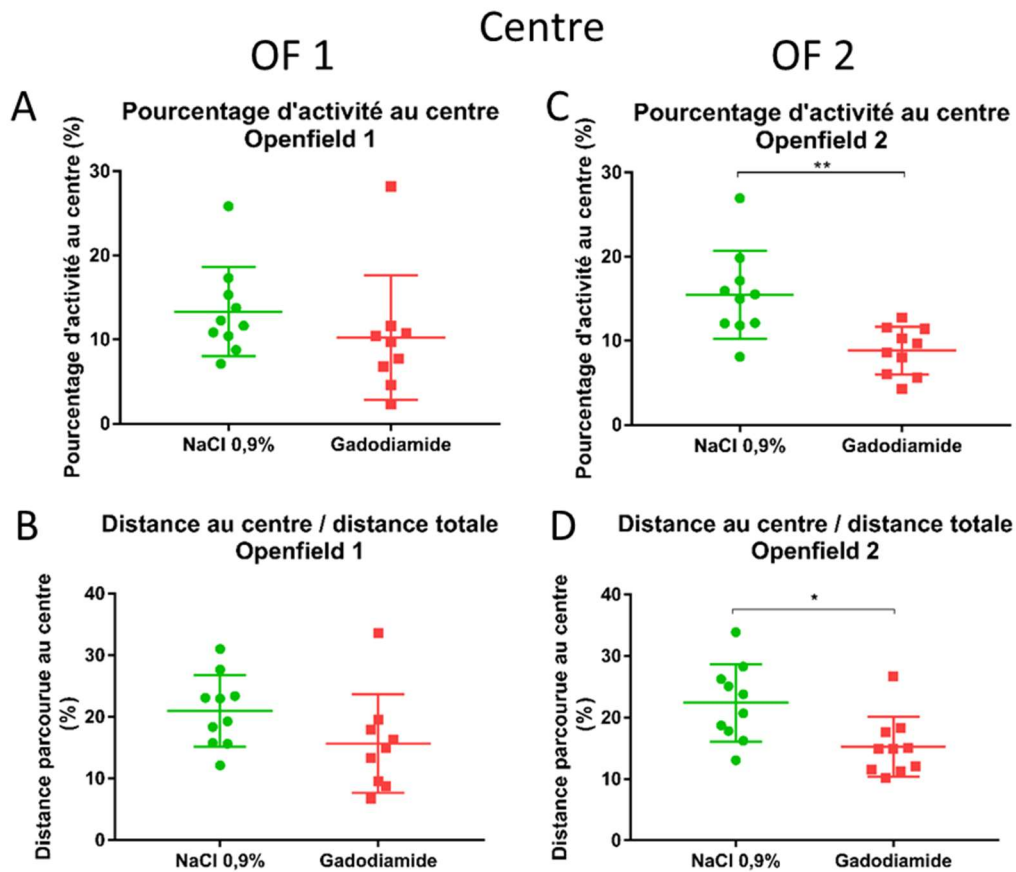


Figure 92 : Etude du caractère anxieux des rats, à travers le pourcentage d'activité au centre (A, C), et le ratio de distance au centre (B, D).

Une fois affranchis du biais de l'activité, on ne retrouve pas de différence significative d'anxiété entre les deux groupes pour la session 1 ( $p = 0,0653$  en A,  $p = 0,1263$  en B). En revanche, sur la session 2 les écarts se sont amplifiés et une diminution significative du pourcentage d'activité (C) et de la distance parcourue au centre (D) a été calculée pour les rats du groupe gadodiamide par rapport aux témoins, ce qui peut être interprété comme un signe d'anxiété.

En conclusion, pour la composante « anxiété » du test de l'openfield, on observe une diminution de l'activité et de la distance parcourue au centre du dispositif chez les rats du groupe gadodiamide par rapport aux témoins (à la seconde session), ce qui est compatible avec une diminution du seuil d'anxiété.

#### (ii) Labyrinthe en croix surélevée

Le test du labyrinthe en croix surélevée (ou « elevated plus maze », EPM) a été effectué à deux reprises (EPM1 et EPM2) pendant la période de « wash-out », avec un délai d'un mois entre les deux sessions (semaine 7 et semaine 11).

Ce test, composé de 3 zones (carré central, bras fermés, et bras ouverts anxiogènes), permet l'évaluation de l'anxiété du rongeur, sur le même principe que l'openfield (Pellow, 1985). Les rats explorent librement le dispositif durant 10 minutes. Sont calculés le temps passé dans les bras ouverts ou fermés, le nombre d'entrées dans un bras ouvert ou fermé et le pourcentage d'entrées dans chaque type de bras par rapport au nombre total de visite des bras. Un animal n'est considéré présent dans un bras que si ses 4 pattes sont à l'intérieur.



L'activité des rats étant là encore un biais pour l'exploitation des résultats, elle a de nouveau été prise en compte. L'angle de vue de la caméra n'a pas permis l'analyse automatisée de ce test. Pour approcher l'activité, nous n'avons donc disposé que du nombre total de visites.

Lors de la session 1, le nombre de transitions entre les différents bras a été plus faible dans le groupe gadodiamide que chez les témoins ( $14 \pm 6$  entrées d'un bras à l'autre vs.  $25 \pm 12$  entrées,  $p < 0,05$ ) (Figure 93). Les rats gadodiamide se déplacent donc moins d'un bras (quel qu'il soit) à un autre dans le dispositif. Le nombre de transitions entre les bras sur la deuxième session est resté significativement plus faible pour le groupe gadodiamide que pour le groupe témoin ( $20 \pm 7$  entrées vs  $32 \pm 13$  entrées,  $p < 0,05$ ). Le groupe gadodiamide s'est donc avéré moins actif sur ce test, aux deux sessions.

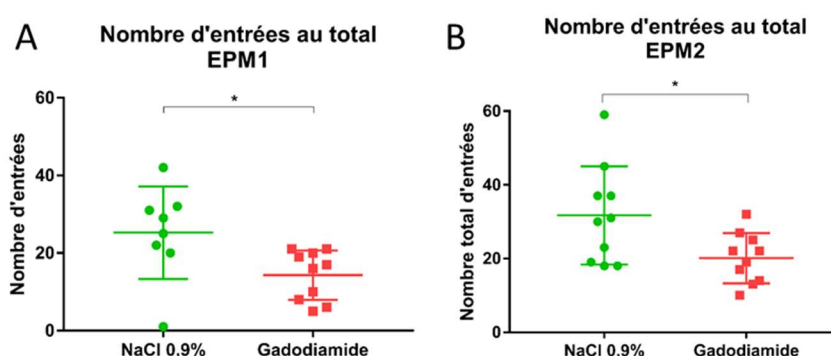


Figure 93 : Nombre de transitions entre les différentes zones, reflétant l'exploration et donc l'activité des rats. Pour la session EPM1, deux vidéos ont mal été enregistrées, d'où  $n=10$  pour le groupe gadodiamide mais  $n=8$  pour le groupe témoin.

Concernant le caractère anxiogène du test, nous observons que le pourcentage de visite des bras ouverts chez les témoins a été proche de 50% (Figure 94 A), et qu'ils y ont passé plus d'un tiers de leur temps (Figure 94 B). Cela indique que les bras ouverts ne sont finalement pas aussi anxiogènes que souhaité. Cela peut s'expliquer par la largeur de ceux-ci associée à un travail en lumière rouge. Nous pouvons cependant comparer le comportement du groupe gadodiamide avec celui des témoins.

Au cours de la session 1, si les rats des deux groupes ont visité proportionnellement autant les bras ouverts, le groupe gadodiamide semble moins s'y être aventuré en session 2 (Figure 94 D,  $p = 0,1083$ , ns). De plus, cette fois, le groupe gadodiamide a passé significativement moins de temps dans les bras ouverts, anxiogènes, que le groupe témoin ( $86 \pm 109$  secondes pour le gadodiamide vs  $193 \pm 115$  secondes pour le NaCl 0,9%,  $p < 0,05$ ) (Figure 94 E), et par conséquent plus de temps dans les bras fermés qui sont plus « rassurants ». La correction par le temps passé dans la zone centrale (neutre) a été réalisée pour accéder au pourcentage du temps de visite (Figure 94 C et F), mais cela n'a pas apporté d'information supplémentaire (témoin vs gadodiamide,  $p = 0,0775$ ).





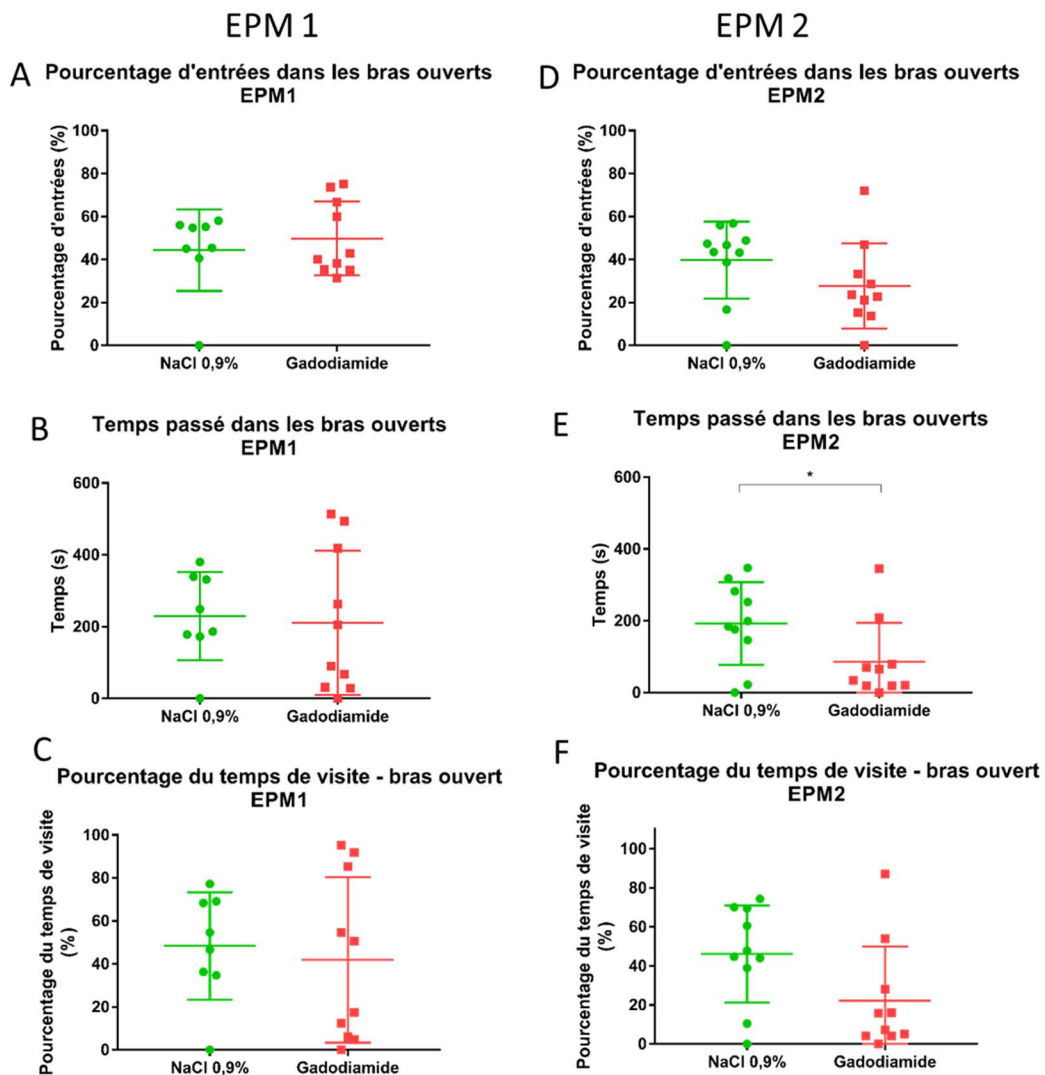


Figure 94 : Paramètres mesurés pour les bras ouverts (anxiogènes) lors des 2 sessions EPM1 et EPM 2 du test du labyrinthe en croix surélevée.

Les grands écarts-types obtenus pour ce test s'expliquent surtout parce que certains rats ne se sont que très peu, voire même pas du tout, déplacés, et ont séjourné plus de 8 minutes sur les 10 au total dans le même bras.

En conclusion, la durée de présence des rats du groupe gadodiamide dans les bras ouverts a été significativement plus faible que celle des rats témoins (session 2), ce qui peut être interprété comme le reflet d'un comportement anxieux.

c) Mémoire

(i) Piscine de Morris

Le test de la Piscine de Morris, permettant d'évaluer la mémoire à long terme du rat, a été effectué 2 fois (semaine 8 et semaine 13).

A chaque session, durant les entraînements, le temps passé par chaque rat à chercher la plateforme est chronométré, pour évaluer l'apprentissage. Pour les deux sessions, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes (données non présentées). Les deux groupes ont passé, chaque jour, des durées équivalentes pour trouver la plateforme. Il est à noter que cette durée a diminué jour après



jour, ce qui, est cohérent avec un apprentissage des animaux, sans qu'une différence significative entre les groupes n'apparaisse.

Le jour du test, les rats témoins n'ont séjourné qu'un peu plus d'un quart du temps dans le bon quadrant sur la première minute d'exploration ( $16,3 \pm 5,3$  secondes en session 1 et  $18,9 \pm 4,4$  secondes en session 2), ce qui paraît peu. L'apprentissage évalué lors des jours précédents était pourtant concluant. Une fois la disparition de la plateforme constatée, les rats ont semblé vite partir à sa recherche ailleurs. Le groupe gadodiamide a passé légèrement plus de temps dans le quadrant correct. Aucune anomalie de la mémoire spatiale à moyen terme n'est donc notée.

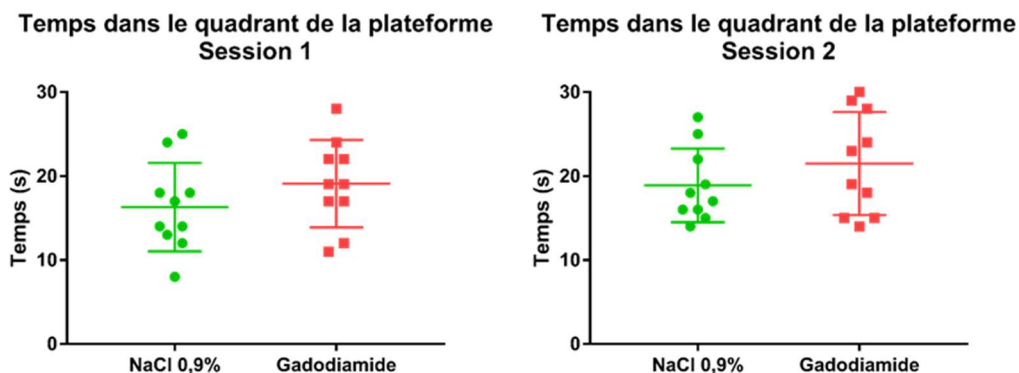


Figure 95: Temps passé dans le quadrant où se situait la plateforme pour les deux sessions.

En conclusion, le test de la piscine de Morris n'a permis de déceler aucune anomalie de la mémoire spatiale à moyen terme chez les rats du groupe gadodiamide.

#### d) Coordination motrice

##### (i) *Balanced Beam*

Ce test permet d'évaluer la coordination motrice fine et l'équilibre de rats placés sur une tige de bois dont la largeur diminue progressivement. Effectué sur deux sessions, en semaines 6 et 10, ce test a nécessité 3 jours d'entraînement avant le jour du test. Les fautes (glissement des pattes) ont été comptabilisées ainsi que leur emplacement sur la tige.

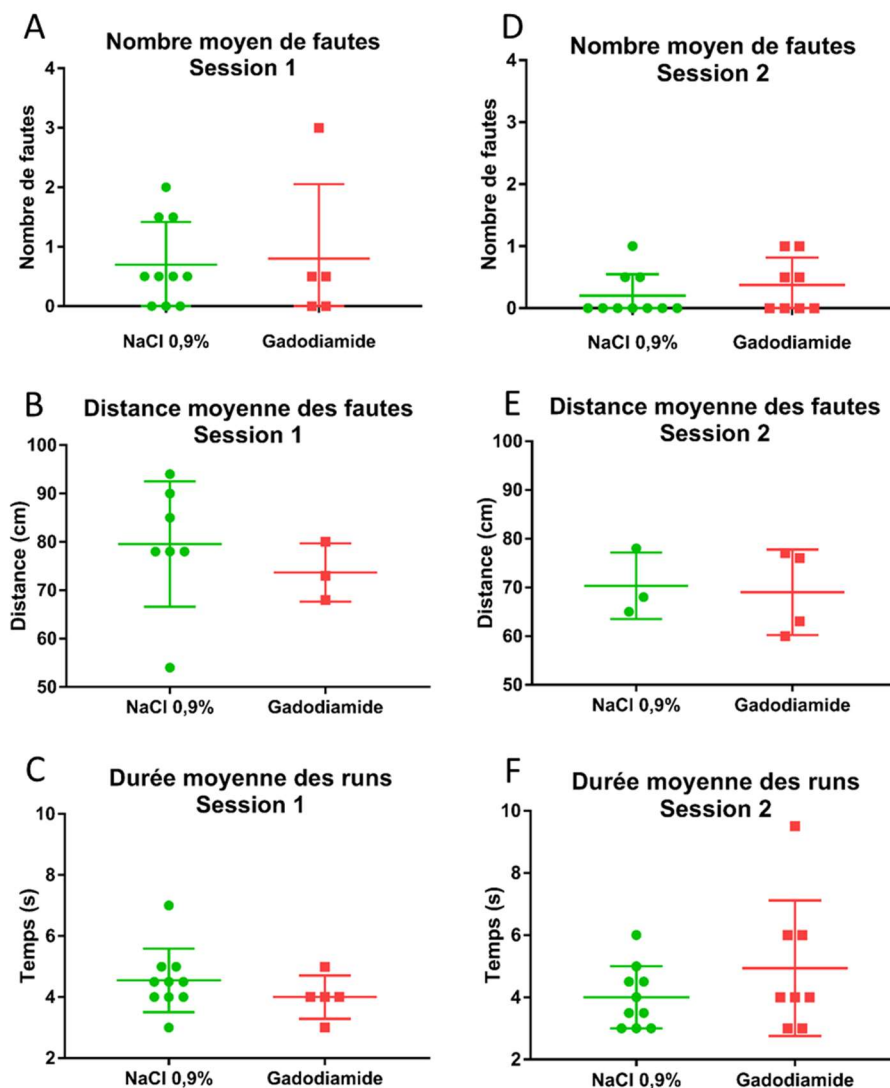


Figure 96: Paramètres mesurés pour les sessions du test du Balance Beam. Les rats parcourent une tige de plus en plus étroite. Les fautes, les distances parcourues sur la tige et le temps mis pour parcourir la tige sont comptabilisés. Seules les traversées effectuées sans pause étant comptabilisées, 10 rats du groupe témoin sont ainsi comparés à 8 ou 5 rats du groupe gadodiamide (les autres rats ayant effectué de traversées incorrectes).

Que ce soit pour la session 1 ou pour la session 2, aucune variation significative du nombre de fautes effectuées, de leur distance ou encore de la durée moyenne des traversées n'a été observée entre les groupes. Il convient de souligner cependant que les traversées pendant lesquelles les rats effectuent un arrêt n'ont pas été comptabilisées, ce qui a réduit le nombre de rats dans le groupe gadodiamide. Pour la session 1, seuls 50% des rats gadodiamide ont effectués des « runs » comptabilisables contre 100% des rats témoins ; tandis que pour la session 2, 80% des rats gadodiamide ont effectués des traversées correctes contre 100% pour le groupe témoins.

Un système de notation (adapté de Metz, 2000) a été adopté afin de rendre compte de cette incapacité de certains rats à parcourir la totalité de la tige de bois. Un score de 2 a été attribué si la traversée est complète ; 1,5 si un arrêt ou demi-tour a été marqué sur la dernière moitié de la traversée ; 1 si la traversée est incomplète mais de plus de la moitié ; 0,5 si moins de la moitié a pu être traversée, et 0 si l'animal n'a pas du tout pu traverser la planche. On a bien observé une difficulté des rats du groupe gadodiamide à parcourir parfaitement la tige. Cependant, les scores des deux groupes ne diffèrent pas au risque  $\alpha$  de 5%.



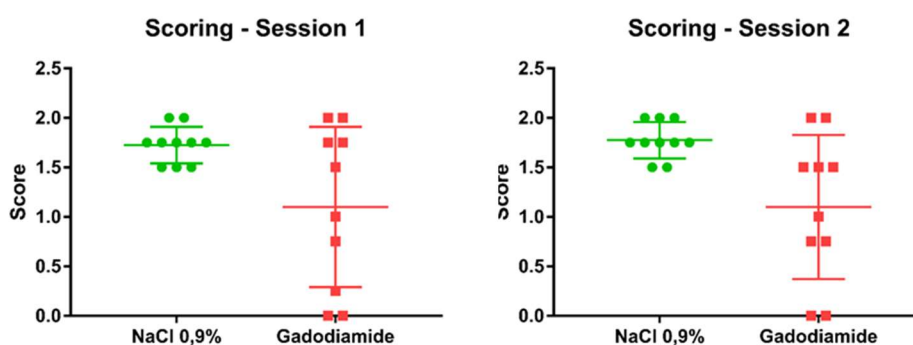


Figure 97 : Score de traversée de la tige surélevée du balance beam. Les valeurs représentent la moyenne du score des deux essais par session.

En conclusion, le test du balance beam a révélé une diminution, chez les rats du groupe gadodiamide, de la capacité de traverser correctement et sans fautes la tige de bois placée en hauteur. Chez les animaux ayant correctement parcouru cette tige, le nombre de fautes a été similaire pour les groupes gadodiamide et témoin. Enfin, l'adoption d'une cotation du comportement des rats sur la tige a montré une plus grande difficulté des rats du groupe gadodiamide à parcourir correctement la tige de bois que les témoins, mais assortie d'une grande variabilité inter-individuelle et sans que cette différence soit significative.

### (ii) Staircase

Le test dit du « staircase » permet d'évaluer des anomalies dans les tâches d'atteinte et de préhension par les pattes antérieures des rongeurs (Montoya, 1991). Pour ce test, les rats ont été entraînés 3 jours à attraper des récompenses sur les marches du dispositif, après avoir été mis à jeun solide la veille à 16h. Le jour du test, les marches les plus lointaines atteintes ont été comptabilisées. La marche 1 est la marche la plus proche du rat, la plus simple à atteindre ; la marche 7 est la plus éloignée, donc la plus difficile à atteindre. Les résultats obtenus, présentés en Figure 98 montrent que quel que soit le côté concerné, il n'y a pas eu de différence significative entre les groupes. Les rats ont atteint en moyenne les mêmes marches, le traitement ne semble donc pas avoir d'influence sur ce paramètre.

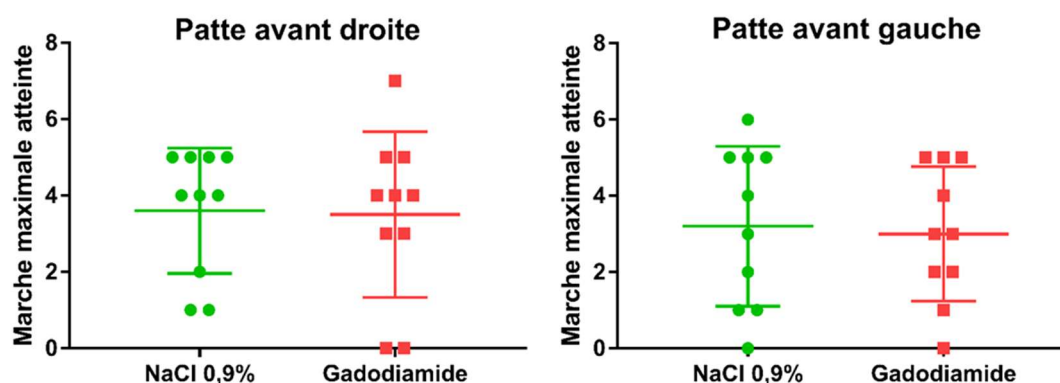


Figure 98 : Marche maximale atteinte par les rats au cours du test du staircase. Les rats ont 5 minutes pour attraper des récompenses disposées sur l'escalier de gauche, puis 5 minutes pour celles placées sur l'escalier de droite. La marche 1 correspond à celle la plus haute, donc la plus proche du rat. La marche 7 correspond à la marche la plus basse donc la plus difficile à atteindre.



En conclusion, le comportement des rats des groupe gadodiamide et témoin n'a pas différé sur le test du « staircase », ce qui suggère l'absence d'effet du gadodiamide sur l'habileté et la préhension par les pattes antérieures chez le Rat.

### (iii) Catwalk

Le test du Catwalk permet une analyse fine de la démarche chez le rongeur. Il a nécessité 2 jours d'entraînement avant le jour du test, pour habituer les animaux à marcher à vitesse constante, et sans arrêt dans le tunnel. L'étude des traces de leur pattes par le logiciel Catwalk® de Noldus a permis d'évaluer plus de 70 paramètres. Seuls 4 seront présentés ici. Toutes les pattes ont été évaluées selon les mêmes critères, mais seule la patte avant droite est présentée.

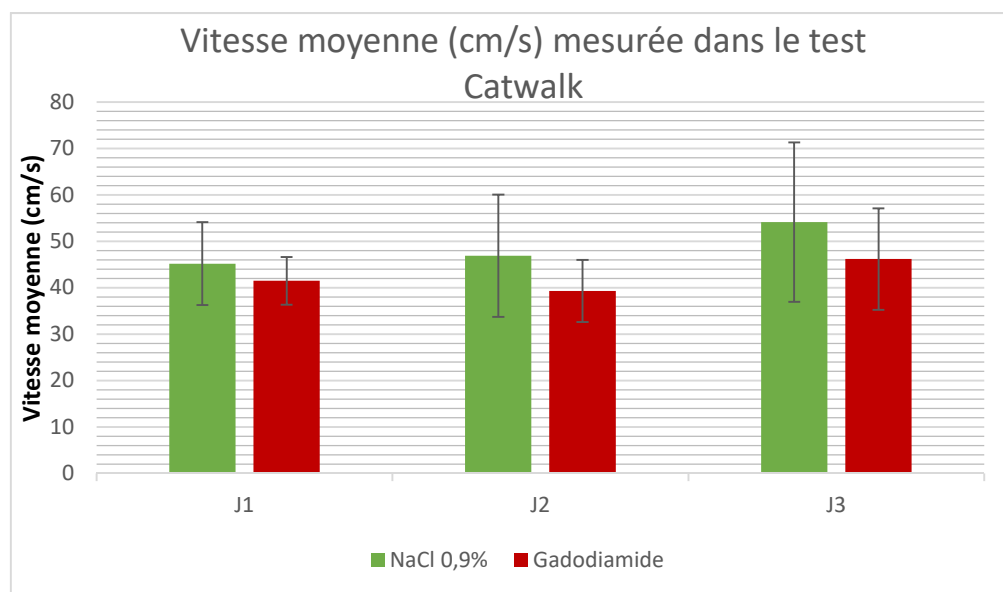


Figure 99: Vitesse moyenne des traversées pendant le test du Catwalk. Durant les 3 jours (2 jours d'entraînement et test à J3), la vitesse est calculée par le logiciel Catwalk® (Noldus).

La vitesse des rats du groupe gadodiamide a été légèrement plus faible que celle des rats témoins, quel que soit le jour (lors des entraînements ou pendant le test) (Figure 99). La vitesse des rats étant corrélée à de nombreux paramètres, il a été décidé d'en étudier certains sur des traversées de vitesse homogène, pour s'affranchir de l'effet de la vitesse (pour les paramètres corrélés avec celle-ci). Cela a été le cas pour le « Stand » (la durée de contact entre la patte et la vitre d'enregistrement) ou le « Swing Mean » (la durée de « non contact » entre la patte et la vitre) (Figure 100). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes : les durées de contact ou de non contact de la patte avant droite avec la vitre ont été identiques. Il en va de même pour les autres pattes (données non présentées). Globalement, les paramètres mesurés (« swing speed » ou vitesse du rat lorsque la patte est posée sur la vitre, « step cycle » ou fréquence à laquelle la patte est posée ...) et étudiés à vitesse homogène n'ont montré aucune différence significative entre les groupes.





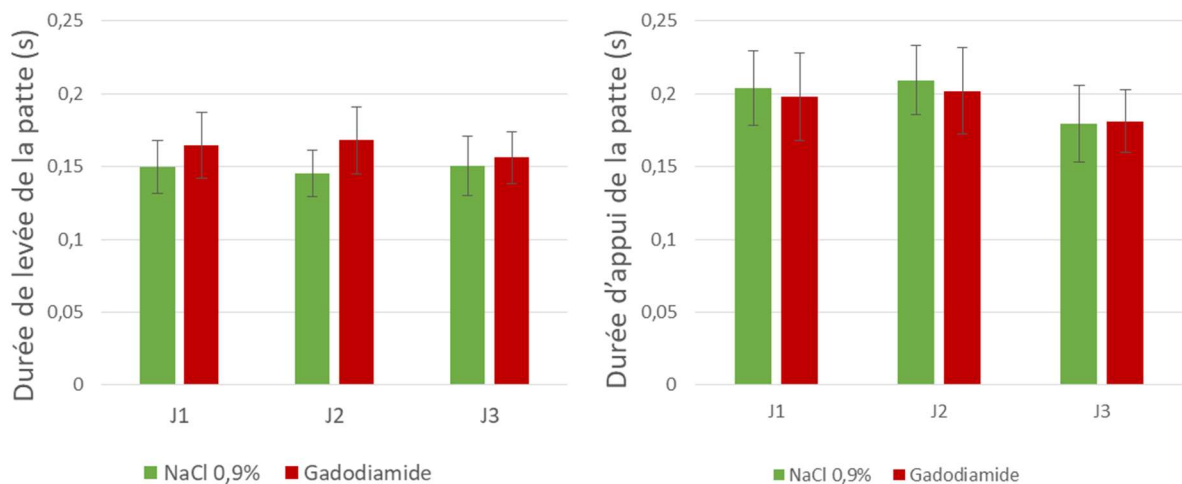


Figure 100 : Paramètres mesurés à vitesse homogène pour le test du Catwalk. Durant les 3 jours (2 jours d'entraînement et test à J3), le temps de contact (appui) ou de non contact (levée) des pattes avant droites avec la vitre d'enregistrement est calculé au moyen du logiciel Catwalk® (Noldus).

Pour certains autres paramètres, nous avons choisi d'étudier des traversées de configuration identique, cet enchaînement pouvant interférer sur certains paramètres de la marche. La configuration correspond à un enchaînement particulier des 4 pattes au cours de la marche. Pour les deux groupes, la configuration dite « AB » (dans l'ordre : patte avant gauche – patte arrière droite – patte avant droite – patte arrière gauche) a largement dominé (Figure 101), aussi seuls les traversées dont 100% des enchaînements de pattes correspondant à cette configuration « AB » ont été sélectionnés. Parmi les paramètres étudiés apparaissent le « PrintLength Mean » (ou longueur moyenne de l'empreinte de la patte) et le « PrintWidth Mean » (ou largeur moyenne de l'empreinte de la patte), présentés en Figure 102. Là encore, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes, ce qui est également le cas des autres paramètres non présentés.

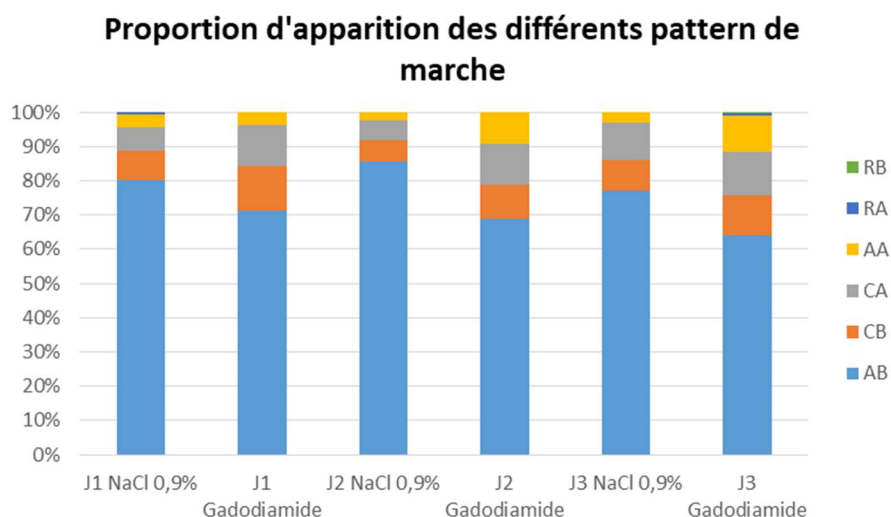


Figure 101 : Proportion des différentes configurations (« patterns », enchaînement des pattes) de marches utilisées par les rats. Durant les 3 jours (2 jours d'entraînement et test à J3), les configurations de marches ont été identifiées et leur fréquence d'apparition calculée.



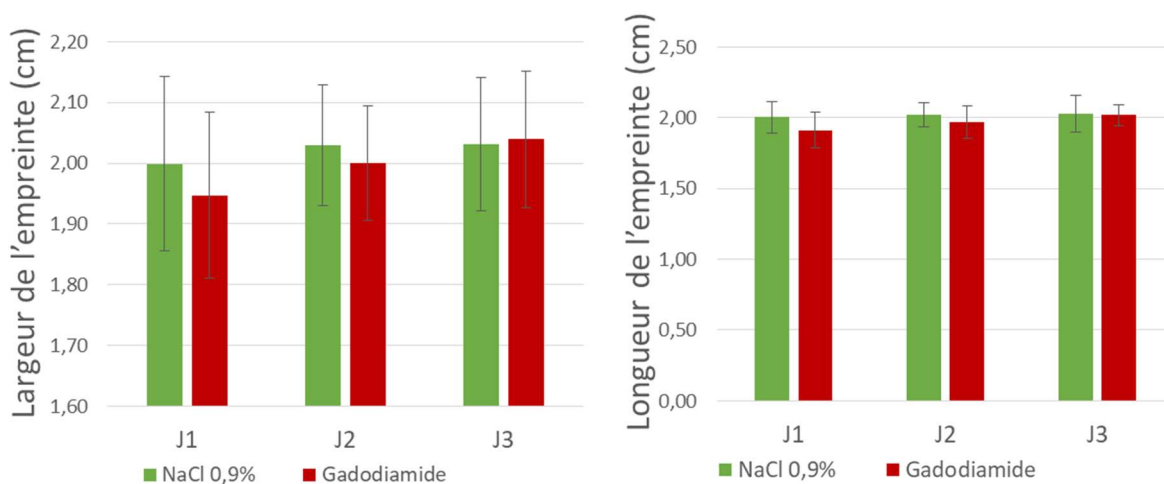


Figure 102 : Paramètres mesurés à configuration identiques dans le test du Catwalk, pour la patte avant droite. Durant les 3 jours (2 jours d'entraînement et test à J3), la longueur ou la largeur des empreintes de pattes ont été calculées au moyen du logiciel Catwalk® (Noldus).

En conclusion, aucune anomalie de la démarche des rats du groupe gadodiamide n'a été détectée au moyen du test du Catwalk.

### B. Spectroscopie RMN

En ce qui concerne la spectroscopie RMN réalisée au niveau des DCN, une première analyse visuelle a été effectuée par groupe. Les 10 spectres individuels acquis dans chaque groupe ont été sommés afin d'obtenir un spectre moyen représentatif. L'inspection visuelle de ces données n'a laissé apparaître aucune variation franche du signal, indiquant que les concentrations de métabolites semblent être similaires pour les deux groupes étudiés (Figure 103).

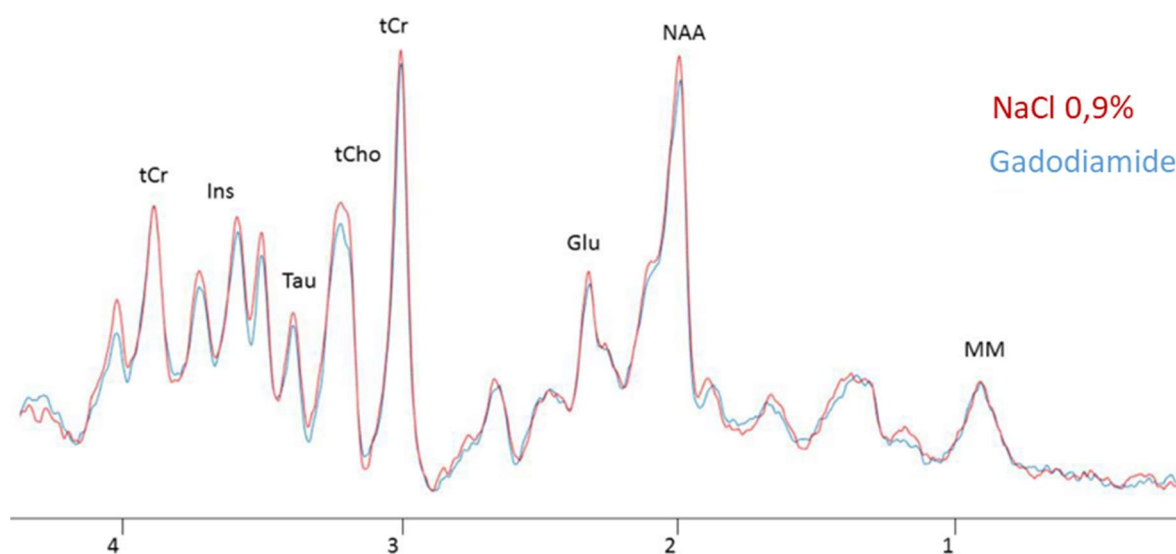


Figure 103 : Spectres moyens (sommés sur les 10 animaux de chaque groupe) obtenus pour chaque groupe. Les principaux métabolites quantifiables sont indiqués (NAA : N-acétylaspartate ; Glu : glutamate ; tCr : créatine totale ; tCho : composés choline ; Tau = taurine ; Ins = myo-inositol ; MM = macromolécules). Aucune variation franche du signal, dépendante du traitement, n'a été observée.



Les spectres individuels ont été quantifiés avec le logiciel LCMoDel® par 4 types de quantification du signal :

- quantification « absolue », sans normalisation.
- quantification normalisée par rapport au signal de l'eau mesuré dans le même voxel
- quantification par rapport au signal de la créatine totale tCr
- quantification par rapport au signal des macromolécules MM (en Figure 103) (qui sont vraisemblablement un bon marqueur de la quantité de cellules dans le voxel).

Les spectres moyens de macromolécules (sur les 10 animaux de chaque groupe) ont également été similaires et ont donc été sommés (moyenne des 20 animaux), afin d'obtenir un spectre de macromolécules composites avec le rapport signal-sur-bruit le plus élevé. Ce spectre moyen a été utilisé ce spectre pour l'analyse comparative des deux groupes dans le cas de la quantification par rapport au signal des macromolécules.

Finalement, l'analyse quantitative confirme l'impression visuelle, aucune variation significative n'étant observée pour tous les métabolites étudiés. Seul le signal absolu de l'eau baisse significativement (d'environ 10%) dans le groupe gadodiamide. Les graphes sont présentés Figure 104.

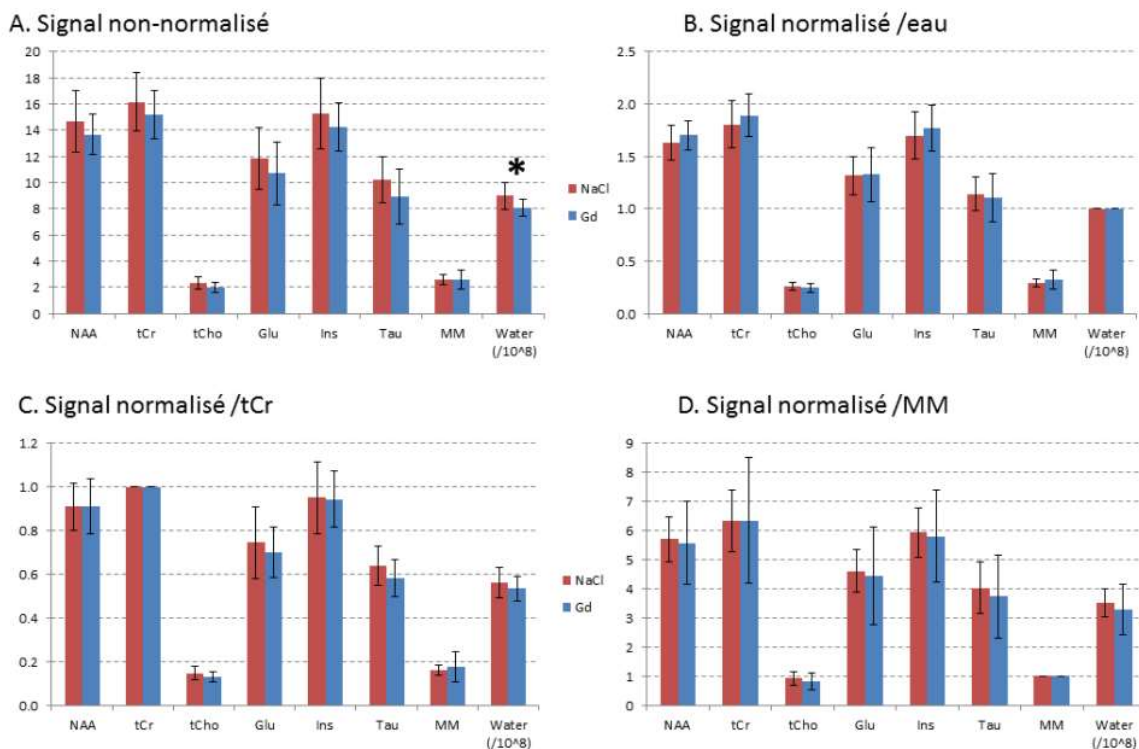


Figure 104 : Signaux des spectres moyens obtenus par spectroscopie RMN au niveau des DCN (NaCl 0,9% en rouge, gadodiamide en bleu).

### C. Microdialyse et dosage de marqueurs de toxicité

#### a) Dosages dans le dialysat

Des marqueurs de souffrance cellulaire, classiquement dosés suite à une microdialyse cérébrale, ont été dosés dans les dialysats issus de la microdialyse des noyaux cérébelleux profonds. Une moyenne



des concentrations obtenues dans les trois derniers collectes est présentée (Figure 105). La variabilité des dosages dans le groupe témoin était importante, mais une différence significative a cependant été observée dans le cas du glucose, du lactate et du pyruvate ( $p < 0,05$ ). Cependant, un certain nombre de valeurs pour le glucose ont été extrapolées.

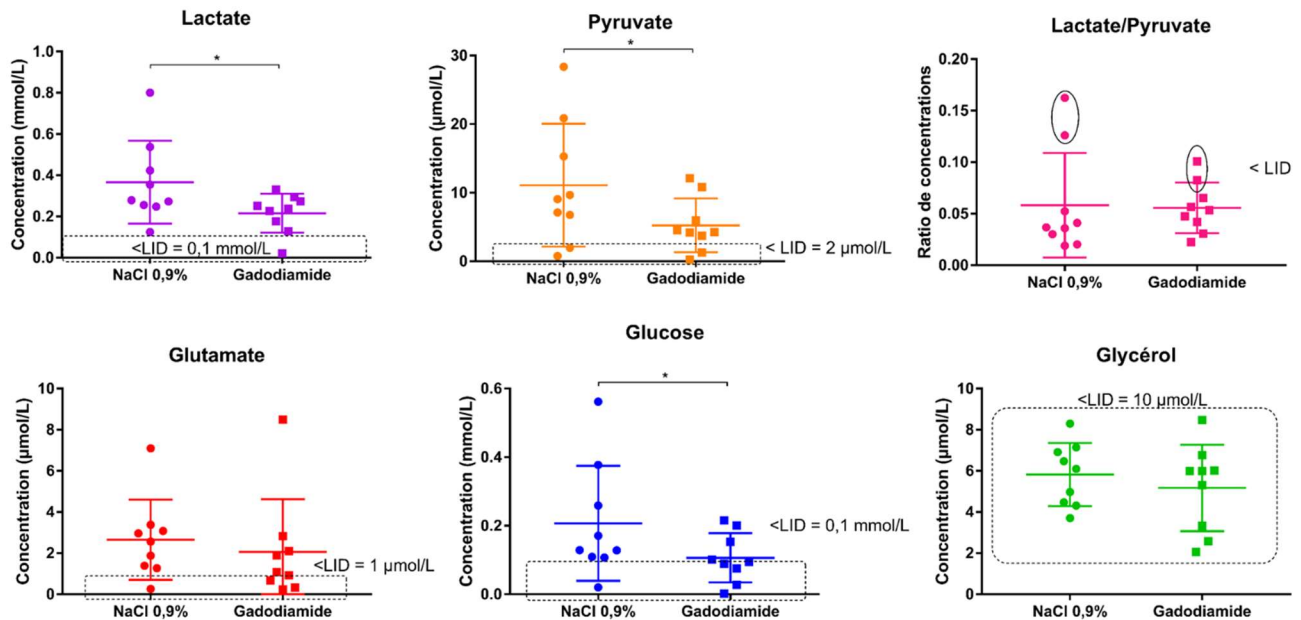


Figure 105 : Moyenne des dosages réalisés dans les 3 derniers dialysat de microdialyse. LID : limite inférieure de détection ; les valeurs dans la zone pointillée sont donc extrapolées. Les valeurs sont en mmol/L (glucose, lactate) ou en  $\mu\text{mol/L}$ . Lactate/pyruvate ; sont entourées les points dont au moins l'une des deux valeurs étaient < LID. L'analyse statistique a inclus toutes les valeurs, y compris celles inférieures à la LID et donc extrapolées.

#### b) Concentrations plasmatiques d'UCHL-1 et de GABA

Alors que le dosage en ELISA d'UCHL-1 a été réalisé sur du plasma pur, il s'est avéré inférieur à la limite de détection (0,25 ng/mL). Il en va de même pour le GABA, ce qui, dans ce dernier cas, est certainement dû à une dilution trop importante. Aucune interprétation de ces données n'a donc pu être faite.

### D. Histologie

La coloration conventionnelle des DCN n'a pas révélé d'anomalies particulières. La présence de neurones en dégénérescence (sombres) a été observée pour les deux groupes, mais ces neurones étaient peu fréquents, et cette dégénérescence peut être non-spécifique et survenir lors de l'exanguino-perfusion.

Le marquage des cellules gliales (GFAP) n'a révélé aucune hypertrophie, anomalie de densité ou de morphologie des astrocytes par rapport aux témoins.

Le marqueur CD68 a permis la détection de rares cellules microgliales actives, en localisation périvasculaire, mais jamais dans le parenchyme neuronal. Aucune différence n'a été notée entre les deux groupes.

La coloration PAS (« Periodic Acid Schiff ») a révélé la présence de pigments de lipofuscine dans la plupart des échantillons, avec une densité hétérogène selon les cellules. Une meilleure détection a été obtenue avec l'utilisation de TRITC (tétraméthylrhodamine-isothiocyanate), avec laquelle les pigments apparaissent sous forme de granules fluorescents dans le cytoplasme de neurones et cellules gliales en rose



(Figure 106). Les deux groupes étudiés n'ont pas différencié pas en ce qui concerne la présence de pigments de lipofuscine.

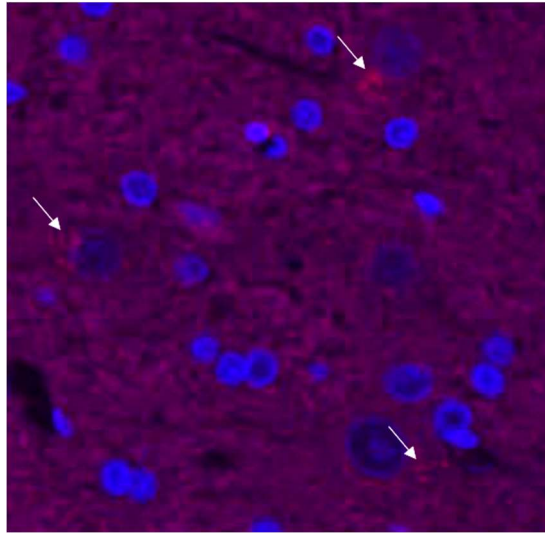


Figure 106 : Détection en fluorescence des pigments de lipofuscine colorés par le TRITC (rose) dans les noyaux cérébelleux profonds. Les noyaux cellulaires apparaissent en bleu (DAPI).



#### 4. Conclusions

Cette étude a consisté en l'évaluation de la tolérance neurologique d'injection de fortes doses de gadodiamide (20 administrations de 3 fois la dose clinique), en comparaison avec un groupe témoin ayant reçu du sérum physiologique.

Au niveau comportemental, une baisse de l'activité a été mesurée sur plusieurs tests pour le groupe gadodiamide, consistant en une diminution des déplacements et une augmentation des durées d'immobilité. Ceci a été observé en journée mais également lors du comportement naturel des rats la nuit (période d'activité principale). Ces périodes d'immobilité mériteraient une investigation particulière. Cela ne semble pas relever de la motricité, puisque la vitesse de déplacement des rats dans une zone anxiogène n'est pas inférieure à celle des témoins.

Cette hypoactivité s'est accompagnée de signes d'anxiété sur les derniers mois (2<sup>e</sup> session des tests), alors que cela n'avait pas été observé auparavant. Une moindre coopération à certains tests a également été notée.

Aucun trouble de la mémoire ou de la coordination motrice n'a été mis en évidence.

Aucune anomalie n'a été trouvée à l'examen histologique et par l'analyse des métabolites cérébraux par spectroscopie RMN.

Le dosage de marqueurs du métabolisme cellulaire et de la glycolyse, dans des dialysats de microdialyse cérébelleuse suggère une légère diminution, mais la variabilité des concentrations et le faible échantillonnage ne permettent pas de conclure avec certitude.



## D. ETUDE 2: gadodiamide vs gadotérate vs sérum physiologique, 50 mmolGd/kg

### 1. Introduction

Quelques effets ayant été observés dans l'étude de neurotoxicité préliminaire précédente, nous avons souhaité poursuivre cette investigation.

Afin de potentialiser encore plus les effets, les doses de gadodiamide ont été choisies à 5 fois la dose clinique (après correction de la surface corporelle de l'espèce), soit une dose cumulée de 50 mmolGd/kg (contre 36 mmolGd/kg dans l'étude précédente). L'étude du comportement d'un groupe ayant reçu des administrations d'un agent macrocyclique nous est également apparue essentielle. L'étude compare ainsi le gadotérate au gadodiamide.

La neurotoxicité a été approchée par une étude neurocomportementale légèrement modifiée par rapport à la précédente. Afin d'approfondir un possible effet anxiogène de l'administration de chélates de Gd, il a été décidé de travailler en lumière blanche et non plus rouge pour tenir compte de l'aversion des rongeurs pour les zones illuminées (Campos, 2013). De plus, nous souhaitions éviter tout biais induit par la perturbation du cycle circadien des animaux par ce changement de luminosité ponctuel. L'expérience nous ayant montré l'importance de la validation des tests, même ceux largement décrits dans la littérature, nous avons tenté d'améliorer ce point, ainsi que l'entraînement des animaux sur les tests, afin de ne pas nous limiter à l'étude de leur simple participation au test, trop peu pertinent pour pouvoir conclure (exemple du balance beam). Certains tests ont été ôtés, d'autres rajoutés, afin d'approfondir l'étude de la coordination motrice et du volet sensoriel. En effet, la haute concentration de Gd total mesurée dans les bulbes olfactifs avec le gadodiamide nous a amenés à étudier les effets des chélates de Gd sur l'olfaction des animaux. De plus, le lanthane présente des propriétés analgésiantes, plus puissantes que la morphine sur une base molaire (Evans 1990). Nous avons donc ajouté un test pour évaluer le seuil de sensibilité des rats.

Afin d'écarter la piste inflammation pour expliquer une baisse de l'activité ou de la motricité, des dosages de marqueurs circulants de l'inflammation ont été réalisés. Des marqueurs circulants du stress, l'aldostérone et corticostérone (Gomez-Sánchez, 1991 ; Varga, 2013 ; Joëls, 2017) ont été dosées. Le dosage de GABA et d'UCL1 a été réitéré, mais cette fois sur des broyats tissulaires (cortex cérébelleux), plus spécifiques et permettant a priori une meilleure détectabilité par l'ELISA par rapport au plasma. Un examen histologique a de nouveau été réalisé, incluant un examen histomorphométrique, et l'étude immunohistochimique des deux isoformes de la GAD, l'enzyme de synthèse du GABA.



## 2. Méthodes

La présente étude a été réalisée sur 30 rates Sprague-Dawley âgées de 6 semaines et pesant entre 190 et 240 g à leur arrivée au laboratoire. Les animaux ont été randomisés et l'étude a été réalisée en aveugle dans son intégralité.

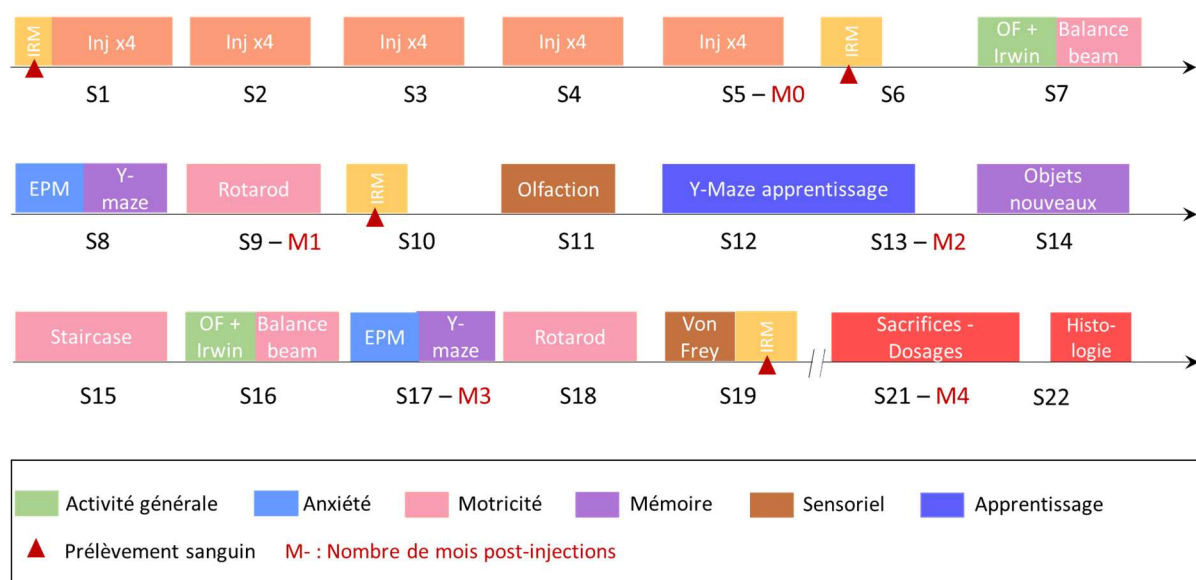


Figure 107 : Chronologie de l'étude in vivo

### A. Injections

Les injections intraveineuses de produits ont été réalisées pendant 5 semaines, et la dose de produit injectée ici était de 2,5 mmolGd/kg, soit 50 mmolGd/kg cumulés.

### B. Suivi d'un potentiel rehaussement du signal T1 par IRM, et prélèvements sanguins

Le suivi par IRM permettant d'observer la prise de contraste au niveau cérébral a été réalisé au moyen de la séquence FLASH uniquement (présenté en Partie II). Les prélèvements sanguins concomitants à l'imagerie ont permis le dosage des corticoïdes circulants (aldostérone et corticostérone) et des marqueurs de l'inflammation (décrits plus loin).

### C. Étude comportementale

Différents tests comportementaux ont été menés chez les animaux afin d'évaluer la motricité, l'anxiété, la mémoire, l'apprentissage ou encore leurs capacités sensorielles (sensitive et olfactive). La liste des tests choisis pour cette étude est présentée en Tableau 18. L'étude comportementale s'est toujours déroulée durant les après-midis, avec une lumière blanche atténuée par rapport à celle des salles d'hébergement (350 lux). Il est important que tous les tests soient réalisés au même moment de la journée pour éviter les biais liés au cycle circadien.



Tableau 18 : Tests comportementaux réalisés

Comportement	Test sélectionné
Comportement général	Irwin Openfield
Coordination Motrice	Balance Beam Staircase Rotarod
Anxiété	Openfield Labyrinthe en croix surélevée
Mémoire	Labyrinthe en Y Reconnaissance de nouveaux objets
Apprentissage	Protocole d'apprentissage dans le Labyrinthe en Y
Test sensoriel	Sensibilité : Von Frey Olfaction : Pellet caché

Avant de commencer l'étude, les protocoles des tests comportementaux ont été validés sur des rats d'entraînement. Cette validation préalable a permis d'ajuster les délais de succession des passages intra-essais, la durée de l'apprentissage ou encore la luminosité. En effet pour certains tests, la luminosité, anxiogène, joue un rôle important.

#### D. Euthanasie

Le groupe de rats destinés à l'étude histologique a été euthanasié par exsanguino-perfusion cardiaque afin de réaliser une analyse histologique (laboratoire Atlantic Bone Screen, à Saint Herblain).

#### E. Dosages de marqueurs de toxicité, de stress et de l'inflammation

Les marqueurs de toxicité, de stress et de l'inflammation apparaissent dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Récapitulatif des différents marqueurs recherchés à l'issue de l'étude

Marqueur	Fluide dosé	Intérêt	Méthodes de dosages
<b>GABA</b>	Lysat de cortex cérébelleux	Neurotransmetteur inhibiteur des voies cérébelleuses (notamment)	ELISA (Immuno-enzymatique)
<b>UCHL-1</b>	Lysat de cortex cérébelleux	Biomarqueurs indiquant un dommage cellulaire de neurones	ELISA
<b>Corticostérone</b>	Sérum	Hormone de stress (glucocorticoïde)	RIA (méthode radio-immunologique)
<b>Aldostérone</b>	Sérum	Hormone de stress (minéralocorticoïde)	RIA
<b>Créatine kinase</b>	Sérum	Marqueur de l'inflammation	Dosage colorimétrique
<b>Protéine C réactive</b>	Sérum	Marqueur de l'inflammation	Luminex (méthode immuno-enzymatique)



## *F. Histologie*

Une coloration par l'HES (Hématoxyline Eosine Safran) a été réalisée, permettant de visualiser la morphologie générale des tissus et des cellules, et une analyse histomorphométrique (selon Garman 2016). Le marquage de l'enzyme de synthèse du GABA : la glutamate décarboxylase (GAD) (ses deux isoformes : GAD 65 et 67), a également été effectué.





### 3. Résultats

Au cours des semaines d'injections, le poil des rats du groupe gadodiamide s'est terni, a jauni et est devenu hirsute. A l'issue de la période d'injections, les rats du groupe gadodiamide ont aussi présenté de l'alopecie, des poils en « paquets » et certains des croutes rouges sur la peau. Aucun signe pathologique n'a été relevé chez les rats des groupes témoin et gadotérate. Aucune mortalité n'a été relevée au cours de l'étude.

#### A. Comportement

##### a) Général

###### (i) Test d'Irwin modifié

Lors de la session 1 (semaine 7), l'observation des rats dans leur environnement n'a montré aucun élément suspect. Les 3 groupes présentaient le même comportement. Les interactions sociales, les réponses aux stimuli sensoriels (claquement de doigt, pincement de la patte) ou l'agitation étaient identiques. Sur le test des barres parallèles, aucune différence n'a été observée. Les rats plaçaient tous rapidement les 2 pattes sur la barre supérieure et se maintenaient 90 secondes, se déplaçant plus ou moins sur la longueur de la barre.

Lors de la session 2 (semaine 16), on a observé une légère différence dans le comportement des rats traités par le gadodiamide. En effet, certains d'entre eux semblaient plus craintifs et restaient au fond de la cage (4 rats/10). Lors de stimuli sensoriels, 3 rats sur 10 dans les groupes traités par le gadotérate et par le gadodiamide ont présenté un délai avant la réaction lors du pincement de la patte, semblant ainsi être moins sensibles. Pour complexifier l'exercice des barres, lors de la session 2, le test des barres a été réalisé avec une seule barre. Une cotation de réussite (Deacon, 2013) (détaillée ci-dessous) a alors été appliquée (Figure 108).

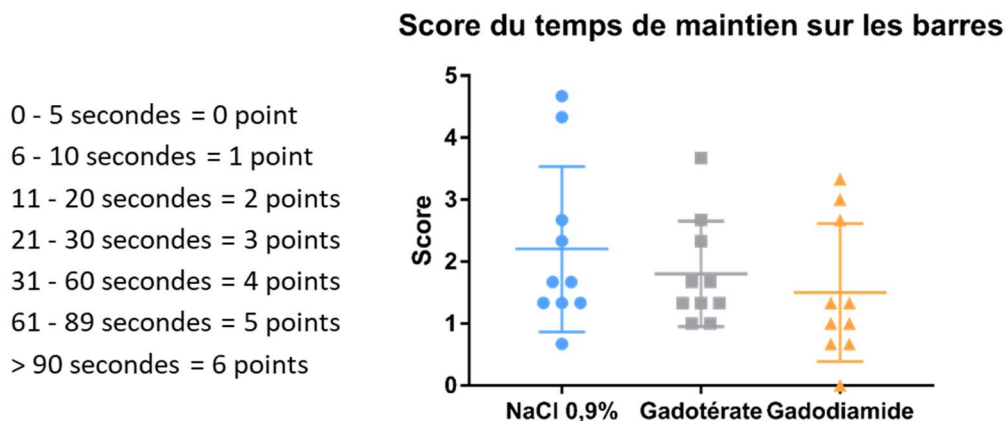


Figure 108 : Cotation et résultats de la session 2 du test des barres inclus dans le test d'Irwin modifié.

Les rats du groupe gadodiamide (score de  $1,5 \pm 1,1$ ) se sont maintenus en moyenne moins longtemps sur la barre que les rats témoins (score de  $2,2 \pm 1,3$ ) et ceux du groupe gadotérate (score de  $1,8 \pm 0,9$ ) mais de façon non significative.

###### (ii) Openfield - activité

On a noté, en session 1, une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les groupes témoin et gadodiamide pour le nombre d'entrées dans la partie périphérique ainsi qu'au centre, donc sur le nombre total de visites (Figure 109 A). La même tendance a été observée pour le groupe gadotérate (mais ns vs. les rats témoins), ainsi que pour la session 2. La durée d'immobilité a été plus élevée, également, pour les deux agents



de contraste (mais ns vs. les témoins). Les rats traités par le gadodiamide et le gadotérate ont moins exploré l'openfield de façon générale et, là encore, une baisse modérée de l'activité a été retrouvée.

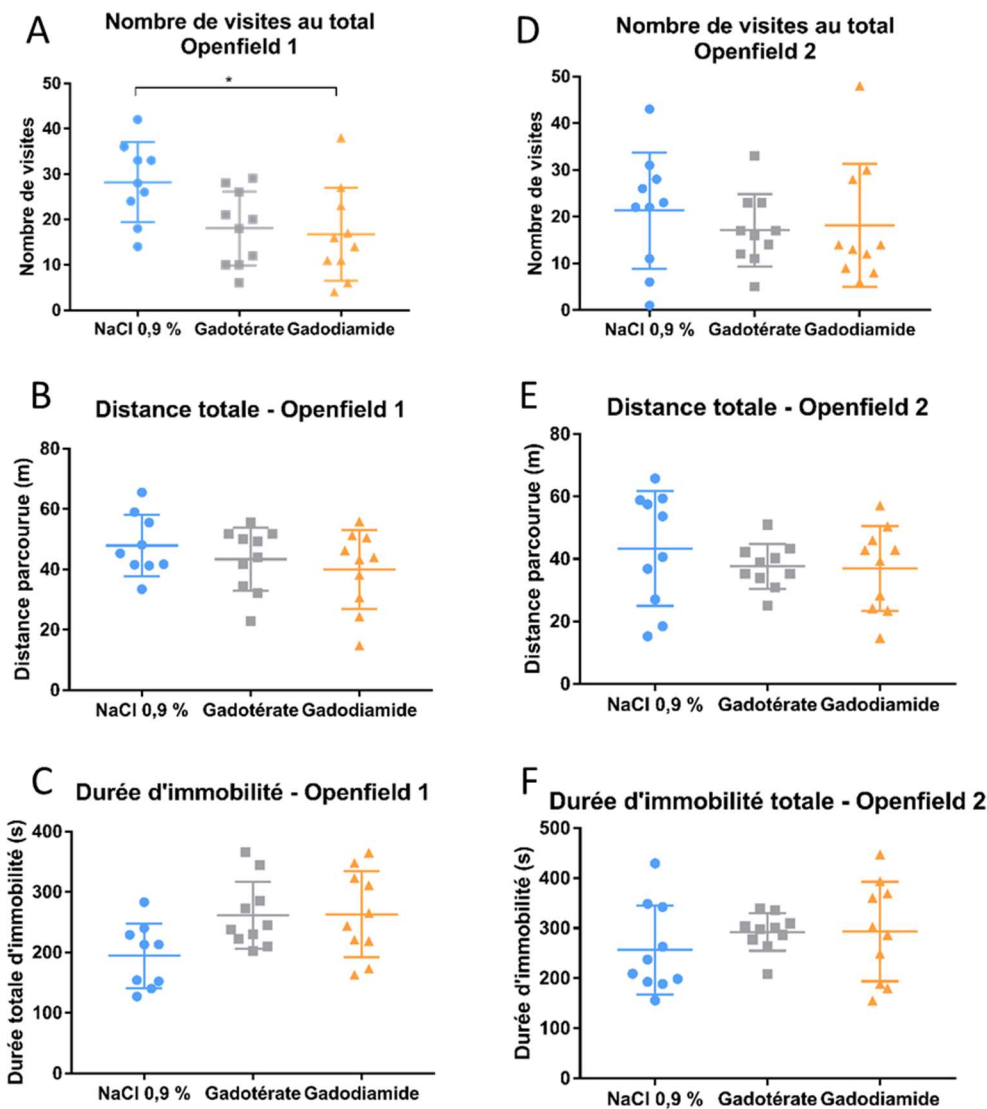


Figure 109 : Test de l'openfield. Représentation de l'activité des rats selon les groupes et les sessions (Openfield 1 : semaine 7 ; Openfield 2 : semaine 16), à travers le nombre de visites des zones (transitions centre/périphérie) (A, D), la distance totale parcourue (B, E), et la durée d'immobilité totale (C, F), sur les 10 minutes d'exploration. Du fait d'un enregistrement vidéo défectueux, l'effectif du groupe NaCl 0,9% lors de la session 1 est de n=9 rats.

En conclusion, nous avons observé une diminution modérée de l'activité des rats traités par les chélates de Gd sur le test de l'openfield.

## b) Test d'anxiété

### (i) Openfield

Comme vu précédemment, le test de l'openfield permet d'évaluer l'anxiété de l'animal. Pour cela, il faut corriger les paramètres en tenant compte de la baisse d'exploration ou d'activité observée.

Concernant le comportement des rats témoins, on a la confirmation que la zone centrale de l'openfield est anxiogène, puisqu'ils l'ont explorée nettement moins (un peu plus de 20% de la distance totale parcourue) que la zone périphérique. Cet effet a semblé être légèrement amplifié lors de la deuxième session.



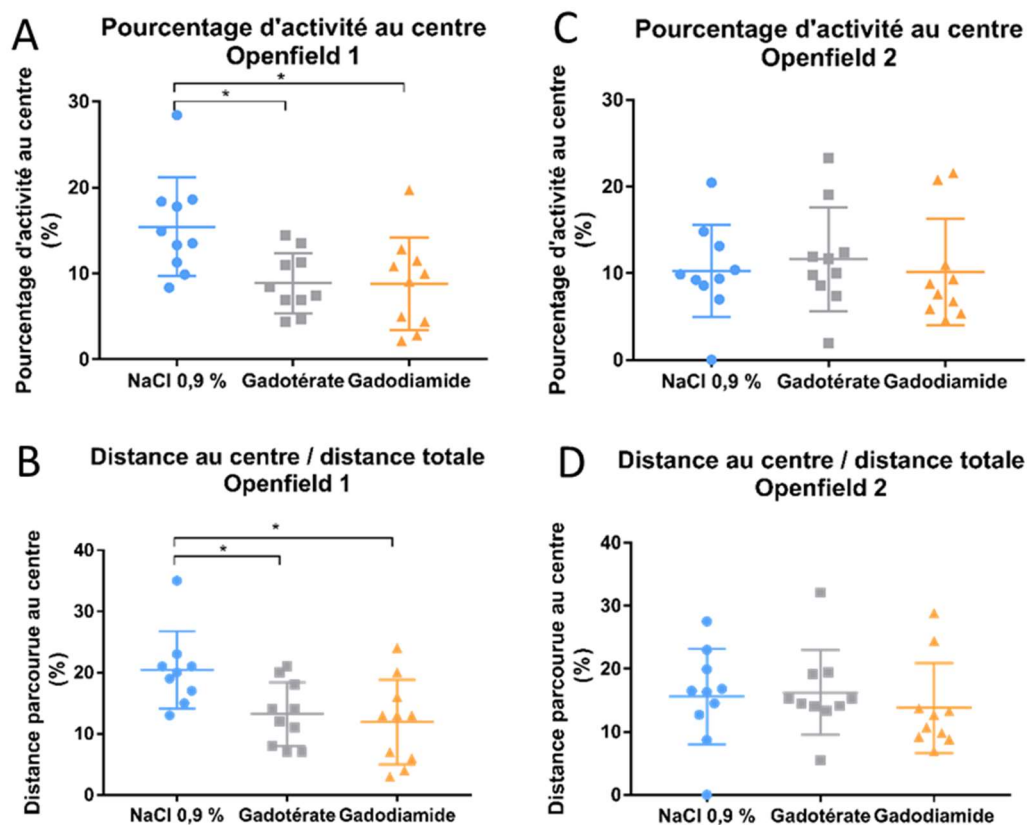


Figure 110 : Test de l'openfield. Etude du caractère anxieux des rats aux deux sessions (semaine 7 et semaine 16), à travers le pourcentage d'activité au centre (A, C), et le rapport de distance parcourue au centre sur la distance totale parcourue (B, D).

La durée d'activité au centre (temps passé au centre de l'openfield dont on ôte le temps d'immobilité), sur le temps d'activité total (Figure 110 A), a été significativement diminuée pour les groupes gadodiamide et gadotérate ( $p < 0,05$ ), en session 1. Le pourcentage de distance parcourue au centre a également été plus faible pour ces groupes en comparaison avec les témoins ( $p < 0,05$ ). Ces observations, qui indiquent un effet anxieux des groupes traités, n'ont cependant pas été renouvelées à la session 2. En effet, alors que le comportement de ces rats était relativement identique à celui qu'ils avaient présenté en session 1, ce sont les rats témoins qui se sont alors comportés différemment, en étant apparemment plus anxieux que dans la session 1 (activité au centre :  $10,3 \pm 5,3$  % vs  $15,4 \pm 5,8$  % en session 1). L'effet observé en session 1 a alors été effacé.

En conclusion, on observe une diminution du pourcentage d'activité au centre lors de la session 1 pour les deux chélates de Gd, compatible avec une diminution du seuil d'anxiété. Cet effet n'a pas été retrouvé lors de la deuxième session.

#### (ii) Labyrinthe en croix surélevée

Le test du labyrinthe en croix surélevée a été réalisé 2 fois (sessions EPM1 et EPM2) avec un délai de 9 semaines entre les 2 sessions. Ce test permet d'évaluer l'anxiété de l'animal, en étudiant leurs visites dans les deux bras sans parois qui représentent une zone anxiogène.



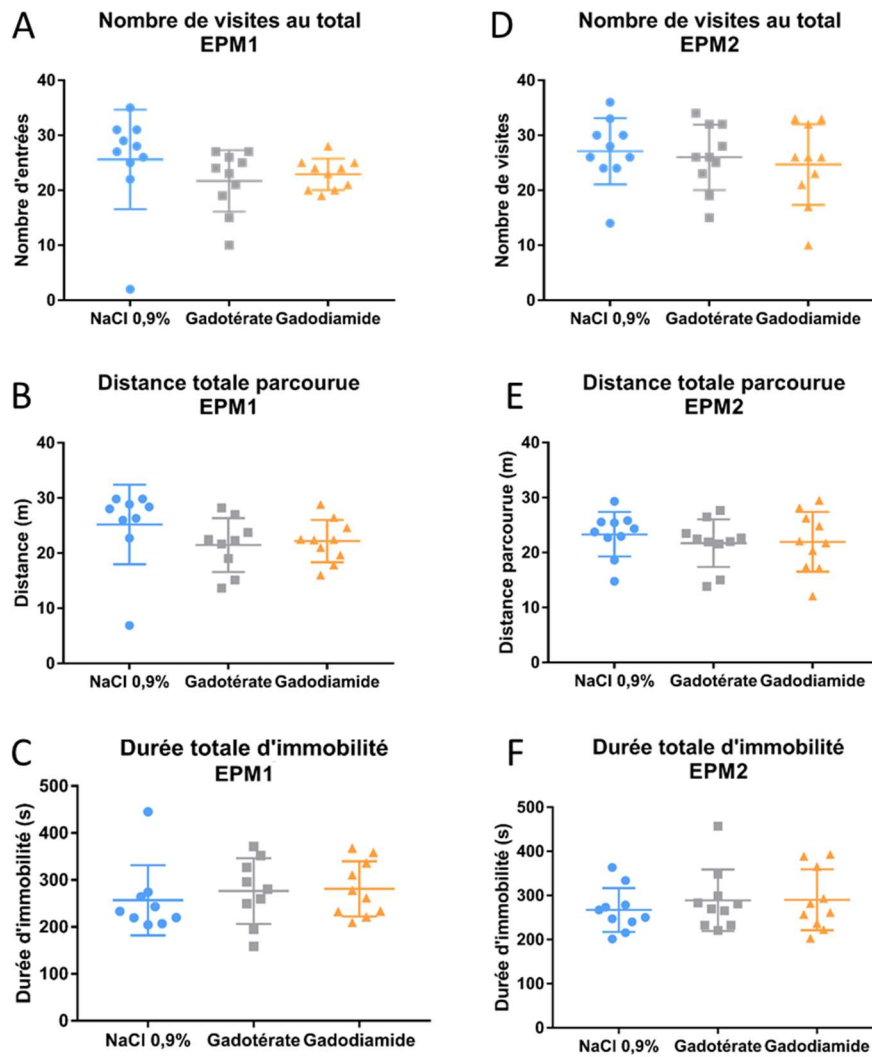


Figure 111 : Test du labyrinthe en crois surélevée. Nombre de visites au total, distance parcourue et durée totale d'immobilité, reflétant l'exploration et donc l'activité des rats sur les sessions EPM1 et EPM2 (semaines 8 et 17).

Lors de la session 1, les 2 groupes ayant reçu les agents de contraste ont moins visité le labyrinthe, ont parcouru une distance légèrement plus faible et sont restés un peu plus immobiles (Figure 111 A, B, C). Cependant, ces paramètres ne diffèrent pas du groupe témoin au risque  $\alpha = 5\%$ . Nous tiendrons tout de même compte de cette « tendance » dans l'analyse du caractère anxieux. Il faut souligner que, lors de la session 2, cet effet de baisse de l'activité n'a pas été retrouvé.



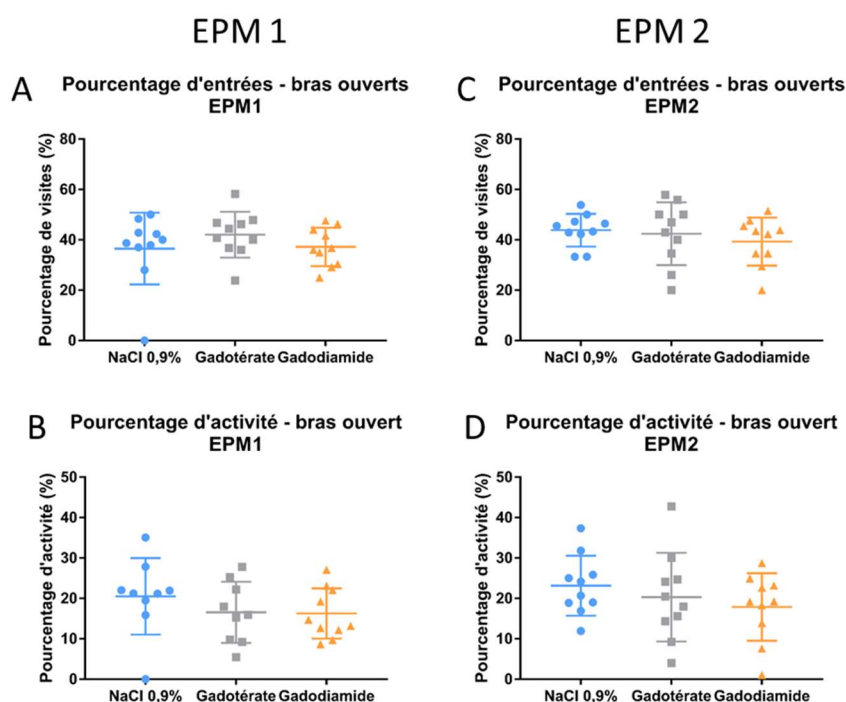


Figure 112 : Test du labyrinthe en croix surélevée. Pourcentage de visites et d'activité dans la zone anxiogène, au sein des deux sessions.

Si l'on étudie le comportement des rats témoins sur ce modèle, nous notons une activité plus faible dans les bras anxiogènes (environ 20% en moyenne) (Figure 112 B et D), ce qui valide le test. Le pourcentage d'exploration de la zone a semblé un peu élevé, mais est cohérent avec la littérature (Garcia, 2005). Le fait de travailler en lumière blanche n'a pas rendu le test beaucoup plus anxiogène par rapport à la première étude.

Le pourcentage d'entrées dans les bras ouverts des deux groupes traités n'a pas été significativement différent de celui du groupe témoin. Cependant, le pourcentage d'activité dans cette zone montre une légère tendance à la baisse pour les groupes gadotérate et gadodiamide (Figure 112 B et D).

En conclusion, aucun effet significatif n'a été mesuré en ce qui concerne les visites et l'activité dans les bras ouverts de l'EPM, test qui documente les modifications du seuil d'anxiété.

### c) Tests de coordination motrice

#### (i) Balance Beam

Durant la traversée de la tige étroite du système de balance beam, les glissements de pattes (erreurs) et leur emplacement ont été analysés. Puisque, lors de l'étude précédente, un grand nombre de rats du groupe gadodiamide n'avaient pas traversé la planche, une « intensification » de l'habituation a été réalisée ici. Pour cela, les rats ont pu traverser la tige qui avait d'abord été placée sur un support près du sol, avant qu'elle ne soit retirée des supports et élevée progressivement. Ainsi, la plupart des rats ont réussi à traverser, nous permettant de mieux évaluer leur coordination motrice. Cependant, comme les arrêts au milieu de la planche facilitent la suite de la traversée, seuls les rats ayant réalisé des passages sans arrêts ont été pris en compte, ce qui a tout de même réduit le nombre d'individus retenus par groupe.

Durant la session 1 et la session 2 (semaines 7 et 16), aucune différence majeure n'a été observée en ce qui concerne le nombre de glissements des pattes, ni leur distance sur la tige (Figure 113). Lors de l'avancée sur la tige (distances d'erreurs plus élevées), celle-ci se rétrécit progressivement et l'exercice se





complexifie. L'écart-type très élevé et le faible nombre de sujets pris en compte ne permettent pas de tirer de réelles conclusions sur cet exercice de coordination fine.

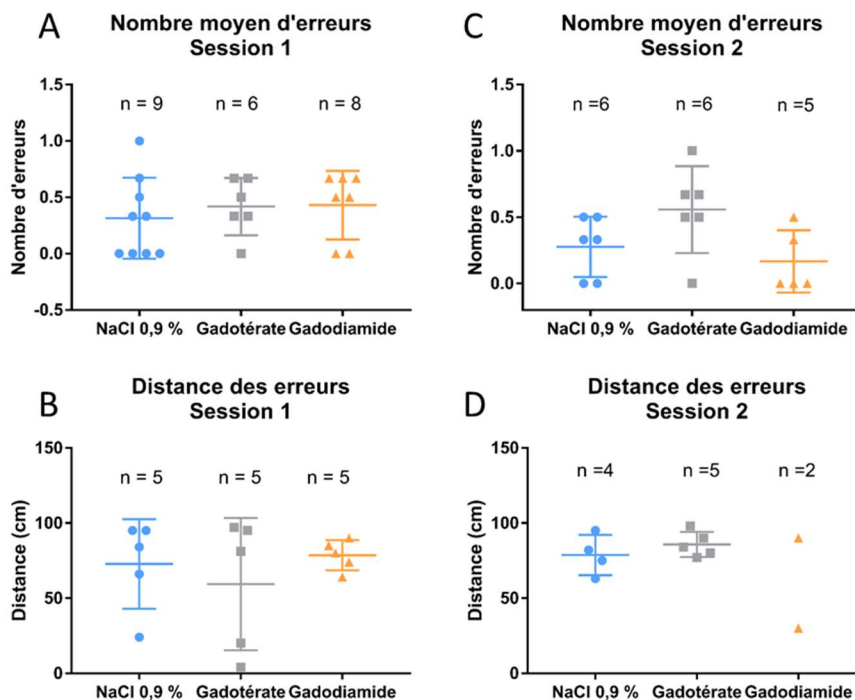


Figure 113 : Test du balance beam. Nombre moyen d'erreurs et leur distance. Les effectifs se réduisent sur le graphique des distances de l'erreur car certains rats n'ont pas fait d'erreurs.

En conclusion, le test du balance beam n'a pas permis de conclure sur cet exercice de d'étude de la coordination motrice des rats des groupes gadotérate ou gadodiamide, à cause d'une variance élevée des paramètres mesurés.

### (ii) Staircase

Pour ce test, les animaux ont été préalablement rationnés en nourriture de façon à augmenter leur coopération. Les rats ont été entraînés pendant 4 jours à attraper les récompenses sur les marches. Le jour du test (semaine 15), le nombre de marches atteintes, la marche la plus basse atteinte (la marche 1 étant la plus proche du rat et la marche 6 difficile à atteindre) et le nombre de récompenses mangées ont été évalués. De plus une distinction patte gauche et droite a été prise en compte. Les rats n'ayant fait aucune tentative pour attraper les friandises ont été exclus, ce qui a réduit le nombre de rats à 9 dans les groupes traités par gadotérate et gadodiamide.

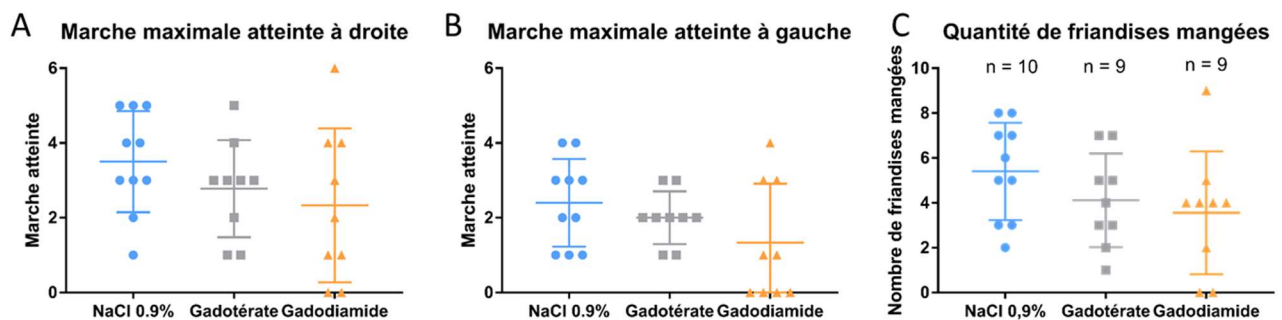


Figure 114 : Test du staircase. Marche maximale atteinte à gauche et droite



On observe une tendance des 3 groupes à être plus à l'aise pour atteindre les marches du côté droit que du côté gauche. Les rats témoins atteignent en moyenne d'avantage les marches basses que les rats traités par le gadodiamide. Les rats du groupe gadotérate ont un comportement intermédiaire.

En conclusion, le test du staircase n'a pas mis en évidence un effet significatif des deux agents de contraste sur l'atteinte et la préhension de friandises par les rats. Cependant, on note une tendance à une diminution de ces comportements pour le gadodiamide et, moins marquée, pour le gadotérate.

(iii) Rotarod

Le premier protocole sur le rotarod a consisté à travailler à vitesse croissante (de 0 à 40 rotations par minute (RPM) en 2 minutes), permettant ainsi d'évaluer la capacité du rat à s'adapter aux changements de vitesse de rotation sans être déséquilibré. Ne prenant en compte que les rats ayant au moins 66% de coopération sur les 3 essais, les effectifs sont nécessairement réduits. Dans cette étude, la coopération a été évaluée de la façon suivante, sur les 3 essais : 0 – incapacité de maintenir le rat en marche sur la roue, sans qu'il ne se retourne ou abandonne de lui-même ; 0,5 : coopération au moyen de la motivation du rat (recours à des friandises dispensées tout du long de l'essai); 1 : coopération spontanée du rat. La moyenne de ce score sur les 3 essais représente le pourcentage de coopération présenté en Figure 115 A. Nous avons noté une baisse de la coopération le 5<sup>e</sup> jour, ce qui nous faisait exclure plus d'animaux qu'au 4<sup>e</sup> jour (Figure 115 B et C). Pour cette raison, nous avons choisi de comparer les performances des rats au 4<sup>e</sup> jour plutôt que le 5<sup>e</sup> jour, initialement considéré comme jour du test.

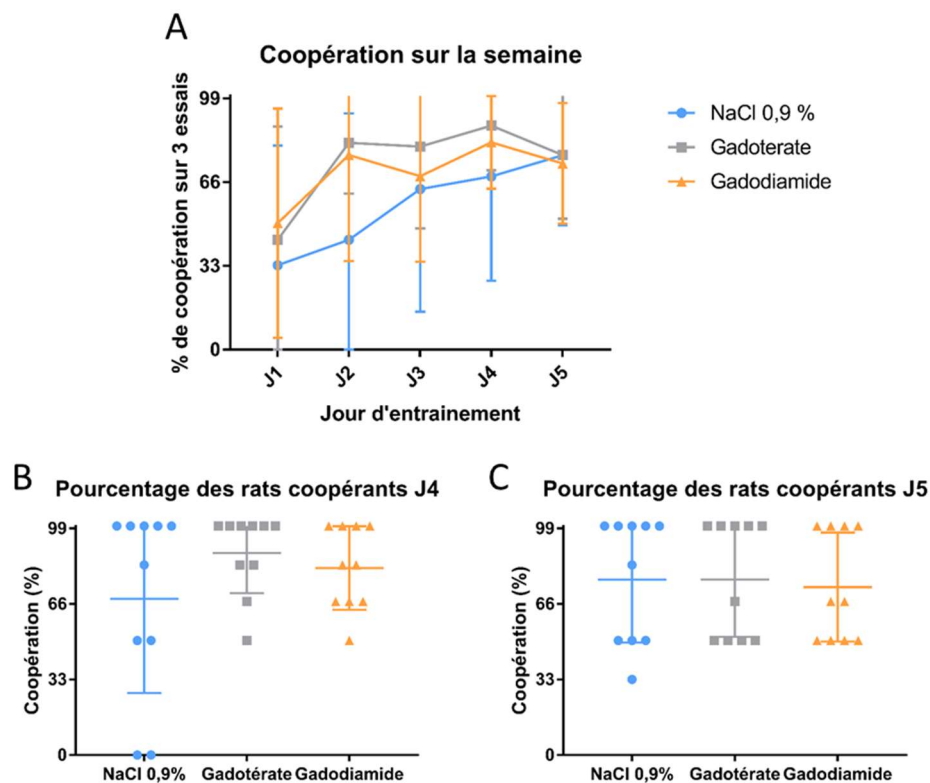


Figure 115 : Coopération des rats sur le test du rotarod à vitesse de rotation croissante. L'entraînement améliore la coopération au fil de la semaine, puisqu'elle augmente progressivement, avant de diminuer le 5<sup>e</sup> jour pour les groupes gadotérate et gadodiamide (B et C).



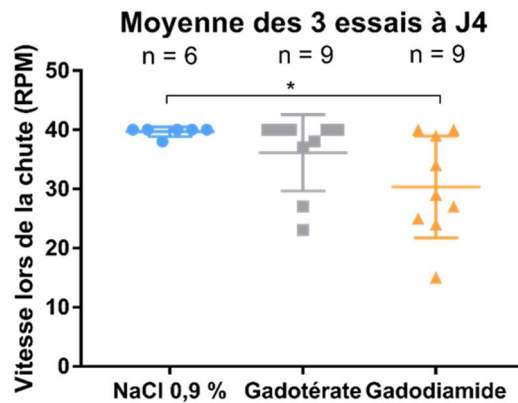


Figure 116 : Test du rotarod. Vitesse moyenne atteinte sur les 3 essais lors du protocole d'accélération, au jour 4 (maximum 40 RPM).

La vitesse de rotation lors de la chute a été significativement inférieure pour le groupe gadodiamide que pour le groupe témoin ( $p < 0,05$ ). Pour le gadodiamide, seuls 3 rats sur 9 ont atteint la vitesse de 35 RPM, les autres tombant à des vitesses de rotation plus faibles (en moyenne  $30 \pm 8,5$  RPM). Les rats témoins (6/6) ont presque toujours réussi le test, tombant à  $40 \pm 0,82$  RPM. Deux rats du groupe gadotérate sont également tombés à des vitesses plus faibles.

Le deuxième protocole, réalisé à vitesse de rotation constante, a été effectué 9 semaines après le premier protocole. Il permet d'évaluer l'endurance du Rat et sa coordination motrice. Ne prenant en compte que les rats ayant au moins 66% de coopération sur les 3 essais (comme précédemment), les effectifs étaient réduits et varient selon la vitesse de rotation. Le groupe témoin a, notamment, été peu coopératif.

On observe qu'un rat du groupe gadotérate a chuté très rapidement, dès la plus faible vitesse testée (20 RPM). A partir de 28 RPM, un deuxième rat gadotérate s'est retrouvé en difficulté (a chuté plus tôt que les autres), puis un 3<sup>e</sup> à 40 RPM. Les autres rats du groupe sont parvenus à rester sur la roue sans difficulté. Pour le groupe gadodiamide, ce sont 3 animaux qui ont éprouvé des difficultés à se maintenir sur la roue dès 28 RPM. L'effet observé n'est significatif à aucun des délais.

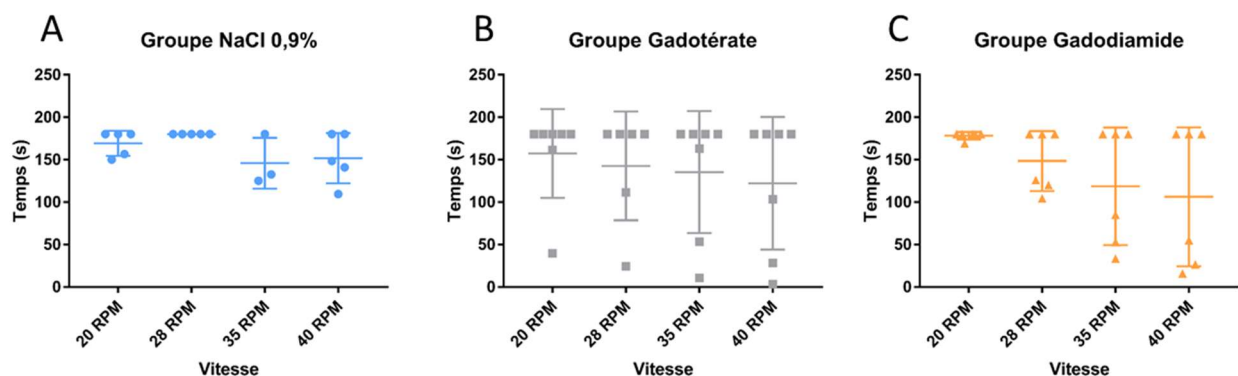


Figure 117 : Temps de course avant la chute, sur le rotarod tournant à vitesse constante. Les animaux chutant plus rapidement en B et C sont les mêmes pour toutes les vitesses de rotation.

En conclusion, on a noté une diminution modérée de la capacité de maintien sur la roue pour les deux agents de contraste, significative pour le gadodiamide dans le cas d'une vitesse de rotation croissante.



#### d) Apprentissage dans le labyrinthe en Y

La capacité d'apprentissage des rats à effectuer une tâche en particulier a été évaluée. Il s'agissait de leur apprendre, par un renforcement positif (friandise en bout du « bon » bras) à aller visiter en premier le bras situé à leur droite dans un labyrinthe en Y, quel que soit le bras dans lequel ils étaient placés au départ. L'apprentissage a été réalisé pendant 8 jours, soit deux fois 4 jours séparés par un weekend, à raison de 5 passages par jour. Une cotation 0 ou 1 a été attribuée selon si le bras visité en premier était le gauche (0) ou le droit (1).

L'apprentissage n'a pas montré de différences significatives entre les groupes (effet groupe :  $p = 0,6344$ ) (Figure 118). L'apprentissage s'est fait progressivement au fur et à mesure de l'entraînement, les rats explorant le bras droit en premier et consommant ainsi la récompense. L'apprentissage semble évoluer de la même façon pour tous les groupes, mais il a été incomplet après les 8 jours d'entraînement.

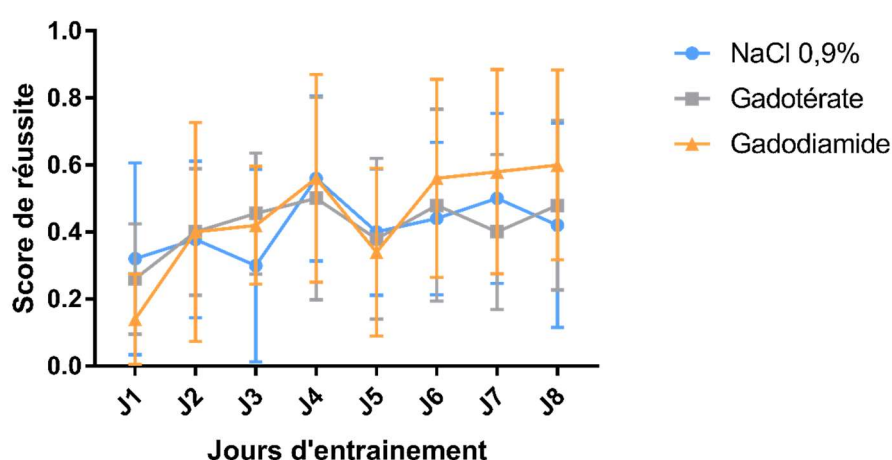


Figure 118 : Test du labyrinthe en Y. Evolution de l'apprentissage de la tâche « visiter le bras droit » au cours du temps.

En conclusion, la courbe d'apprentissage des rats des trois groupes a été similaire. Aucun effet lié au traitement n'a été observé.

#### e) Tests de mémoire

##### (i) Mémoire de travail dans le labyrinthe en Y

Le test a été réalisé deux fois avec un délai de 9 semaines (semaine 8 et 17). Le rat visite deux bras du Y, l'accès au 3<sup>e</sup> étant bloqué. Lorsque l'on replace l'animal dans le labyrinthe, il doit logiquement explorer en premier le bras inconnu, s'il se souvient lesquels il a déjà visités. Un score de 0 (visite d'un autre bras) ou 1 (visite du bras inconnu) a été utilisé.

La session 1 du test n'a pas pu être validée car les rats témoins n'ont pas réussi l'exercice. En effet, seuls 40% des rats ont visité le bras inconnu en premier.

Lors de la session 2, 80% des rats témoins ont réussi. Il n'y a pas eu de différence significative entre les groupes, les 3 groupes ayant exploré, pour la majorité des rats, le bras inconnu en premier (réussite du test à 80% pour le groupe témoin, 90% pour le groupe gadotérate et 80% pour le groupe gadodiamide).

En conclusion, nous pouvons difficilement conclure sur ce test de mémoire de travail.



(ii) Reconnaissance de nouvel objet

Ce test a été effectué sur 5 jours (habituation progressive à la cage et aux objets). Il consistait, lors du 5<sup>e</sup> jour de passage des animaux, à comparer l'exploration d'un objet inconnu par rapport à un objet connu. Les animaux ont en principe tendance à passer plus de temps à explorer l'objet inconnu quand ils ont bien mémorisé l'objet connu et ôté (Ennaceur, 2010). Le critère de 20 secondes d'exploration des objets n'a pas été atteint pour certains des rats traités par le gadodiamide et le gadotérate. Par conséquent, les effectifs sont légèrement réduits à respectivement à n=8 et n=9.

La durée d'exploration du nouvel objet n'a pas significativement différé entre les 3 groupes (Figure 119). Sur 20 secondes d'exploration des 2 objets, les rats ont passé en moyenne 13 secondes à explorer le nouvel objet pour les groupes témoins et gadotérate, et 16 secondes pour le groupe gadodiamide.

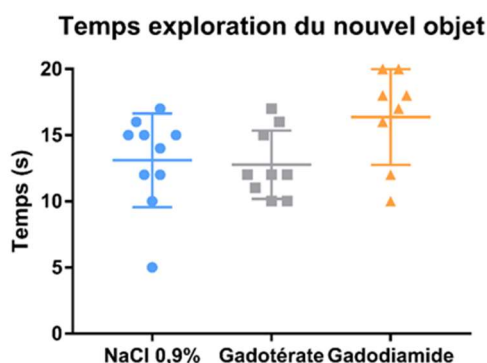


Figure 119 : Temps d'exploration d'un objet inconnu placé à côté d'un objet connu, sur une durée d'exploration totale de 20 secondes.

En conclusion, les groupes testés n'ont pas différé en ce qui concerne leur capacité à explorer un nouvel objet placé dans un environnement connu.

f) Test sensoriels

(i) Test de Von Frey

Le test de Von Frey, consistant en l'évaluation du seuil de sensibilité (retrait) des pattes postérieures après sensibilisation par des filaments de diamètre croissant, a été réalisé par 3 manipulateurs différents. En effet, ce test n'étant pas automatisé, il est opérateur-dépendant (force appliquée, localisation de l'appui du filament sous la patte). La répétabilité inter-expérimentateur du test s'est avérée faible (Figure 120). Cependant, une tendance à une moindre sensibilité (réaction de retrait de la patte pour des filaments de diamètre plus important) semble apparaître pour les rats des groupes gadotérate et gadodiamide (pour les expérimentateurs 1 et 2 surtout).

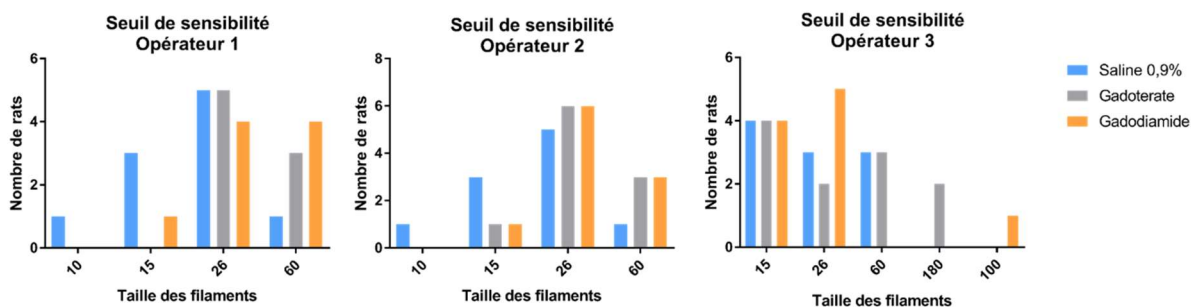


Figure 120 : Seuils de retrait de la patte (droite) selon les manipulateurs et les groupes. Les barres correspondent au nombre de rats ayant effectué un mouvement de retrait de la patte pour chaque diamètre de filament appliqué.





En conclusion, une tendance à une moindre sensibilité des pattes à un stimulus a été notée pour les deux chélates de Gd par rapport au groupe témoin.

(ii) *Test de l'olfaction*

L'olfaction des animaux a été évaluée au moyen de friandises à retrouver sous une litière propre. Le contrôle de l'intérêt du rat est assuré par une friandise placée de façon visible (si un rat ne présente aucun intérêt, il est exclu du test).

Le test montre une légère différence (non significative,  $p = 0,195$ ) entre les rats gadodiamide et les rats témoins à trouver les 2 friandises cachées. En effet, 3 animaux du groupe gadodiamide n'ont pas trouvé les friandises cachées, alors qu'ils avaient mangé celle placée au-dessus de la litière. Aucun effet n'a été noté pour le gadotérate.

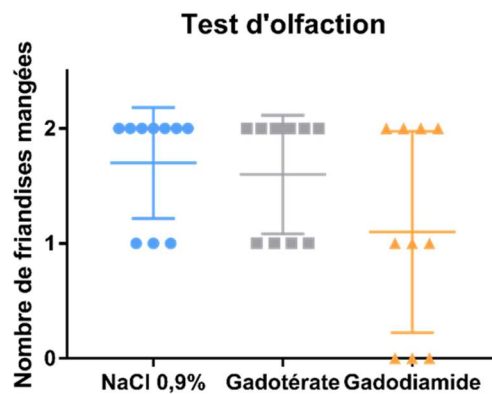


Figure 121 : Nombre de friandises trouvées lors du test

En conclusion, ce test suggère une légère diminution de l'olfaction chez les animaux du groupe gadodiamide, par rapport au groupe témoin. Les rats du groupe gadotérate se sont comportés comme ceux du groupe témoin.

*B. Concentrations sériques de marqueurs de toxicité*

Les concentrations sériques de protéine C réactive, créatine kinase, corticostérone et d'aldostérone n'ont révélé aucune différence entre les groupes (Figure 122). Cela suggère que les rats plus anxieux et moins actifs ne présentaient pas de signe d'inflammation systémique ou de stress aigu.



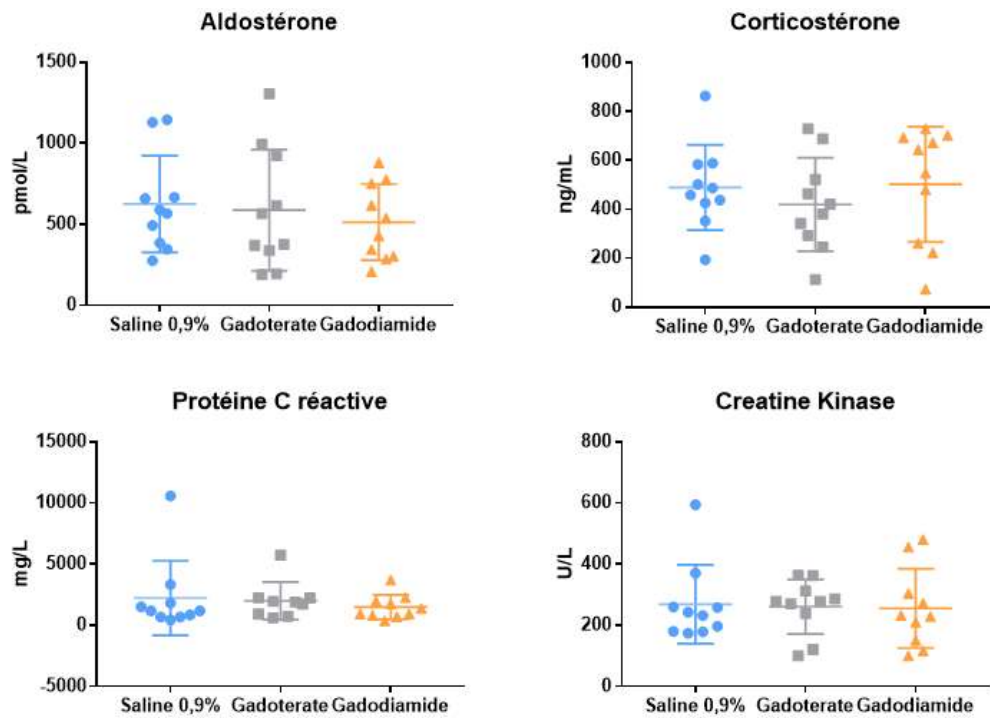


Figure 122 : Concentrations des différents marqueurs d'inflammation ou de stress, déterminées dans du sérum prélevé lors de l'euthanasie des animaux.

### C. Histologie

Les études d'histomorphométrie sur coupes colorées en HES n'ont pas révélé de différences entre les groupes sur les tailles des structures cérébrales entre les groupes (striatum, thalamus, amygdale, cervelet).

Aucune différence non plus n'a été notée sur la présence des isoformes de l'enzyme de synthèse du GABA (GAD 65 et 67) dans les noyaux cérébelleux profonds (Figure 124).

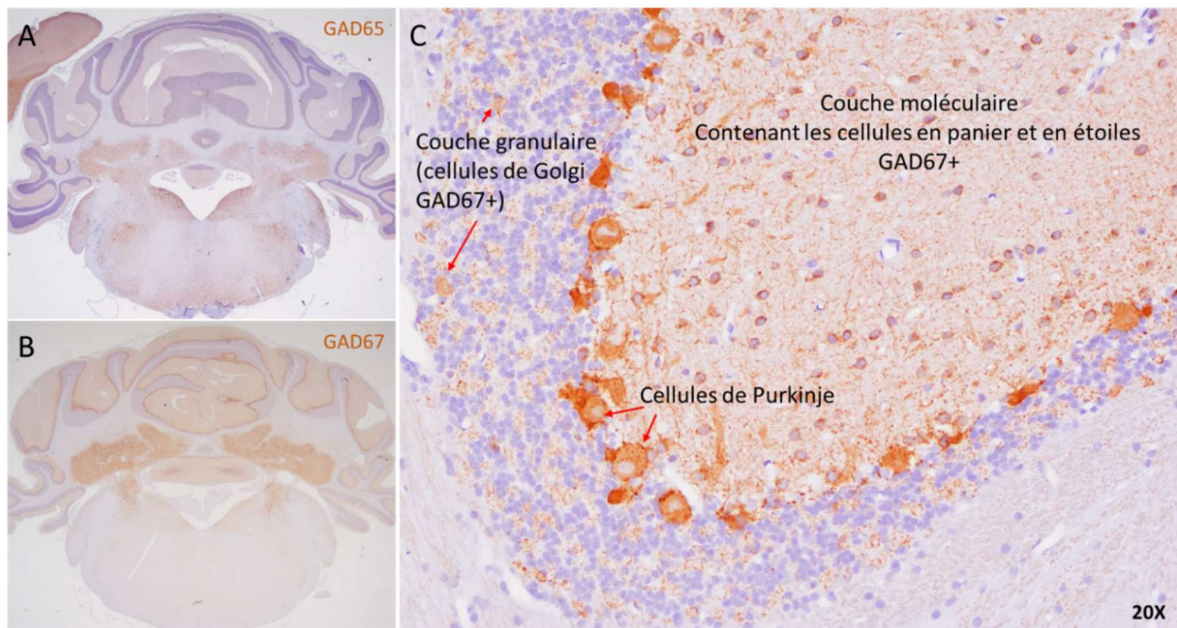


Figure 123 : Exemple de marquages obtenus de GAD65 (A) et GAD67 (B) sur des coupes cérébelleuses contenant les DCN. (C) : Marquage de GAD67 dans les différentes populations cellulaires du cortex cérébelleux.

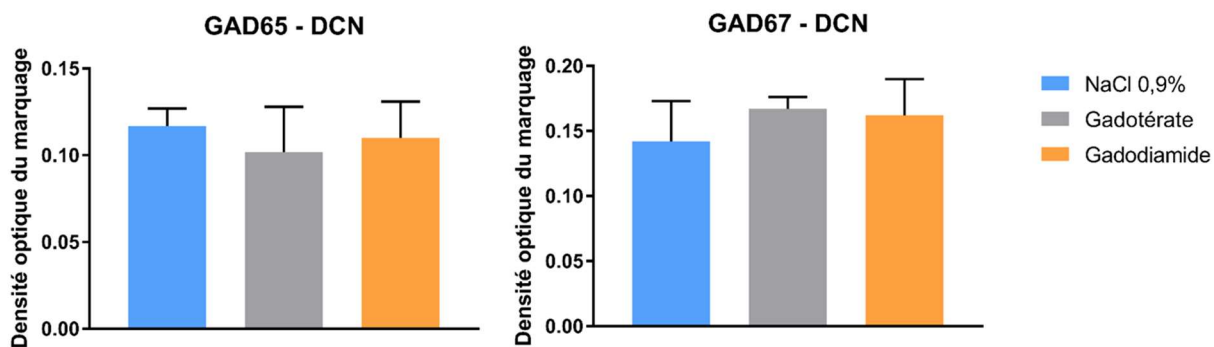


Figure 124 : Densités optiques des marquages GAD65 et GAD67 (moyenne des DCN, n=4 rats). Les différences ne sont pas significatives ( $p = 0,793$  pour GAD65, et  $p = 0,364$  pour GAD67).

#### D. Dosages de GABA et d'UCL-1

Les concentrations d'UCL-1 et de GABA dans les broyats de cortex cérébelleux apparaissent ci-dessous. Cette étude n'a révélé aucune différence entre les 3 groupes, quel que soit le marqueur étudié.

Tableau 20 : Concentrations d'UCL-1 (ubiquitin C-terminal hydrolase 1) et de GABA (acide gamma-aminobutyrique) ( $m \pm SD$ ) dans des broyats de cervelets de rats traités par du sérum physiologique, du gadodiamide ou du gadotérate (n=10 rats/groupe)

Traitement	Concentration ( $m \pm SD$ )	
	UCL-1 (ng/mL)	GABA (pg/mL)
Témoins	246 $\pm$ 15	833 $\pm$ 140
Gadotérate	261 $\pm$ 19	778 $\pm$ 189
Gadodiamide	237 $\pm$ 33	770 $\pm$ 72



#### 4. Conclusions

Cette seconde étude de la neurotoxicité des chélates de Gd a comparé un chélate de Gd linéaire et un macrocycle. Afin d'amplifier les éventuels effets toxiques, les doses de chélates de Gd ont été augmentées : ici, 20 injections de 5 fois la dose clinique.

L'hypoactivité qui avait été observée dans la première étude n'a pas été retrouvée de façon si franche (uniquement à la première session, sur l'openfield, et une légère tendance sur l'EPM). De même, une diminution du seuil d'anxiété n'a pas été mise en évidence sur l'EPM mais seulement sur la première session d'openfield. Les concentrations des marqueurs de l'inflammation et des hormones de stress se sont avérées similaires entre les groupes à l'issue de l'étude, indiquant l'absence d'un effet lié aux traitements sur ces marqueurs.

Aucun problème d'apprentissage ou de mémoire n'a été mis en évidence, quels que soient les modèles testés.

Cependant, les injections de gadodiamide semblent perturber la coordination motrice. En effet, bien que les observations ne concernent pas l'ensemble des rats traités, on note sur tous les tests de motricité une certaine difficulté des rats de ce groupe (suspension sur une barre, accès à des marches en contrebas (staircase), adaptation et tenue sur une roue tournante). Le groupe gadotérate semble aussi légèrement affecté sur ces tests, où il se situe à une place intermédiaire entre les groupes témoin et gadodiamide. Il en va même, pour la sensibilité des animaux sur le test de Von Frey. Dans le test de l'olfaction, seul le gadodiamide semble présenter un effet (anosmie). Cet effet est peut-être à rapprocher de la concentration élevée de Gd total mesurée dans les bulbes olfactifs pour ce produit. Le faible effectif de ces études associé à une grande variabilité intra-groupe demande cependant une confirmation des observations faites.

Au plan histologique, aucune anomalie ou lésion n'a été notée. Aucune différence n'a été observée en termes d'histomorphométrie ni d'expression des deux isoformes de la GAD, enzyme de synthèse de GABA.

Le Tableau 21 résume et compare les résultats des deux études.



Tableau 21 : Résumé comparatif des résultats des deux études d'évaluation de la neurotoxicité. (en gras, les paramètres pour lesquels des effets ont été observés ; + : effet qualitatif ; ++ : effet significatif,  $p < 0,05$  ; +++, effet significatif,  $p < 0,01$ ).

	Etude 1	Etude 2
Produits	NaCl 0,9% vs. <b>gadodiamide</b>	NaCl 0,9% vs. <b>gadotérate</b> vs. <b>gadodiamide</b>
Dose	20 x 1,8 = 36 mmolGd/kg cumulés	20 x 2,5 = 50 mmolGd/kg cumulés
Conditions des tests	L'après-midi, en lumière rouge (~120 lux)	L'après-midi, en lumière blanche atténuée (350 lux)
Tests d'activité	<b>Openfield S1 ++, S2 +++</b> <b>Actimétrie ++</b> <b>EPM S1 ++, S2 ++</b>	<b>Openfield S1 +</b> <b>EPM S1 +</b>
Tests d'anxiété	<b>Openfield S1 +, S2 ++</b> <b>EPM S1 +, S2 +</b>	<b>Openfield S1 ++</b> EPM
Tests de mémoire	Piscine de Morris	Y-Maze Y-Maze apprentissage Objets nouveaux
Tests de coordination motrice	Barres (Irwin) Balance Beam Staircase Catwalk	<b>Barres (Irwin) S2 +</b> Balance Beam <b>Staircase +</b> <b>Rotarod accélération ++, stationnaire +</b>
Tests sensoriels	Non réalisés	<b>Olfaction +</b> <b>Sensibilité +</b>
IRM	<b>DCN : Raccourcissement T1, T2, T2* +++</b> <b>Cortex cerevlet : Raccourcissement T2 ++ et T2* +</b>	<b>DCN : Raccourcissement T1 gadodiamide +++</b> <b>gadotérate +</b> <b>Plexus à M0 : Raccourcissement T1 +++</b>
Concentration de Gd total à M4	Bulbes : 26,1 ± 4,0 nmol/g DCN : 21,2 ± 4,3 nmol/g Striatum : 17,9 ± 3,9 nmol/g Cortex cérébelleux : 8,8 ± 2,4 nmol/g	<b>Certaines structures</b> (bulbes olfactifs, thalamus, cortex cérébral, plexus choroïdes) <b>→ concentrations de Gd total plus faibles que dans l'étude 1 alors que la dose injectée est plus élevée</b>
Histologie	Au délai M5 : CD68, GFAP Lipofuscine	Au délai M4 : Histomorphométrie GAD65 et GAD67
Marqueurs de toxicité	Spectro-RMN des DCN Lactate, glutamate, pyruvate, glucose et glycérol dans les microdialysats des DCN	UCLH-1 et GABA dans un broyat de cortex cérébelleux



## DISCUSSION des résultats de la recherche d'une éventuelle neurotoxicité

Dans la première partie de ce travail, nous avons décrit et discuté nos travaux concernant la distribution et la rétention de chélates de Gd au niveau du système nerveux central. Le Gd étant un métal exogène ayant une toxicité biologique importante, il convient maintenant de discuter les éventuelles conséquences neurologiques de cette capture.

Nos études ont été réalisées chez le Rat. Ce modèle est très souvent utilisé dans l'étude des pathologies cérébrales et neurodégénératives, avec les primates non-humains. Cette dernière espèce est bien sûr plus proche de l'Homme, mais évidemment bien moins accessible. Le Rongeur est un bon compromis, car son système nerveux central est anatomiquement et fonctionnellement proche du nôtre. Il est utilisé dans la majorité des études pharmacologiques et toxicologiques, avec le Chien. En neurologie, le Rat est considéré comme étant une espèce pertinente pour l'étude des pathologies déficitaires (déficits posturaux, akinésie, tremblements, dyskinésies) (Cenci, 2002 ; Shah, 2010).

En clinique, la recherche de signes anormaux est évidemment possible (et souhaitable), mais les patients sujets à une IRM cérébrale présentent de fait fréquemment une pathologie neurologique sous-jacente, et les facteurs confondants et biais potentiels sont donc nombreux. Ils ne permettent donc que difficilement l'étude approfondie du risque. Dans les études précliniques cependant, les animaux sont issus d'un fond génétique contrôlé et identique et un groupe témoin est systématiquement inclus pour comparaison. Les études se déroulent en aveugle, les animaux sont randomisés et le prélèvement d'organes permet des études histologiques, quand la clinique se limite évidemment aux échantillons post-mortem. L'un des points de vigilance réside tout de même dans le fait que les animaux ont souvent subi des anesthésies gazeuses à répétition, ce qui peut avoir des conséquences neurologiques (Culley, 2004 ; Xie, 2008). Les groupes témoins sont cependant disponibles pour comparaison.

Les tests de toxicologie neuro-comportementaux chez le Rongeur sont, quant à eux très variés, largement décrits et souvent validés. En ce qui concerne le comportement, il est souvent étudié la journée, alors que les rongeurs sont des animaux nocturnes, auxquels on demande donc de coopérer en pleine période de sommeil. Le Rat présente l'avantage d'être assez expressif. Ils vocalisent facilement pour exprimer leur inconfort. Il existe, par exemple, une « Rat grimace Scale », validée, permettant une cotation de la nociception mais aussi du bien-être des animaux grâce à l'observation attentive de leurs oreilles, museau, vibrisses et yeux (Sotocinal, 2011 ; Leung, 2016). Les animaux étant confinés à leurs cages d'hébergement, il est important de les héberger à plusieurs pour qu'ils maintiennent des interactions sociales avec leurs congénères, et d'enrichir au maximum leur milieu de vie. Ces paramètres éthologiques influencent en effet la qualité des études neurotoxicologiques comportementales (Silverman, 1988).

Trois approches distinctes ont été abordées pour l'étude de la potentielle neurotoxicité de la rétention des chélates de Gd. L'étude de marqueurs endogènes, circulants ou cérébraux ; l'analyse anatomo-histopathologique des structures cérébrales et enfin une étude neuro-comportementale. Ces approches sont complémentaires, et avaient pour objet de couvrir un large spectre pour rechercher un éventuel signe neurotoxique. Les deux principales approches que nous n'avons pas mises en œuvre sont les modèles *in vitro*, d'une part, et électrophysiologiques d'autre part. Nous avons donc réalisé des expérimentations assez variées, complémentaires et validées dans la littérature, afin de caractériser au mieux le phénomène. Si un effet apparaissait sur cette batterie large, il pouvait bien entendu être approfondi ultérieurement.





## A. Approche comportementale

L'approche neurocomportementale a intégré les composantes du SNC qui nous intéressent particulièrement (notamment les fonctions ayant une composante cérébelleuse), mais il faut noter que des signes toxiques peuvent relever également du système nerveux périphérique (pathologies de la moelle épinière, ou des terminaisons nerveuses périphériques), ainsi que du système nerveux autonome (mydriase, myosis, miction, diarrhées...).

Dans nos deux études, les doses ont été choisies délibérément élevées, soit 36 et 50 mmolGd/kg cumulées, correspondant respectivement à l'équivalent de 60 à 80 examens IRM injectés à la dose clinique (adaptée au Rat). Ces doses ont été utilisées classiquement dans des études traitant de la distribution cérébrale du Gd, et aucun trouble comportemental majeur n'a été rapporté (McDonald, 2017b ; Lohrke, 2017).

Pour certains tests, nous avons modifié la phase d'apprentissage lors de la deuxième étude, au vu des résultats de la première. Par ailleurs, certains n'ont pas été inclus dans cette deuxième étude, ou d'autres ont été rajoutés. Les conditions expérimentales de l'évaluation comportementale n'ont pas été les mêmes d'une étude à l'autre. En effet, nous avons choisi pour la première une lumière rouge en salle de tests, afin d'avoir une meilleure participation et activité des animaux, qui pour certains auteurs, seraient plus adaptées pour réaliser des études comportementales (Spalding, 1969). Cependant, ce sujet reste controversé (Castelhanos-Carlos, 2009) et nous avons travaillé en lumière blanche pendant la deuxième étude. Dans tous les cas, le comportement a été évalué l'après-midi, ce qui correspond à la phase de repos des animaux. L'idéal aurait été de travailler en cycles inversés, ce qui est plus compliqué en termes de logistique et d'organisation.

### 1. Comportement général, activité et anxiété

Nous avons réalisé un des tests les plus simples, basé sur l'observation générale des animaux. Il s'agit d'une adaptation du test d'Irwin (Irwin, 1968) et du FOB (« functional observation battery ») (Roux, 2005). Initialement mis au point pour déterminer les effets pharmacologiques aigus de molécules administrées à différentes doses, nous l'avons utilisé comme un premier moyen de détection sensible et peu spécifique, de signes révélateurs d'un effet particulier, et ainsi d'orienter les recherches de neurotoxicité. Ont été évalués qualitativement des paramètres balayant le comportement, les systèmes nerveux autonome et central, et les fonctions neuromusculaire et sensorimotrice. L'animal est observé dans sa cage en compagnie de ses congénères pour un certain nombre de critères généraux, puis on procède à une observation plus approfondie et l'application de stimuli. Les seuls paramètres ressortant parfois dans notre cas ont été un poil terni, une peau brunie, une piloérection, une chromodacryorrhée, et une diminution de la sensibilité (baisse de réponse au pincement de la patte ou de la queue), sur laquelle nous reviendrons plus tard avec le test de Von Frey. La plupart de ces effets ont été observés exclusivement dans le groupe gadodiamide. Les effets sur le pelage, observés dans les groupes gadodiamide, associés parfois à de petites lésions cutanées, sont cohérents avec d'autres travaux (Lohrke, 2017). En effet, la peau est un tissu d'accumulation non négligeable du Gd, bien plus que le SNC (Lohrke, 2017), et des injections répétées à doses élevées favorisent l'apparition de ces signes cutanés, y compris chez des animaux dont la fonction rénale est normale (Sieber, 2008). La chromodacryorrhée consiste en l'apparition d'un pigment rouge, la porphyrine, autour des yeux et du museau. Elle est sécrétée physiologiquement dans les larmes, en faible quantité, mais son augmentation témoigne d'un stress ressenti par les animaux, ou d'une diminution du toilettage. Celle-ci a cependant été aussi observée chez les groupes témoins, et est probablement plutôt attribuée à l'inconfort des administrations ou manipulations répétées, qu'au traitement.



La suspension à deux barres parallèles, permettant au rat d'appuyer ses pattes postérieures sur la barre la plus basse, n'a pas révélé de différences majeures avec les témoins dans la première étude. Dans la deuxième cependant, nous avons retiré la première barre, et effectué une cotation sur la durée de maintien précédant la chute. Il est alors apparu que les rats du groupe gadodiamide chutaient en moyenne légèrement plus tôt. Cependant, l'observation est à relativiser, car peu de rats témoins ont obtenu un bon score sur 2 minutes, et l'interprétation est difficile car la chute peut refléter un renoncement plutôt qu'une perte de traction musculaire.

Le test de l'openfield a été réalisé à deux reprises dans chaque étude, pendant 10 minutes dans un espace ouvert de 1m<sup>2</sup>. Ce test classique permet l'évaluation du comportement exploratoire du rongeur dans un nouvel environnement (Sousa, 2006). Les Rongeurs ont une mauvaise vue, surtout en laboratoire où leur vision est détériorée par les lumières blanches des salles, mais leur odorat très développé leur permet une appréciation fine de leur environnement (Castelhano-Carlos, 2009). L'enregistrement vidéo du test et son analyse ultérieure par un logiciel a mis en évidence, dans nos études, une diminution significative de la distance parcourue et du nombre de visite chez les rats du groupe gadodiamide, et également gadotérate (dans une moindre mesure, et non significatif comparativement au groupe témoin). Nous avons traduit cela par une hypoactivité, cohérente avec l'augmentation du temps d'immobilité. Cette hypoactivité induite par le gadodiamide dans un environnement nouveau, a été confirmée par le test d'activité (en cages Phenotyper), où la distance parcourue par les animaux dans une cage d'hébergement de 45 cm sur 45 cm, a été enregistrée en continu pendant 46 heures. Une fois l'exploration du nouvel environnement faite (les 2 premières heures dans notre étude), l'exploration baisse, et nous enregistrons l'activité de base des animaux (à l'exception notable du fait qu'ils ne sont plus ici en groupes sociaux). A pratiquement chaque délai de mesure, la distance moyenne parcourue des rats témoins a été plus élevée que celle du groupe gadodiamide. Le gadotérate n'a pas été testé sur ce modèle (puisque non inclus dans la première étude). Cette hypoactivité sur le cumul de la distance en 46h est significative, au risque  $\alpha$  de 1%. Il est étonnant qu'alors que la deuxième étude évalue ces mêmes critères à des doses plus élevées, la baisse d'activité associée au gadodiamide (sur le test de l'openfield) soit moins franche. Cela s'explique peut-être par le changement de luminosité ou de manipulation (expérimentateur, fréquence). Une hypoactivité a également été retrouvée sur le test du labyrinthe en croix surélevée (EPM), sur les deux sessions de l'étude 1 pour le gadodiamide. Sur la deuxième étude, seule une tendance a été observée pour les deux groupes lors de la 1<sup>e</sup> session.

L'espace étant encadré de parois, la zone centrale plus découverte est perçue comme anxiogène, puisque le Rongeur de laboratoire a conservé ses réflexes innés de proie, et préfère naturellement le confort des zones confinées, et donc longer les parois, le phénomène de thigmotaxie (Simon, 1994). La mesure du temps passé près des parois ou dans la zone centrale en proportion du temps total du test, serait un comportement indicateur d'une anxiété (Seibenhener, 2015). L'activité étant une variable confondante dans l'évaluation de l'anxiété sur ces tests (Ennaceur, 2016), nous avons choisi de corriger l'activité au centre de l'activité totale des animaux. Dans la première étude, nous avons noté une moindre exploration du centre du groupe gadodiamide par rapport aux témoins, s'amplifiant sur la deuxième session. Dans la seconde étude, ce phénomène a été observé pour gadodiamide et gadotérate sur la première session, mais il n'a pas été constaté sur la seconde, où le pourcentage d'activité au centre de l'openfield des témoins s'est abaissé pour atteindre celui des autres groupes.

Un test normalement dédié à l'étude de l'anxiété est l'EPM. Tout comme l'openfield, il consiste en 2 zones distinctes, l'une aversive, l'autre non : 2 bras sont ouverts en hauteur sur le vide, sans paroi, et 2 bras fermés. Ce test est largement reconnu dans l'investigation d'un comportement d'anxiété (Walf, 2007). Cependant, il



n'a pas reproduit les effets observés sur l'openfield. Seule une légère tendance est notée sur la deuxième session de l'étude 1, et la première session de l'étude 2. Si l'on analyse le comportement des rats témoins, il apparaît que leur activité dans les bras ouverts est proche de 50% et donc que le test n'est pas suffisamment anxiogène. Les bras ouverts de notre labyrinthe étaient probablement trop larges pour présenter un effet anxiogène.

L'anxiété est définie comme un état émotionnel négatif, au caractère défensif, associé à la perception d'une menace potentielle ou ambiguë (Ennaceur, 2016). Les tests que nous avons réalisés sont discutés, et certains auteurs considèrent qu'ils ne reflètent pas ou mal l'anxiété des animaux. Ils pourraient plutôt refléter une préférence naturelle pour une zone, pour un meilleur sentiment de sécurité. Pour mesurer le seuil d'anxiété, il faudrait idéalement utiliser des modèles qui présentent des situations d'aversion, que le rat aurait le choix de fuir ou d'affronter (Ennaceur, 2016). De plus, ces modèles ont initialement été conçus pour le screening de substances pharmacologiques, telles que les benzodiazépines, et sont donc moins sensibles dans une approche de neurotoxicologie chronique. En l'absence de plus de données, nous ne pouvons donc pas conclure à une anxiété avérée des animaux avec aucun des produits testés, à savoir le gadodiamide et le gadotérate.

Il a également été suggéré que la durée d'évaluation du risque pour la prise de décision concernant son évitement ou non, serait un paramètre pertinent de l'anxiété (Ennaceur, 2016). Cela pourrait expliquer les durées d'immobilité observées, interprétées comme une hypoactivité. Dans ce cas, l'évaluation des deux paramètres ne peut être décorrélée et l'interprétation en devient délicate. Le nombre des petits comportements (toilettage, redressement, reniflement d'odeurs, « freezing » c'est-à-dire l'adoption d'un comportement d'immobilité absolue) ont été relevés sur la première étude, et ne montraient aucune différence entre les groupes. L'idéal serait d'analyser à quoi vraiment correspondent ces temps d'immobilité (en chronométrant les temps des petits comportements). Cela est délicat et sources d'erreurs sur des vidéos de 10 minutes par rat, le logiciel ne proposant pas cette option. Nous avons dosé les hormones sériques corticostérone (un glucocorticoïde, l'équivalent du cortisol), et l'aldostérone (un minéralocorticoïde). Les dosages n'ont pas révélé de différences au sein des groupes. Il s'agit d'hormones de stress, libérées par les glandes surrénales de façon aiguë, qui ne documentent pas une anxiété chronique.

Nous avons aussi envisagé le fait que l'hypoactivité soit la conséquence d'un trouble musculaire, articulaire ou inflammatoire. Pour cette raison, nous avons dosé la créatine kinase et la protéine C réactive dans du sérum à l'issue de l'étude. Cela n'a révélé aucune différence entre les groupes traités et le groupe témoin. De plus, si l'on s'intéresse aux vitesses des rats dans la zone centrale anxiogène, il apparaît qu'elle n'est pas différente de celle des témoins.

## 2. Tests d'évaluation de la coordination motrice

Le cervelet et le striatum ont des fonctions bien décrites dans la coordination motrice (Flourens, 1824; Luciani, 1891 ; Manto, 2012a) et l'apprentissage moteur (Marr, 1969). Ils coordonnent les mouvements fins et leur anticipation, régulant la précision, la temporalité du geste, les distances. Les tests classiques d'étude de la coordination motrice, tels que le rotarod, le balance beam, le staircase ont été réalisés, mais aussi le Catwalk, plus sophistiqué, puisque calculant une soixantaine de paramètres caractérisant finement la démarche des animaux. L'interprétation de ces paramètres est par contre compliquée. Les paramètres sont mesurés pour chaque patte distinctement. Nous avons noté qu'un grand nombre de paramètres corrélait avec la vitesse, et avons donc fait un tri sur les traversées pour avoir des données initiales homogènes. Aucun paramètre n'a mis en évidence de différences avec le groupe témoin. Aucun trouble de la démarche (de



type ataxique ou autre) n'apparaît donc suite à des injections répétées de gadodiamide (36 mmolGd/kg) (gadotérate non testé sur cet exercice).

Finalement, ce sont les tests plus classiques qui ont permis de noter quelques différences. Le rotarod a mis en évidence que 3 rats du groupe gadodiamide ont éprouvé des difficultés à se maintenir sur le cylindre roulant, que ce soit à vitesse constante ou croissante. En accélération, deux tiers des animaux gadodiamide ne parviennent pas à atteindre la vitesse de 40 RPM. Un effet significatif sur la capacité d'adaptation de la coordination motrice à la vitesse ou bien une diminution de l'endurance est donc apparue avec ce produit. Dans le groupe gadotérate, quelques rats ont présenté un effet similaire, mais pour des vitesses plus élevées. Pour ce produit, il n'y avait pas de différence significative avec le groupe témoin. La coopération de certains rats était obtenue en leur dispensant des friandises régulièrement. Il fallait ensuite juger si les animaux abandonnaient ou s'ils étaient réellement en difficulté. Plus de rats témoins que les rats des groupes traités ont ainsi été exclus du test, limitant la robustesse des comparaisons.

Le balance beam, consistant en la traversée d'une tige d'un mètre, de 3 cm de largeur au début, rétrécissant jusqu'à 1 cm, n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre les groupes. Ce résultat n'est pas cohérent avec l'altération de l'adaptation de la coordination observée sur le test du rotarod. Cependant, une fois de plus, il a été difficile d'obtenir des traversées de la tige sans aucun arrêt et à vitesse homogène. Dans la première étude, l'apprentissage s'était révélé être un échec, puisque la coopération des animaux du groupe gadodiamide était très faible. Cela peut néanmoins témoigner d'un comportement anxieux.

Sur le test du staircase, consistant en des escaliers en contrebas sur lesquelles il faut attraper des friandises, aucune différence n'a été notée entre le groupe gadodiamide et le groupe témoin dans la première étude. Dans la deuxième, cependant, une baisse des performances a été notée pour quelques rats du groupe gadodiamide. La variabilité des réponses a été importante au sein des groupes. La boîte est anxiogène, puisque les animaux les plus gros ont à peine la place d'y rentrer. La coopération sur ce test étant ainsi limitée dans la première étude, l'habituation a été prolongée lors de la deuxième étude, en présentant d'abord l'escalier sans la boîte, dans leur cage d'hébergement. Cette approche a été efficace. Il est intéressant de noter que les rats (y compris les témoins) ont l'air d'avoir plus de dextérité du côté droit en général. Ce phénomène a été rapporté dans la littérature (Güven, 2003).

### 3. Tests de la mémoire, l'apprentissage, la sensibilité et l'olfaction

Le cervelet et le *globus pallidus* ont des rôles de plus en plus décrits dans la cognition, l'attention, la motivation, la mémoire de travail et le raisonnement procédural (Middleton et Strick, 2000 ; Temel, 2005 ; Habas, 2010 ; Canto, 2018). Ainsi, des tests concernant la mémoire et l'apprentissage ont été inclus dans notre batterie comportementale.

L'apprentissage a été évalué dans la deuxième étude uniquement, avec un test d'apprentissage procédural : il s'agissait d'apprendre à l'animal, grâce à un renforcement positif (récompense), à aller toujours visiter le bras droit du labyrinthe en Y, le rat étant placé initialement dans un bras dans un ordre aléatoire. Un score de 1 était attribué si le rat allait dans le bon bras, et 0 sinon. Aucune différence n'a été observée entre les individus témoins et traités. Cependant, il est surprenant de voir que le score moyen initial était de 0,2, pour arriver à 0,6 après la semaine d'apprentissage, plutôt que de partir de 0,5 (une chance sur 2) pour arriver à 1 (réussite à tous les passages). Nous n'avons pas d'explication pour ce résultat, qui nous fait douter de la validation de ce modèle.



L'apprentissage sur la piscine de Morris, n'a pas révélé non plus d'effet significatif entre les groupes gadodiamide et témoin. Ce test n'a donc pas mis en évidence d'altération de la mémoire spatiale à moyen-long terme. Au cours de la semaine, tous les animaux se dirigeaient très rapidement vers la plateforme. Lors du dernier jour, celle-ci est enlevée, et l'on chronomètre le temps passé dans le quadrant où se trouvait la plateforme. Sur une durée d'observation de 60 secondes, le test est classiquement considéré réussi si les animaux passent plus de 15 secondes dans le quadrant en question. Alors que 100% des rats sont allés explorer le bon quadrant immédiatement, ils n'y ont pas passé beaucoup plus qu'un quart du temps d'exploration. Le choix d'une durée de référence plus courte aurait peut-être été plus adapté. Il est en effet décrit qu'après 30 secondes, le temps passé dans le quadrant préférentiel diminue (Vorhees, 2006). Cependant, nous n'avons pas noté de différence entre les rats gadodiamide et les rats témoins.

Dans nos conditions expérimentales, le test de la mémoire de travail, évalué sur le labyrinthe en Y, n'a pas été validé par notre groupe témoin sur l'une des sessions. Par conséquent, nous ne pouvons conclure sur ce paramètre.

Les noyaux cérébelleux pourraient jouer un rôle dans la nociception (Strick, 2009). Sur une base molaire, il apparaît que le lanthane a un effet antalgique plus puissant que celui de la morphine (Evans, 1990). Nous avons noté que quelques rats du groupe gadodiamide manquaient de réactivité au pincement de la patte, dans le test d'Irwin. Il a donc été décidé de tester la sensibilité des animaux, à l'aide du test de Von Frey. Des filaments de diamètre croissants sont appliqués sous les pattes postérieures, et le seuil de sensibilité est déterminé par un retrait franc de la patte. Ce test étant effectué manuellement, la force appliquée et l'emplacement sur la patte ne sont pas toujours identiques entre les essais et entre les opérateurs. Nous avons donc répété le test, par 3 opérateurs différents. Les variations en termes de seuil de sensibilité sont importantes, mais, pour les 3 opérateurs, on note que quelques rats des groupes gadodiamide et gadotérate semblent effectivement moins réactifs aux filaments, signant un seuil de sensibilité plus élevé.

Les bulbes olfactifs étant, dans nos conditions expérimentales mais aussi dans un autre modèle, chez la Souris (Kartamihardja, 2016b) une structure principale d'accumulation de Gd chez les rongeurs traités par le gadodiamide, un test d'olfaction a également été inclus, afin de renseigner une potentielle perte d'odorat. Le contrôle de l'intérêt du Rat pour une friandise en surface permettait de valider l'essai, tandis qu'il devait en trouver deux autres enfouies sous la litière. De nouveaux, quelques rats du groupe gadodiamide se sont distingués des groupes témoin et gadotérate, en ne trouvant aucune friandise. Les animaux y étaient pourtant habitués sur les différents tests comportementaux. Il est donc possible que le Gd accumulé après injection répétée de gadodiamide ait un effet sur l'odorat.

#### 4. Conclusion des études neuro-comportementales

Obtenir une bonne coopération des rats sur les tests la nécessitant (par exemple, elle n'est pas nécessaire pour le test de l'openfield) est difficile. Une grande variabilité interindividuelle a été notée sur de nombreux tests, y compris parmi les animaux témoins. Il est donc difficile d'affirmer avec certitude un effet sur un quelconque paramètre. Il aurait été préférable de réaliser la batterie de test une première fois en amont des injections, afin de pouvoir comparer les effets des produits étudiés de façon « longitudinale », ce qui aurait permis de conclure avec plus de certitude. Nous avons cependant noté des « tendances », dans nos conditions expérimentales, qu'il faudrait confirmer par ailleurs, un meilleur entraînement des animaux, et des effectifs plus importants afin d'augmenter la puissance statistique. Ces tendances concernent une baisse d'activité (qui semblerait expliquée par une durée d'immobilité augmentée), puis l'anxiété, difficile-



ment dissociable de l'activité. La diminution d'activité peut s'expliquer de deux façons : soit un ralentissement constant pouvant, par exemple, s'expliquer par des troubles locomoteurs, soit une augmentation des périodes d'inactivité totale pouvant s'expliquer par des troubles cognitifs (épisodes de peur, chute de la motivation, anomalie de la prise de décision ou encore « confusion mentale »). Sur l'apprentissage et les différents types de mémoire, aucune alerte n'a été notée. Au niveau coordination motrice, des difficultés ont été notées pour le gadodiamide sur deux des quatre tests effectués. Enfin, une petite modification de la sensibilité pour le gadotérate et le gadodiamide, et de l'odorat pour le gadodiamide, ont été observées.

Si les effets notés étaient avérés, ils ne nous semblent pas alarmants, puisqu'aucun n'a été réellement franc. Les effets n'ont concerné que quelques animaux par groupe et les doses injectées représentaient l'équivalent de 60 ou de 80 doses cliniques, selon l'étude. Les concentrations accumulées dans le SNC du gadotérate sont nettement plus faibles que celles pour le gadodiamide, pourtant certains effets (intermédiaires) apparaissent également chez ces animaux. Cet effet pourrait éventuellement s'expliquer par les conséquences à long terme des effets immédiats de l'hyperosmolalité du produit (Speck, 1988). La charge osmotique devenant ici notable puisque le produit était injecté à une forte dose. L'osmolalité du gadotérate est par ailleurs double de celle du gadodiamide (1350 vs. 789 mOsm/kg H<sub>2</sub>O) (Port, 2008). Cela étant, dans cette hypothèse, dans le groupe gadodiamide, une part peut également être attribuée aux concentrations de Gd retenues dans les structures cérébrales. Un groupe témoin recevant du sérum physiologique hyperosmolaire aurait pu être inclus. L'osmolalité modifie en effet sur la volémie, et peut avoir pour effet une dilution transitoire de la concentration de certains solutés. Certains tests ont été réalisés à deux délais différents. Il est difficile de conclure sur un effet lié au temps. En effet, la chronologie des quelques effets (souvent modestes) observés ne permet aucune interprétation en termes de concentrations ou de spéciation du Gd, dont on sait qu'elles diminuent et évoluent au cours du temps (Robert, 2018a).

## 5. Autres études comportementales réalisées chez le Rongeur adulte

Très peu d'études comportementales ont été communiquées à ce jour. Chez le Rat adulte, un poster a été présenté par les laboratoires Bayer (Habermeyer, 2018). Il s'agissait d'une étude comparative gadobutrol (macrocyclique) vs. gadodiamide, étudiés à différentes doses cumulées (4,8 – 9,6 – 14,4 mmolGd/kg), administrées en 8 injections. Ces doses sont donc bien plus faibles que celles que nous avons testées. Alors qu'aucun effet n'a été mis en évidence sur l'openfield, le catwalk, le rotarod, ou le conditionnement opérant, ces auteurs rapportent une diminution du réflexe sensorimoteur dans la réponse au sursaut acoustique (« acoustic startle response »), transitoire et dose-dépendante pour le gadodiamide et pas avec le chélate macrocyclique gadobutrol. Les circuits neuronaux concernés impliquent, en plus des interneurons et neurones moteurs médullaires, le noyau cochléaire et le noyau réticulaire caudal du pont. Cette dernière structure est également impliquée dans l'inhibition par un pré-stimulus, pour lequel l'étude n'a cependant relevé aucun effet. L'inhibition par pré-stimulus est surtout décrite dans la schizophrénie, dans laquelle elle est réduite (Giakoumaki, 2012). Il est difficile d'interpréter ces résultats, dans le cadre de notre thématique. Selon les auteurs, l'effet peut être périphérique plus que central.

## 6. Administration à une population juvénile

Une étude comportementale a été réalisée en interne et publiée, chez des rats ayant reçu des administrations répétées de gadotérate ou de gadodiamide alors qu'ils étaient encore juvéniles (de 12 à 50 jours d'âge) (Fretellier, 2019). Cette étude a été menée afin de rechercher si la population pédiatrique était plus





à risque que les adultes, dans des conditions d'administration identiques. En effet, l'examen radiologique par IRM est largement répandu en pédiatrie, et fait appel aux mêmes produits de contraste que chez les adultes et aux mêmes posologies (0,1 mmolGd/kg). On peut s'interroger sur la sensibilité de la population juvénile à la capture cérébrale de Gd, puisque les fonctions rénale et neurologiques de ces patients peuvent être encore immatures (Beck, 2006 ; De Schaepdrijver, 2013). Les modalités d'absorption, distribution et élimination des molécules exogènes, peuvent en être influencées et par là-même le profil de tolérance aux xénobiotiques tels que les chélates de Gd.

Alors que les concentrations cérébrales de Gd se sont révélées inchangées par rapport à une population adulte traitée dans les mêmes conditions, des signes de diminution du seuil d'anxiété ont été notés pour le groupe gadodiamide, sur l'EPM et le balance beam (Fretellier, 2019). Cela rejoint donc nos observations. Rien de significatif n'a été noté avec le gadotérate dans cette étude.

## 7. Administrations chez la Souris gestante

Une dernière étude comportementale a été menée chez des souris issues d'une mère gestante ayant reçu 5 administrations de gadotérate ou gadodiamide en 5 jours (2 mmolGd/kg par injection, soit un peu plus d'une fois et demie la dose clinique, qui est de 1,2 mmolGd/kg chez la Souris), pendant la semaine correspondant à 15-19 jours embryonnaires (Khairinisa, 2018). Cette étude comportementale a été réalisée chez les animaux ayant atteint l'âge adulte (début à la 10<sup>e</sup> semaine de vie). Cette équipe a mis en évidence une anxiété chez les souris dont les mères avaient reçues le gadodiamide ; une diminution de la distance parcourue chez les femelles uniquement ; ainsi que des déficits de coordination motrice sur le rotarod, pour les animaux des groupes gadodiamide et gadotérate. Ces trois observations sont cohérentes avec les nôtres. Cependant, ces travaux ont aussi mis en évidence une altération de la mémoire spatiale pour les deux groupes et de reconnaissance pour tous sauf pour les souris mâles du groupe gadotérate. La force musculaire était diminuée pour tous les groupes sauf les femelles du groupe gadotérate. De plus, au contraire de nos observations, une augmentation de la sensibilité a été notée sur le test de Von Frey. Il faut rappeler qu'ici, les animaux n'ont pas été directement traités et qu'il s'est agi d'étudier les conséquences du traitement des mères. Les effets comportementaux observés sont attribués à une interaction des chélates de Gd avec les processus de développement des circuits neuronaux, pour lesquelles la période pendant laquelle les administrations ont été réalisées était critique. Il est intéressant de noter que l'exposition dans l'eau de boisson de rattes gestantes au chlorure de lanthane induit des troubles cognitifs dont une perturbation de la mémoire spatiale (test de la piscine de Morris) (He, 2008 ; Zheng, 2013). Là encore, les questions étudiées sont éloignées des nôtres.

Concernant les concentrations cérébrales de Gd total, dosées dans le SNC au 28<sup>e</sup> jour de vie, de nettes différences entre les groupes gadotérate et gadodiamide ont été rapportées. Cependant, un net effet lié au sexe a été observé. Ainsi, le rapport de concentrations de 25,4 entre les mâles des deux groupes, est réduit à 12 chez les femelles. Sur un modèle similaire, de 4 injections de 2 mmol Gd/kg chez des souris gestantes à 16-19 jours embryonnaires, le rapport de concentration de Gd cérébral chez les petits âgés de 28 jours (deux sexes confondus) était de 7 entre gadotérate et gadodiamide (Erdene, 2016).

Les recommandations en ce qui concerne l'injection de femmes gestantes ont toujours privilégié une précaution supplémentaire, avec l'évaluation consciencieuse du rapport bénéfice/risque (recommandations ESUR, 2018). Cependant, il y a une dizaine d'années aux Etats-Unis, 33% des centres de radiologie administraient des chélates de Gd chez des femmes enceintes et qu'un tiers de ces centres ne réalisaient



l'injection qu'au cours du troisième trimestre de grossesse (les deux premiers étant jugés plus critiques) (Jaffe, 2007 ; Sungren, 2009).

Le passage trans-placentaire moléculaire, par diffusion à travers l'épithélium chorionique uniquement, est plus facile pour les lipides et les molécules de moins de 100 Da. La traversée des chélates de Gd paraît donc peu probable (Webb, 2005). Cependant, il est admis que le Gd passe la barrière placentaire pour intégrer la circulation sanguine et être filtré par les reins de l'embryon, avant d'être donc excrété dans le liquide amniotique (Shellock et Kanal, 1999 ; Jung, 2001). Le chélate de Gd injecté à la mère permettrait même l'imagerie du placenta (Marcos, 1997 ; Taillieu, 2006). La réabsorption par l'embryon continue ensuite par voie orale à partir du liquide amniotique, en quelque sorte comme dans le cas de la lactation, en parallèle de la réabsorption maternelle.

Bien que la concentration de Gd placentaire atteigne 18 à 30% de la dose injectée chez la mère, on ne retrouvait que 0,01% dans l'embryon 4h après (étude chez le Rat), (Okazaki, 1996). Chez la Souris gestante, un pic de concentration fœtale de Gd correspondant à 0,077% de la dose injectée a été mesuré au délai 30 minutes. La distribution du chélate de Gd dans le liquide amniotique suit un modèle mono-compartmental. On observe ensuite une redistribution du chélate de Gd vers la mère (Mühler, 2011). Une étude réalisée chez le Primate non humain, où le chélate de Gd (le gadotéridol) était administré pendant le 3<sup>e</sup> trimestre, a confirmé la très faible concentration de Gd dans les tissus fœtaux et le liquide amniotique (Oh, 2015). Les récentes études de 4 ou 5 injections de 2mmol/kg chez la souris rapportaient 73,5 et 337 ngGd/g cerveau chez les petits un mois après, soit environ 0,5 et 2 nmol/g (Erdene, 2016 ; Khairinisa, 2018). Jusqu'à récemment, il était admis qu'aucun effet n'avait été noté sur la croissance ou le développement d'enfants dont la mère aurait été injectée pendant sa grossesse (Sundgren, 2011). Il semblerait que la grossesse ait pour effet une moindre sensibilisation des futures mères à la capture de Gd (étude chez la Souris) (concentrations tissulaires de Gd inférieures à celles de souris non gravides) (Erdene, 2016). Les auteurs avancent que cela pourrait s'expliquer par une augmentation du débit de filtration glomérulaire et du flux sanguin rénal chez les mères gestantes.

## 8. Atteinte neurologique consécutive à l'injection de chélates de Gd

Quelques études rapportant des signes neurologiques ou des troubles comportementaux ont été rapportées. Elles concernent plutôt des effets aigus et réversibles.

Par exemple, les effets de l'injection de gadopentétate dans le ventricule latéral ont été étudiés chez le Rat, à des volumes allant de 10 à 60 µL (Ray, 1996). Des troubles neurologiques (déplacements circulaires, contractions myocloniques) se sont manifestés à partir de 20 µL injectés. Au-delà de cette dose, les animaux ont manifesté des troubles ataxiques, des tremblements musculaires, ainsi que des stéréotypies de type reniflement et morsure.

Dans une autre étude (Adams, 1993), une perte de la force d'agrippement, une incoordination motrice et une parésie des membres postérieurs ont été observées pour une dose de 150 µmol Gd/kg de gadopentétate, soit environ 60 µL injectés.

Les auteurs soulignent cependant que dans le cas d'une injection intraveineuse à la dose clinique, même en cas d'altération de la BHE, les concentrations de Gd susceptibles d'accéder au parenchyme cérébral n'atteindraient pas le quart de la plus faible dose testée dans leurs études. Cela permet cependant de documenter les effets neurotoxiques aigus des chélates de Gd pouvant survenir s'ils atteignent le LCR. En effet, selon Ray et collaborateurs, le cerveau du Rat pèse environ 2g et si l'on considère que le volume de



LCR est de 300  $\mu\text{L}$ , l'injection de 10 à 60  $\mu\text{L}$  revient à administrer 2,5 à 15  $\mu\text{mol Gd/g}$  de cerveau, soit 16 à 96  $\text{mmolGd/L}$  de LCR. Rappelons que des patients (Nehra, 2018), 6,4  $\text{nmolGd/mL}$  de LCR avaient été mesurés en moyenne pour les concentrations les plus élevées (aux délais les plus précoces), soit 6,4  $\text{mmolGd/L}$  de LCR.

Cependant, des cas d'effets neurotoxiques consécutifs à une injection unique de chélate de Gd directement dans le liquide céphalorachidien chez l'Homme ont fois été rapportées, associés à des troubles neurologiques et cognitifs (Arlt, 2007 ; Kapoor, 2010 ; Turk 2017).

De plus, ce phénomène a également été rapporté chez des patients insuffisants rénaux (donc plus sensibilisés à la capture de Gd), injectés par voie intraveineuse (Rai et al, 2001 ; Maramattom et al, 2005 ; Hui et Mullins, 2009). Hui et Mullins ont déterminé la concentration de Gd dans le LCR à seulement 23  $\mu\text{mol/L}$  (à un délai non précisé). Dans ces cas, la dialyse a permis une élimination plus rapide du produit et un retour à un état clinique neurologique normal.

## 9. Analyse des signes cliniques chez l'Homme

Les symptômes des patients leur association ou non avec l'historique d'injections de chélate de Gd ont fait l'objet de quelques études rétrospectives. Cependant, les patients ayant reçus de nombreuses injections présentent généralement une pathologie neurologique sous-jacente et il est difficile de savoir à quoi attribuer les signes cliniques ou leur aggravation.

Les troubles neurologiques cérébelleux de 10 patients ayant reçus plus de 20 injections de gadotérate (28 en moyenne), souvent pour des métastases ou tumeurs cérébrales primaires, ont fait l'objet d'une analyse détaillée (Perrotta, 2017). L'ensemble des symptômes et signes cérébelleux répertoriés sont attribuables aux pathologies des patients, et non aux injections répétées de gadotérate.

Une autre étude a étudié l'association entre l'historique d'administrations de chélates de Gd de 23 patients atteints de sclérose en plaque et les résultats d'une série de tests neuropsychologiques (Forslin, 2017). Après correction des différents aspects associés à la sévérité de la pathologie, un lien significatif a quand même été établi entre les rehaussements de signal T1 du noyau dentelé, et une baisse de la fluidité verbale. Tous les patients avaient reçu du gadodiamide et du gadopentétate et 6 avaient reçu également une injection de gadotérate. Cependant, les auteurs soulignent qu'il est délicat de distinguer les effets cliniques causés par la progression de la maladie, qui est hétérogène, de ce qui ne l'est pas. Ces résultats doivent être interprétés avec précaution (Forslin, 2017).

Puisque le Gd s'accumule notamment dans le *globus pallidus*, la présence de signes parkinsoniens a été recherchée chez des patients ayant reçus des chélates de Gd. Aucune association n'a été notée. Une limite de cette étude est cependant le faible nombre de patients ayant reçu au moins 4 administrations de chélates de Gd. La nature de ces derniers était inconnue (Welk, 2016).

Une pathologie, la « Gadolinium Deposition Disease », ou GDD, a été décrite par certains auteurs (Semelka, 2016a). Cette pathologie est caractérisée par la survenue, chez le patient à la fonction rénale saine, de symptômes dans les 2 mois suivant l'injection d'un chélate de Gd, sans autre explication étiologique. Outre certains de ces signes qui s'apparentent à la symptomatologie de la FSN, mais avec une manifestation moins sévère (douleurs et osseuses et articulaires, atteintes dermatologiques), les patients décrivent des troubles de l'équilibre, ainsi qu'une désorientation mentale, un « brain fog, clouded mentation » (Burke, 2016 ; Semelka, 2016b). De plus, des céphalées, des troubles de la vision et de l'audition sont rapportés (Burke, 2016). Une étude clinique prospective affirme que l'apparition de symptômes 24h après un



examen IRM est plus fréquente chez des patients ayant été injectés (Parillo, 2018). Parmi les troubles qui seraient significativement associés à l'administration de chélates de Gd, on trouve là aussi une fatigue et une confusion mentale. Il est intéressant de noter que chez des patients sans insuffisance rénale, la présence de Gd soit documentée dans leurs urines, plusieurs mois après administration de chélate de Gd (excrétion, en 24 heures, 2 mois après une administration unique de gadopentetate : 18 µg (soit ~115 nmol) de Gd ; 4 mois après 4 administrations en 60 jours : 82 µg (soit ~520 nmol) de Gd (Semelka, 2016c). La distinction entre linéaires et macrocycliques est rarement étudiée dans ces études. La qualité méthodologique de ces travaux a néanmoins été critiquée (faible nombre de patients et orientation de la recherche vers des effets envisagés *a priori*) (Nachtigall, 2019).

## B. Approches non comportementales de la neurotoxicité

L'analyse histologique des tissus est indispensable dans toute étude toxicologique. L'étude de marqueurs simples est une première approche. Nous avons ainsi réalisés des marquages hématoxyline-éosine ou crésyl violet-luxol fast blue, de coupes cérébelleuses au niveau des noyaux cérébelleux profonds, mais aussi de coupes du télencéphale dans la deuxième étude, associées à des mesures histomorphométriques. Cette étude réalisée 4 mois après injection de 50 mmolGd/kg de gadotérate ou gadodiamide, incluait le striatum, l'amygdale, le thalamus et le cervelet. La méthodologie des mesures morphométriques concernant les repères, coupes et angles à considérer était réalisée selon les recommandations de la littérature (Bolon, 2006; Garman, 2016). Aucune anomalie (présence de lésions ou différences de taille par rapport aux témoins) n'a été mise en évidence sur ces structures d'intérêt, tant pour le gadodiamide que pour le gadotérate.

Les marqueurs classiques d'activation de la microglie (CD68), ou de la macroglie (GFAP) ont également été étudiés. Une activation de ces populations cellulaires est en effet classiquement observée lors de lésions ou d'inflammations du SNC (O'Collaghan, 1991 ; Peres 2015; Glushakova, 2012; Garman, 2011 ; López-Pedrajas, 2015). Cependant, là encore, aucun effet n'a été noté pour le gadodiamide à la dose de 36 mmolGd/kg cumulés comparé au groupe témoin.

En microscopie électronique, la présence de Gd avait été documentée dans des pigments de lipofuscine situés dans des cellules gliales. Un marquage de la lipofuscine, en autofluorescence, a ainsi été étudié chez les rats traités par le gadodiamide à la dose cumulée de 36 mmolGd/kg. On pouvait en effet imaginer que la formation de lipofuscine puisse être promue comme mécanisme protecteur en réponse à une présence anormale de métaux tels que le Gd, même si seule une très faible proportion de pigments contenait du Gd. La formation de lipofuscine pourrait aussi être augmentée en cas de stress oxydatif (Brunk, 2002). L'analyse de ce pigment n'a cependant pas révélé de différences avec le groupe témoin.

Des neurones dégénérants, de couleur sombre, remplis de mitochondries, avaient également été observés en microscopie électronique. L'étude en coloration hématoxyline-éosine n'a pas fait apparaître de différence dans leur nombre pour le gadodiamide par rapport aux témoins. De plus, il est possible que ces neurones soient un artéfact de préparation, l'initiation de leur dégénérescence survenant pendant l'exanguinopérfusion qui précède immédiatement le prélèvement des tissus.

Suite à des injections répétées de chélates de Gd, aucun effet visible à l'examen histologique n'a été rapporté à ce jour tant en préclinique (Lorhke, 2017 ; McDonald, 2017b ; Smith 2017 ; Fretellier, 2019), que dans les études cliniques (McDonald, 2015 ; McDonald, 2017a ; Fingerhut, 2018b). Les marqueurs testés sont cependant toujours très classiques. D'autres marqueurs plus spécifiques mériteraient peut-être une analyse dédiée, tels ceux concernant l'activation de la microglie (« Transmembrane protein 119 » ou



TMEM119) (Bennett, 2016), ou Sox14, qui serait spécifique des projections neuronales inhibitrices de certains des noyaux cérébelleux profonds (Prekop, 2018).

Nos études histopathologiques n'ont pas révélé la présence d'une cytotoxicité particulière *ex vivo*. Pourtant, la cytotoxicité du Gd ou des chélates de Gd est bien connue. Ainsi, une étude *in vitro* a mis en évidence une diminution de 20% de la viabilité de cellules tumorales quand 2 mmolGd/L de gadodiamide étaient ajoutés au milieu de culture, et environ 60% quand la concentration était de 10 mmolGd/L (Cabella, 2006). En présence de gadotéridol (agent macrocyclique), cependant, la viabilité de ces cellules était nettement moins altérée pour une même concentration de 10 mmolGd/L. En présence de GdCl<sub>3</sub> à la concentration de seulement 0,05 mmol/L, la viabilité a diminué de 20 à 60% selon la lignée cellulaire. La mortalité cellulaire induite par le chélate de Gd linéaire pourrait être attribuée à la faible proportion de Gd sous forme déchélatée (Cabella, 2006). Les concentrations de Gd retrouvées en clinique dans le LCR sont cependant bien plus faibles que celles testées ici.

Une autre étude *in vitro* a montré qu'à partir d'1 mmolGd/L de gadopentétate, le nombre et la taille des neurites diminuent. Cependant, le nombre de noyaux et l'intégrité membranaire semblent être maintenus pour des concentrations de ce produit de 10 mmolGd/L (Bertin, 2010).

Sur un modèle *in vivo*, une analyse histologique, menée 24h après injection intrathécale de gadodiamide, a révélé la présence de lésions (nécrose gliale, perte de myéline, diminution du nombre de neurones) au niveau du thalamus à partir de 20 µL injectés (soit environ 32 mmolGd/L de LCR), puis par ordre d'incidence, dans le noyau olivaire supérieur, la moelle épinière, le bulbe rachidien, et l'hypothalamus (noyau ventrolatéral) (Ray, 1996). Aucune altération des vaisseaux, de la BHE ou des plexus choroïdes, n'a été notée.

Les grandes voies impliquant le globus pallidus et les DCN étant principalement GABAergiques, nous avons étudié la présence en immunomarquage, de la glutamate décarboxylase (GAD), l'enzyme qui synthétise le GABA à partir du glutamate. Deux iso-enzymes ont été marquées, la GAD67 et la GAD65. La première est constitutive, et responsable de 90% de la synthèse du GABA. Elle est présente dans les corps cellulaires des neurones et cellules gliales, notamment du globus pallidus, du cortex cérébelleux et des DCN (Jiang, 2011 ; Mitoma, 2017 ; Esclapez, 1994). La GAD65, quant à elle, est produite en complément, en cas de besoin et a plutôt un rôle de facilitation de la libération du GABA. Elle est localisée dans les vésicules des boutons synaptiques, notamment au niveau des DCN dans les projections axonales des cellules de Purkinje (Esclapez, 1994). De plus, d'anciens travaux ont signalé une inhibition de l'activité de la GAD par le Gd ionique, les ligands DTPA, EDTA et DOTA, et à des concentrations plus élevées, par des chélates de Gd. Ce phénomène serait la conséquence d'une compétition entre le Gd et le Ca qui est un modulateur de l'activité de cette enzyme (Gold, 1983 ; Allard, 1986). Nous pouvions donc nous attendre à une altération de l'activité de la GAD ou des concentrations de GABA. Cependant, aucune différence significative n'a été trouvée entre les groupes témoins, gadodiamide et gadotérate, tous deux étudiés à la dose cumulée de 50 mmolGd /kg. Il aurait été judicieux d'en étudier l'activité. De plus, le dosage de GABA a été réalisé. Dans la première étude, il n'a pas été possible de détecter la présence de GABA circulant quel que soit le délai de mesure. Dans la deuxième étude, ces mesures ont été réitérées sur des broyats de cortex cérébelleux. La détection de GABA s'est alors révélée possible, mais aucune différence de concentrations de GABA tissulaire n'a été observée pour les 3 groupes étudiés (témoin, gadodiamide et gadotérate, 50 mmolGd/kg).

Outre le GABA, nous avons étudié d'autres marqueurs neurochimiques.

L'étude de marqueurs tissulaires de souffrance neurologique a ainsi été réalisée par microdialyse des DCN chez le Rat. La procédure au niveau des noyaux cérébelleux profonds est compliquée



puisque un sinus veineux se situe juste au-dessus, ce qui complique l'implantation du guide. Plus de deux tiers des sondes ont été correctement placées. Une approche par IRM n'était pas possible car les guides n'étaient pas amagnétiques. Un délai de 48h entre l'implantation du guide et la perfusion a été respecté, afin de permettre la cicatrisation des tissus (Zapata, 2009). Beaucoup de mesures effectuées dans les dialysats ont donné des concentrations des marqueurs inférieures à la limite de quantification, et ont été extrapolées. L'introduction de la sonde dans le parenchyme cérébral pouvant perturber transitoirement l'homéostasie locale, il est classiquement recommandé de définir le niveau basal des concentrations d'analytes par mesure simultanée, et d'attendre leur stabilisation avant de collecter les fractions de dialysat (Zapata, 2009). Ne pouvant doser les analytes pendant la procédure, nous avons choisi de jeter les dialysats de la première heure. En effet, la durée de stabilisation serait de l'ordre d'une heure (Zapata, 2009). Nous avons ensuite réalisé 3 collectes de 20 mn chacune, sur lesquelles nous avons effectué les dosages. Il est recommandé chez l'Homme d'utiliser un débit de perfusion de 0,3  $\mu\text{L}/\text{mn}$ . Le rendement d'extraction serait proche de 100% pour un débit de 0,1  $\mu\text{L}/\text{mn}$  (Menacherry, 1992). Dans nos conditions, l'extraction des petites molécules est estimée être entre 10 et 40% (Nandi, 2009). Les valeurs du groupe témoin ont été assez dispersées, mais une diminution significative des concentrations de lactate, de pyruvate et de glucose a été observée. Il est cohérent que ces trois facteurs varient ensemble et dans le même sens. Cette tendance (voir le chapitre III.3 « Méthodes ») serait en effet le reflet d'une diminution du métabolisme énergétique, plus particulièrement de la glycolyse. Il a été suggéré dans une étude clinique, que l'accumulation de  $^{18}\text{F}$ -FDG (fluorodésoxyglucose, un analogue du glucose, reflétant son métabolisme) est plus faible chez des patients ayant reçus 1 à 4 administrations d'agent de contraste, en comparaison à des patients n'en ayant jamais reçues (Bauer, 2017). Cependant, la méthodologie de cette étude a été discutée (Naganawa, 2017). Une autre équipe a étudié le métabolisme cérébral du glucose chez le Rat ayant reçu des administrations répétées de gadodiamide. Cette étude incluait des animaux avec une hypoperfusion associée à une altération de la BHE. Dans ces conditions, les concentrations de Gd accumulé étaient logiquement plus élevées qu'en l'absence d'hypoperfusion et de lésion de la BHE. Néanmoins, le métabolisme cérébral du glucose n'a jamais été altéré (Arena, 2018). En 2000, des conclusions similaires concernant le gadobénate, administré localement dans le striatum de rats vigiles (La Noce, 2000). Une limite de notre étude est l'extrapolation des concentrations inférieures à la limite de quantification.

Nous avons également tenté de doser le Gd dans les dialysats, afin de rechercher si cette technique peut être une méthode d'extraction du Gd localement accumulé, en vue d'en déterminer sa forme (études de spéciation). Malheureusement, les concentrations de Gd mesurées ont été inférieures à la limite de quantification, dans tous nos échantillons.

Par ailleurs, nous nous sommes aussi intéressés à l'enzyme UCHL-1 (« ubiquitin C-terminal hydrolase 1 »), un marqueur de neurotoxicité dont l'augmentation témoigne d'un dommage du corps cellulaire des neurones (Roberts, 2015; Glushakova, 2012; Kochanek, 2013). Les concentrations tissulaires (broyat de cortex cérébelleux) d'UCHL-1 ne sont pas modifiées, tant par le gadotérate que par le gadodiamide.

La spectroscopie RMN permet une approche sensible des altérations des voies métaboliques du SNC, autorisant la détection précoce ou la caractérisation de pathologies neurologiques (Megyesi, 1988). Cette technique a été appliquée à l'étude des DCN lors de la première étude, à un champ magnétique de 11,7 T. Seule une diminution significative du signal absolu de l'eau (d'environ 10%) a été observée dans le groupe gadodiamide, ce qui pourrait être la conséquence de l'accumulation de Gd. Cet effet pourrait être lié à la





diminution du temps de relaxation T2 avec le gadodiamide au niveau des noyaux cérébelleux profonds. Une autre étude de spectroscopie avait été réalisée à travers une collaboration initiée en interne, à un champ de 7 T. L'analyse consistait en un suivi temporel (post-injections, 1 mois après et 13 mois après), suite à l'administration de 12 mmolGd/kg cumulés. Aucun effet significatif n'avait été observé (résultats disponibles dans la thèse de El Hamrani, 2018).

Une étude préliminaire d'IRM fonctionnelle au repos réalisée en clinique a été communiquée en 2017 (Quattrocchi, 2017) lors du congrès « Contrast Media Research ». Il s'agissait d'une cartographie des régions cérébrales selon les fluctuations spontanées du signal BOLD (Blood Oxygen Level Dependant) au niveau des noyaux dentelés et des ganglions de la base de patients atteints de la maladie de Crohn et ayant reçu plus de 4 injections de gadodiamide, comparés à des individus sains. Les conclusions étaient que la pathologie diminuait la connectivité cérébelleuse avec les zones motrices et pré-motrices, mais qu'il y avait, chez les patients ayant reçu le gadodiamide, une compensation de la connectivité. Néanmoins, cette étude souffre d'un faible nombre de patients. Une autre équipe, sur une plus grande cohorte, a noté une moindre connectivité du système hippocampo-limbique sans que le lien avec les chélates de Gd ne soit mentionné (Bao, 2018). Les patients atteints de la maladie de Crohn recevant des injections de chélates de Gd régulièrement et quasi-systématiquement, il est difficile de dissocier ce qui est attribuable à la pathologie de ce qui est attribuable au Gd accumulé dans le SNC. Des études comparant les patients injectés de chélates de Gd linéaires à ceux injectés d'agents macrocycliques seraient bien entendu intéressantes, si les cohortes sont de taille suffisante.

A notre connaissance, aucune de ces approches (neurochimie, spectroRMN, microdialyse) n'a été publiée à ce jour.

Alors que l'EMA a pris la décision en fin d'année 2017 de retirer l'autorisation des agents linéaires pour une indication non-spécifique (EMA, 2017), les autorités de santé américaines (FDA) ont demandé aux industries pharmaceutiques détentrices de l'autorisation de mise sur le marché de chélates de Gd, des études de pharmacovigilance supplémentaires (FDA, 2018). Il s'agit d'études concernant l'exposition des populations pédiatriques et néonatales, demandées chez la Souris (exposition prénatale et postnatale précoce, en deux études distinctes) et le Primate non-humain juvénile. Elles devront permettre l'étude fine du comportement, l'évaluation neurologique et histopathologique (pendant le développement et une fois adulte), ainsi que le dosage des concentrations de Gd retenu dans le cerveau et les autres organes. De plus, une étude clinique prospective est attendue, avec une évaluation systémique et neurologique des patients (comportementale et autres tests biochimiques et cliniques), ainsi que la collecte de sang et d'urine pour décrire l'élimination du Gd.

En conclusion, nos études, réalisées avec des doses élevées de chélates de Gd et qui ont balayé un large spectre d'approches, n'ont pas présenté, ou très peu, de signes de neurotoxicité. De plus, les quelques effets observés ont été peu spécifiques, tant pour le gadodiamide que pour le gadotérate.



## DISCUSSION GENERALE

### La capture cérébrale de Gd, nouveau choc pour la communauté radiologique, nouveau positionnement pour les autorités de santé

La corrélation entre l'observation d'hypersignaux T1 cérébraux lors d'examens IRM non injectés, et le nombre d'administrations de chélates de Gd (Kanda, 2014) a constitué un nouveau choc dans la communauté de la radiologie. Ce phénomène a, en effet, été rapporté seulement quelques années après la retombée de la crise de la fibrose systémique néphrogénique. Les autorités de santé, après consultation des laboratoires fabricants et de groupes d'experts, ont pris des décisions fin 2017. Il ressort cependant que l'opinion diffère selon le continent. L'apport d'arguments scientifiques en faveur des agents de contraste macrocycliques, au fil des années, et essentiellement leur absence de déchélation *in vivo* est souligné par les experts européens. De plus, ces derniers rappellent que les chélates de Gd n'ont pas été conçus pour se dissocier dans l'organisme et libérer un métal potentiellement toxique (Radbruch, 2017). Au contraire, les autorités de santé des USA estiment que l'intensité du signal ne reflète qu'imparfaitement la concentration de Gd accumulé et qu'aucune toxicité clinique n'est avérée à ce jour (Gulani, 2017). Ainsi, les points de vue divergent nettement entre la FDA aux USA, et l'EMA en Europe. L'agence européenne EMA a considéré que le rapport bénéfice/risque des agents linéaires était insuffisant, ceux-ci ont été retirés du marché européen fin 2017 (à l'exception du gadobénate pour ses indications hépatiques et du gadopentétate par voie intra-articulaire, l'indication hépatique du gadoxétate n'étant pas modifiée) (EMA, 2017). Ce principe de précaution n'est, en revanche, pas partagé par les autorités américaines. Ces dernières, tout en reconnaissant que les agents linéaires induisent un dépôt tissulaire de Gd supérieur à celui des agents macrocycliques, demandent aux prescripteurs de tenir compte de ces caractéristiques lors du choix du produit de contraste chez les patients à risque (statut inflammatoire ; administrations devant être fréquemment répétées ; femmes enceintes ; enfants). Cependant, elles estiment aussi que tant que la preuve de conséquences neurologiques de l'accumulation de Gd n'est pas apportée, les chélates linéaires de Gd peuvent continuer à être utilisés (FDA, 2018). De nouvelles études (précliniques : évaluation péri- et post-natale de la tolérance chez le Souris, tolérance chez le Souris juvénile, étude chez le Primate non humain ; et clinique : étude prospective vs. bras témoin, avec suivi neurologique et biochimique et dosage de Gd sanguin et urinaire chez des patients recevant au moins 5 administrations de produit) sont aussi exigées par la FDA auprès des détenteurs des autorisations de mise sur le marché. Au Japon, les autorités sanitaires (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, PMDA) ont décidé de restreindre l'usage des chélates de Gd linéaires en deuxième intention, si le prescripteur estime l'administration d'un chélate de Gd macrocyclique n'est pas souhaitable pour des raisons d'hypersensibilité avérée (PMDA, 2017). Une diminution drastique de l'utilisation des agents linéaires a suivi la publication des premiers articles sur cette capture cérébrale de Gd, même avant la publication des exigences des autorités sanitaires. Ainsi, au Japon, l'utilisation d'agents linéaires est passée de 65% en 2017 à 25% en 2016 (Mugikura, 2017). Les patients se sont également très vite approprié ce sujet, en s'exprimant à travers des associations et groupes sur les réseaux sociaux, relayant des informations, parfois peu validées. Le consensus et l'apaisement autour du sujet ne semblent pas encore d'actualité.



## Quelles sont les conséquences neurotoxicologiques de l'accumulation cérébrale des chélates de Gd ?

Il existe des raisons théoriques de suspecter une toxicité neurologique associée à l'accumulation de Gd dans le noyau dentelé. Ce dernier présente la caractéristique d'accumuler aisément des métaux comme le fer et que la survenue de troubles moteurs dans la maladie de Parkinson serait associée à la capture de ce métal (He, 2017). On sait aussi que l'ataxie de Friedreich s'accompagne d'anomalies dans les proportions et l'activité de la ferritine, de la ferroportine et du DMT-1 au niveau du noyau dentelé (Koeppen, 2007). De plus, l'existence de boucles anatomiques nucléo-corticales cérébelleuses, la survenue d'une toxicité cérébelleuse en cas d'administration intracérébroventriculaire d'un chélate de Gd linéaire (Ray, 1996) et la présence de Gd dans le cortex cérébelleux (Lohrke, 2017) sont préoccupantes étant donné la grande sensibilité des cellules de Purkinje aux agents neurotoxiques (Manto, 2012b). Par ailleurs, il ne semble pas judicieux de s'intéresser au seul cervelet puisque la présence de Gd a été rapportée dans d'autres structures cérébrales (McDonald, 2015 ; Kanda, 2015a). Des cas d'encéphalopathie associés à un chélate de Gd ont été rapportés (Maramattom, 2005 ; Hui, 2009) mais ils sont cependant survenus dans un contexte très particulier (administration unique), différent des conditions qui nous intéressent ici.

Comme nous l'avons vu dans la discussion précédente, nous ne disposons que de très peu de données publiées permettant de conclure sur une éventuelle toxicité de l'accumulation cérébrale de Gd. Chez le Rat sain, dans nos conditions expérimentales, nous n'observons pas d'effets neurologiques et comportementaux nets, même après administration de fortes doses (à l'exception d'une hypoactivité). Chez l'Homme, les facteurs confondants, sources de biais, sont nombreux et la communauté scientifique manque de recul sur le phénomène. Nous savons que le Gd, sous forme de sel soluble ou chélaté, a une toxicité avérée sur des neurones ou des cellules gliales *in vitro*, dépendante de la concentration étudiée (Xia, 2010 ; Bertin, 2010). Elles ne sont peut-être pas atteintes dans la majorité des cas. Il n'existe cependant, à notre connaissance, aucun métal exogène qui s'accumulerait dans le système nerveux central sans avoir d'effet néfaste. On peut également s'interroger sur les effets potentiels d'interactions avec des substances cérébello-toxiques, comme le métronidazole, ou encore l'alcool (Manto, 2012b ; Manto et Perrota, 2018). La « balance » bénéfice/risque devrait dans tous les cas pencher vers une utilisation raisonnée et le recours à des agents macrocycliques.

Des cas d'une nouvelle pathologie, la « Gd deposition disease » ont été rapportés (Semelka, 2016b), et méritent une étude approfondie. De fait, la présence de biais dans leur analyse met en question l'existence même de cette pathologie (Nachtigall, 2019). Les liens entre apparition de symptômes de cette éventuelle pathologie et l'administration préalable de chélates de Gd, ainsi que leur catégorie (linéaire ou macrocyclique), est difficile à établir. Comme indiqué précédemment, la FDA a demandé aux industriels de mener des études cliniques prospectives à cet effet, chez des patients bénéficiant d'exams de routine (par exemple pour le screening de tumeurs du sein).

Certains auteurs suggèrent une « thérapie » par administration de chélateurs, comme cela peut être utilisé dans le cadre d'intoxication par certains métaux ou de pathologies neurodégénératives accompagnées d'une accumulation de métaux (Hider, 2011 ; Prybylski, 2016 ; Semelka, 2018). Cette approche est pertinente en préclinique du point de vue de la compréhension du mécanisme (Boyken, 2019), mais ces agents chélateurs n'étant pas spécifiques d'un tissu ou d'un métal, ils ont pour effet collatéral potentiel d'éliminer de nombreux cations endogènes indispensables (Fe, Cu, Zn, Mn...) et peuvent aussi provoquer des effets secondaires parfois sérieux (Angle, 1996 ; Flora, 2010) Ils sont essentiellement proposés dans le traitement d'intoxications aiguës à des métaux (arsenic, plomb, cadmium, mercure) (Sears, 2013). Leur capacité



de mobiliser les stocks intracellulaires de métaux sont souvent limitées (Flora, 2010). La solution ne semble pas suffisamment au point à ce jour pour être envisagée en pratique clinique (et ses indications ne sont pas non plus définies).

## Existe-t-il des populations à risque ?

Parmi les populations potentiellement à risque, figurent les nouveau-nés et jeunes enfants. Comme nous l'avons vu dans une étude préclinique réalisée au laboratoire, ils n'accumulent cependant pas plus de Gd que les adultes, après injections répétées, et ne semblent pas présenter de troubles du comportement (Fretellier, 2019). Il n'existe logiquement pas d'études cliniques prospectives comparant patients pédiatriques et adultes. Des hypersignaux cérébraux sont cependant rapportés dans de nombreux cas pédiatriques, et inquiètent la communauté radiologique et les parents. Cela a même amené certains radiologues à s'interroger sur l'utilité d'administrations répétées en cas de suspicion de certaines pathologies cérébrales en pédiatrie, si l'examen pré-contraste est normal (Dünger, 2018). Le recul n'est pas suffisant quant aux conséquences au long terme de cette présence intra-cérébrale de Gd, pouvant se manifester très tardivement. Cela fait donc l'objet de nouvelles demandes d'études de la part de la FDA, comme indiqué précédemment (FDA, 2018). En ce qui concerne l'exposition prénatale, elle semblerait affecter le développement cérébral du fœtus, aboutissant à des anomalies comportementales, chez la Souris (Khairinisa, 2018). Cependant, les administrations répétées chez la femme enceinte sont très rares. La FDA a tout de même demandé d'approfondir ce point également.

Les patients insuffisants rénaux, même modérés, sont comme nous l'avons vu, plus sujets à l'accumulation de Gd dans l'organisme, y compris dans le SNC (Publications 1 et 2 ; Cao, 2016 ; Kartamihardja, 2016a). La pertinence de l'administration répétée de chélates de Gd linéaires, là où ils restent autorisés, devrait faire l'objet d'une réflexion approfondie. A ce jour, l'administration de ces chélates de Gd linéaires n'est formellement contre-indiquée aux USA que chez les patients souffrant d'insuffisance rénale de stade 4 ou 5 (donc, avec un débit de filtration glomérulaire  $\leq 30 \text{ mL/mn}/1,73 \text{ m}^2$ ).

Les patients âgés sont potentiellement plus sensibles à l'accumulation de Gd, puisque, l'âge avançant, il est très fréquent que la fonction rénale diminue progressivement, que les concentrations en métaux cérébraux (notamment le fer) augmentent, et que l'intégrité de la BHE diminue (Montagne, 2016). Chez les patients présentant une pathologie cérébrale, la BHE est effectivement souvent altérée, avec pour conséquence une plus grande accumulation cérébrale de Gd (Nehra, 2018 ; Montagne, 2016). Les tumeurs cérébrales auraient pour effet la perméabilisation de la BHE d'un facteur 10 à 100 (Montagne, 2016). Néanmoins, le rapport bénéfice/risque dans ces cas est souvent moins difficile à évaluer. Un débat autour de la radiothérapie et des hypersignaux a récemment émergé. Certains auteurs rapportent des hypersignaux T1 plus importants dans le cadre d'administrations de chélates de Gd chez des patients ayant bénéficié d'une radiothérapie (Kinner, 2018 ; Tamrazi, 2018), tandis que d'autres auteurs attribuent la différence de signal T1 aux calcifications associées à la radiothérapie (Kanda, 2014 ; Adin, 2015 ; Suzuki, 2000 ; Olchowi, 2017).

Dans tous les cas, une réflexion préalable à l'examen sur la pertinence de l'administration d'un agent de contraste est essentielle et d'ailleurs recommandée par les autorités sanitaires. De plus, l'apophtegme d'Hippocrate « *Face aux maladies, avoir deux choses à l'esprit : faire du bien, ou, au moins, ne pas faire de mal* » (Hippocrate, 410 av. JC), devrait s'imposer. Enfin, la question de l'information aux patients fait l'objet d'un débat (Shah, 2019).



## Quelles sont les cinétiques d'accumulation et d'élimination du Gd dans le SNC ?

Nous estimons que l'accumulation de Gd dans le SNC concernerait environ 0,1 % de la dose de chélate de Gd injectée, la plus grande majorité étant éliminée par voie rénale dans les heures post-injection. A chaque administration, cette proportion s'accumule, et s'ajoute à ce qui a été accumulé au préalable. Il convient de relativiser, cette petite capture est minime et est plus importante, à un délai tardif, dans d'autres tissus : l'os, le rein (Lohrke, 2017 ; Bussi, 2018). Pour des patients ayant reçu de nombreuses injections, ce phénomène peut sembler préoccupant. Des cas de patients ayant reçus jusqu'à 86 administrations ont été rapportés (Khant, 2017).

Deux études précliniques, menées chez le Rat sain et mesurant les concentrations de Gd pendant un an après la période d'injections répétées, ont été publiées récemment (Robert, 2018a ; Jost, 2019). L'une d'entre elle a, de plus, évalué parallèlement la spéciation du Gd, permettant ainsi de mieux comprendre le devenir du lanthanide capturé (Robert, 2018a). Il est apparu, dans cette étude que les agents macrocycliques sont accumulés de façon intacte dans le SNC et que, contrairement aux agents linéaires, ils sont progressivement éliminés (Gianolio, 2017 ; Robert, 2018a ; Jost, 2019).

Le gadodiamide, agent linéaire étudié, et le moins thermodynamiquement stable du marché (Port, 2008), se comporte différemment des agents macrocycliques. Une proportion, probablement équivalente à celle des agents macrocycliques, est précocement accumulée également sous forme de chélate intact. Cependant, de très faibles rendements d'extraction du Gd présent dans les fractions solubles sont observés dans le groupe gadodiamide, contrairement à un agent macrocyclique. Cela signifie donc probablement qu'une grande proportion du Gd accumulé est sous forme insoluble, et cela dès la fin de la période d'injections (Gianolio, 2017 ; Robert, 2018a). A ce jour, on ignore si cette espèce insoluble de Gd apparaît le jour suivant une administration. En effet, dans le cadre de protocoles avec administrations répétées (ce qui est le cas de toutes les études de spéciation disponibles à ce jour), un délai de 3 jours après la dernière injection correspond en fait à un délai de 5 semaines après la première injection.

La concentration de Gd tissulaire total (c'est-à-dire sous forme élémentaire) diminue ensuite progressivement avec le temps, et une même quantité semble éliminée chez les linéaires et les macrocycles (Robert, 2018a). Pour le gadodiamide, l'aire sous la courbe des concentrations de Gd total pendant le suivi d'un an, déterminée dans différentes structures cérébrales et reflétant l'exposition du SNC au Gd total, a été 9 à 18 fois plus élevée que pour le gadotérate. Pour le gadodiamide, il est intéressant de noter qu'alors que la fraction chélatée disparaît progressivement, une fraction de haute masse moléculaire (>66 kDa) fait son apparition. On peut ainsi proposer que le « wash-out » plus rapide concerne les chélates de Gd sous leur forme intacte. Les agents macrocycliques atteignent la limite de quantification du Gd (au bout de 5 mois chez le Rat ayant reçu une dose cumulée de 12 ou 14,4 mmolGd/kg) (Robert, 2018a ; Jost, 2019). Les agents linéaires, quant à eux, atteignent une concentration seuil de Gd total, qui semble représenter des espèces accumulées sur un délai bien plus long. Il s'agit, en partie, de Gd associé à des macromolécules solubles (qui serait responsable du rehaussement T1 et T2 du signal IRM). L'autre partie, majoritaire, serait constitué d'espèces de Gd que nous supposons insolubles, puisque non retrouvée dans la fraction soluble des procédés d'extraction. Cette fraction insoluble ne participerait pas, ou peu, au signal T1 et T2 (Gianolio, 2017), mais peut-être au signal T2\*. Ainsi, dans le cas des chélates linéaires de Gd, la forme des espèces retenues et/ou leur site de rétention ne permettraient pas leur clairance.

Les travaux de Jost chez le Rat suivi pendant un an indiquent cependant une ré-augmentation des concentrations de Gd accumulées, entre le 6<sup>e</sup> mois et le 12<sup>e</sup> mois post-injections, pour les agents linéaires ioniques (gadobénate et gadopentétate) (Jost, 2019). La recirculation d'un pool de Gd dans le sang, issu par exemple d'une élimination osseuse (Vidaud, 2012) ou d'un autre compartiment dit



« profond » est possible, longtemps après administration. Les demi-vies des lanthanides présents dans la fraction osseuse seraient en effet très longues (suite à leur administration sous forme ionique), selon une modélisation publiée par l'International Commission on Radiological Protection (ICRP). Cette mobilisation du Gd de l'os dépend du remodelage osseux (Taylor, 2003). Ce Gd recirculant est susceptible d'atteindre le LCR puis le SNC. La forme circulante du Gd est inconnue. En revanche, les agents linéaires ioniques s'accumulent moins dans l'os que les agents linéaires non-ioniques (Sieber, 2008) et les différences de redistribution à ce niveau ne sont pas expliquées à ce jour. La dissociation de chélates de Gd linéaires, ioniques et non ioniques, a été démontrée en relaxométrie, dans le fémur de rats (Fretellier, 2013). Des études comparatives de la spéciation du Gd dans l'os devraient nous permettre d'éclaircir ce point.

## Par où le Gd passe-t-il ? Où se stocke-t-il, et sous quelles formes ?

Nous avons précédemment identifié les principales structures anatomiques d'accumulation de Gd, leurs caractéristiques, ainsi que les données de spéciation du Gd accumulé disponibles. Ces différentes questions étant, bien entendu, étroitement liées, nous nous proposons de les traiter ensemble, à travers un mécanisme général hypothétique, établi à partir de nos données et de la littérature. La Figure 125 et la Figure 126 illustrent ces hypothèses, depuis l'administration intraveineuse de chélates de Gd, jusqu'à leurs formes et structures d'accumulation. La réponse aux questions mentionnées ici nous semble importante pour la pratique clinique et pour la recherche de signes de toxicité éventuelle.

Suite à une injection de chélates de Gd par voie intraveineuse, ceux-ci, quelle que soit leur catégorie structurale, accèdent en partie au LCR, produisant un rehaussement T2 observable en séquence FLAIR, apparaissant en quelques dizaines de minutes (Naganawa, 2014). Le passage du sang au LCR s'effectuerait au niveau des plexus choroïdes situés dans les ventricules cérébraux (le 3<sup>e</sup> ventricule et les ventricules latéraux du télencéphale, le 4<sup>e</sup> ventricule au niveau du cervelet). Les capillaires des plexus choroïdes, à partir desquels le sang filtré devient le LCR, sont fenêtrés et perméables (Strazielle, 2000). La régulation des concentrations de nombreux ions et solutés y est tout de même assurée grâce à des transports actifs (Johanson, 2005). Les protéines, quant à elles, n'accèdent quasiment pas au LCR (Cutler, 1967). Les chélates de Gd étant de petites molécules hydrophiles, leur passage trans- ou inter-cellulaire semble possible. Les plexus choroïdes constituent tout de même un premier filtre, empêchant le passage de Gd dissocié et lié à des macromolécules. La voie précise par laquelle les chélates de Gd traversent cette barrière n'est pas connue. En raisonnant par élimination, sur la base de voies proposées dans la littérature (Liddelow, 2015), on peut proposer l'hypothèse d'un transport actif grâce à des transporteurs de la famille SLC (pour « solute carriers »). Cependant, leur expression également au niveau de la BHE rend cette hypothèse peu probable (Liddelow, 2015). Un transport vésiculaire (endocytose) est aussi envisageable dans la mesure où il peut impliquer des médiateurs non spécifiques comme les VAMPs (« vesicle-associated membrane proteins »). Enfin, la voie des aquaporines AQP1 (Johansson, 2005) semble aussi envisageable. Du Gd ionique serait également séquestré dans les plexus comme d'autres ions métalliques exogènes (Zheng, 2001). Cela pourrait expliquer le rehaussement T1 des plexus observé dans le cadre d'injections de linéaires chez des patients en insuffisance rénale (Cao, 2016). Du Gd chélaté s'y accumule peut-être aussi et il serait responsable d'un rehaussement T1 des plexus choroïdes lors d'injections de doses élevées de linéaire ou macrocyclique (observé dans notre étude où 50 mmolGd/kg cumulé de gadotérate ou gadodiamide avaient été injecté).

Une fois présent dans les ventricules, les chélates vont principalement suivre le flux du LCR pulsé jusque dans l'espace sous-arachnoïdien, où ils vont majoritairement réintégrer les sinus veineux à





travers les villosités arachnoïdiennes, système de renouvellement du LCR (Louveau, 2016).

Cependant, une petite partie des chélates de Gd présents dans le LCR ventriculaire va pouvoir traverser facilement les cellules épendymaires qui tapissent les ventricules cérébraux. Ils vont ainsi atteindre le fluide interstitiel, puis diffuser lentement dans l'interstitium. Dans le cas de leur arrivée au niveau de structures riches en métaux, il est probable que les trafics cellulaires en ions métalliques et en protéines de transport ou de stockage de métaux (par exemple la transferrine ou la ferritine) soient importants (schéma en Annexe 6). Dans ce cas, nous émettons l'hypothèse de la survenue de transmétallation Gd vs. métal endogène ou de translocation locales dans le cas des chélates de Gd les thermodynamiquement les moins stables (c'est-à-dire les agents linéaires). Dans les DCN chez le Rat, nos données indiquent que c'est le fer total que l'on trouve en plus haute concentration (de l'ordre de  $700 \pm 200$  nmol/g, données internes), puis le zinc total ( $\sim 220 \pm 30$  nmol/g), et enfin le cuivre total ( $\sim 80 \pm 15$  nmol/g). Le Gd libéré se retrouverait alors soit associé à une macromolécule, telles que la transferrine (76 kDa) ou la ferritine (450 kDa), dans l'interstitium de la structure en question (le noyau dentelé par exemple), pouvant être internalisé ensuite. La dégradation progressive de protéines contenant du Gd à ce niveau pourrait expliquer le Gd que nous avons retrouvé dans des pigments de lipofuscine intracellulaire, après internalisation dans des vacuoles d'autophagie (Sulzer, 2008).

La question de la nature des macromolécules auxquelles le Gd dissocié pourrait se lier, comme cela a été observé dans des études de spéciation (Frenzel, 2017 ; Gianolio, 2017 ; Robert, 2018) n'est pas résolue à ce jour. Le Gd pouvant être compétiteur du calcium, du fer, du cuivre ou du zinc vis-à-vis de certaines protéines, nous pouvons avancer quelques hypothèses.

La calmoduline, par exemple, est une protéine intracellulaire impliquée dans la contraction musculaire et régulant le métabolisme calcique par activation de canaux calciques, de kinases et de phosphatases. Cette protéine possède 4 sites de liaison au calcium, deux de forte affinité, et deux de faible affinité. Ces 4 sites sont de conformation de type « main EF », motif hydrophile composé de 3 hélices et résidant sur une organisation précise d'acides aminés tels que l'acide aspartique, l'asparagine, l'acide glutamique ou encore la sérine (Feng, 2012). Il s'avère que le gadolinium et les lanthanides en général, sont capables de se lier à ces 4 sites, avec une meilleure affinité au niveau de sites contenant 3 acides aspartiques consécutifs (Evans, 1983 ; Mulqueen, 1985 ; Bertini, 2003).

Dans la famille des protéines modulées par le calcium et contenant des domaines en « main EF », on trouve notamment la parvalbumine (exprimée dans les cellules de Purkinje et les interneurons de la couche moléculaire du cortex cérébelleux), auxquelles les lanthanides ont également la capacité de se lier (Lee et Sykes, 1980 ; Evans, 1983 ; Breen, 1985).

La liaison des lanthanides à la transferrine, à la place du fer, a été décrite (Taylor, 1991 ; Deblonde, 2013), ainsi qu'à l'immunoglobuline G (Willan, 1977), et à l'albumine (Schömacker, 1988 ; Ali, 2016).

Les lanthanides auraient également la capacité de se lier au collagène et à l'actine et d'en promouvoir la polymérisation en fibres (Barden, 1980 ; Burtnick, 1982 ; Evans, 1983 ; Stratta, 2008).

Enfin, l'affinité du gadolinium pour les glycosaminoglycane, tels que l'héparine ou l'acide hyaluronique (entrant dans la composition des lames basales), a été décrite (Rej, 1990 ; Vercruysse, 2002 ; Taupitz, 2013).

Le noyau dentelé (ou les DCN chez le Rat) et le globus pallidus étant à la fois riches en métaux, dont le fer (Koeppen, 2007 ; Popescu, 2009) et anatomiquement proches de ventricules cérébraux, ce phénomène expliquerait leur accumulation locale, sous une forme induisant un rehaussement T1. Le noyau caudé, chez l'Homme, est plus proche du 3<sup>e</sup> ventricule que le *globus pallidus*, mais il contient aussi deux fois moins de fer par exemple (Hallgren, 1958). Lors d'injections nombreuses de chélates de Gd, cette structure présente tout de même un rehaussement T1 (Zhang, 2017). Dans le cas du Rat, le cervelet étant bien



plus petit que chez l'Homme, les faibles distances entre la couche granulaire et les noyaux cérébelleux profonds, pourraient permettre un accès plus aisé que chez l'Homme. De plus, chez le Rat, les concentrations tissulaires de Fe et de Zn sont plus élevées et plus localisées dans la couche granulaire que chez l'Homme (Fingerhut, 2018b), facilitant une transmétallation. La couche granulaire chez le Rat est cependant également très riche en phosphore (Fingerhut, 2018b), et il semble donc probable que le Gd qui s'y accumule y est majoritairement sous forme de  $GdPO_4$ . Cela explique qu'un rehaussement T1 ou T2 ne soit pas observé de façon franche dans le cortex, malgré des concentrations similaires à celles des DCN chez le Rat à la suite d'administrations de chélates linéaires. Nous n'expliquons cependant pas pourquoi nous n'en n'avons pas observé en microscopie électronique, sous forme insoluble en quantité très importante (Publication 3).

Les chélates de Gd ne rencontrant pas de structures cérébrales riche en métaux, ou n'étant pas susceptibles d'échanger le Gd avec un métal endogène, diffusent au sein de l'interstitium puis rejoignent la circulation périartérielle intrapariétale (IPAD, ou « intramural periarterial drainage » décrite par Weller en 2018) (Weller, 2018). Cette circulation correspond à ce qui a été décrit comme la partie intra-parenchymateuse du système glymphatique. Ce drainage diminue avec l'âge ou dans le cas de la maladie d'Alzheimer. Dans l'hypothèse où le flux de l'IPAD varie entre le jour et la nuit (ce qui a été proposé dans le cas du système glymphatique), la voie d'élimination de l'IPAD expliquerait les différences observées par Taoka entre des injections réalisées le soir ou le matin (Taoka, 2018). L'élimination de cette fraction serait cependant très rapide. Il n'est cependant pas exclu que quelques molécules restent piégées plus longtemps, en association, sous forme toujours, chélatée, à des protéines par exemple.

Il existe une autre voie d'accès et d'accumulation potentielle de Gd, qui serait majoritaire. Cette voie passerait par l'espace sous-arachnoïdien, où du LCR plonge dans la profondeur du tissu le long des artères pénétrantes issues des artères piales, dans l'espace sous-pial, entre pie mère et *glia limitans*. C'est cet espace que nous avons décrit (Publication 3) comme étant l'espace de Virchow-Robin. Nous avons en effet retrouvé la majorité des dépôts de Gd en microscopie électronique et en fluorescence X, dans la zone périvasculaire. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Fingerhut qui indiquent également que la majorité du Gd intra-parenchymateux, est situé dans la proximité des vaisseaux. On notera que ces dépôts métalliques y sont partiellement colocalisés avec du phosphore, ce qui est cohérent avec la présence de  $GdPO_4$  (Fingerhut, 2018b).

Nos travaux d'XRF ont mis en évidence la proximité du Gd et du Ca avec des structures que nous avons interprétées comme des vaisseaux. L'homéostasie du calcium au niveau de l'unité neurovasculaire (et notamment des pieds astrocytaires) est essentielle à la régulation du débit sanguin cérébral (McConnell, 2017). Si des chélates de Gd thermodynamiquement peu stables accèdent au cytosol des pieds astrocytaires, on peut proposer une transmétallation du Gd avec le calcium intracellulaire. Si ce n'est pas le cas, la concentration moyenne de calcium total dans le LCR reste de toute façon relativement élevée (1,1 mmol/L, soit la moitié de la concentration sanguine) (Hladky, 2014), faisant du calcium un acteur potentiel dans la déchélation. Dans les structures tissulaires riches en phosphore et de métaux endogènes échangeables, on peut imaginer également la présence de concentrations plus élevées de ces éléments au niveau de la BHE, facilitant la transmétallation et précipitation de Gd sous forme de  $GdPO_4$ . Nous avons en effet retrouvé la présence de Gd sous forme d'« oursins » insolubles, supposés être du  $GdPO_4$ , dans cet espace de Virchow-Robin/sous-pial, ainsi que dans les lames basales endothéliales. La concentration de phosphate inorganique dans le LCR est inférieure de la concentration plasmatique (0,6 mmol/L contre 1 à 1,2 mmol/L) (Idland, 2017). Expérimentalement, le produit de solubilité du  $GdPO_4$  est estimé à  $10^{-25,35}$  (Firsching, 1991). Cela signifie qu'une concentration de  $Gd^{3+}$  et de  $PO_4^{3-}$  de l'ordre de  $10^{-13}$  M pour chacun des ions, suffit à



conduire à une précipitation rapide et stable de ce sel. Evidemment, à pH physiologique, les entités principales de phosphore seront  $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , menant à un produit de solubilité apparent moins bon. Cependant, la faible quantité présente sous forme de l'anion  $\text{PO}_4^{3-}$  devrait suffire à réaliser cette association. Le Gd accède au LCR sous forme chélatée, mais comme nous l'avons vu, une petite partie de ces chélates est retenue 2 à 3 mois chez le Rat (Robert, 2018a). Ce temps de rétention prolongé jouera en défaveur des chélates les moins stables cinétiquement. Une fois la cristallisation initiée en un lieu (la lame basale dans notre étude de TEM par exemple), l'agrégation du  $\text{GdPO}_4$  dans le maillage sera favorisée, s'organisant progressivement selon une forme géométrique, comme les « oursins » que nous avons identifiés. D'autres anions, tels que les carbonates, pourraient aussi interagir avec du  $\text{Gd}^{3+}$ . Ceux-ci sont présents en plus grande concentration (22 mM environ dans le LCR, mais certainement bien moins dans le parenchyme cérébral) ; et le produit de solubilité est également meilleur. Les simulations algorithmiques (Wang, 2004 ; Jakovljević, 2013) prédisent cependant une précipitation préférentielle sous forme de  $\text{GdPO}_4$ , avant que n'apparaisse du  $\text{Gd}_2(\text{CO}_3)_2$  à des concentrations plus élevées de Gd. Ces études de modélisations ont été réalisées dans le plasma ou le fluide interstitiel, mais le pH et sa composition diffèrent peu du liquide céphalorachidien.

Il est aussi envisageable que du Gd se retrouve associé sous forme soluble à des macromolécules de la lame basale, grâce à son importante affinité pour les glycosaminoglycanes dont les héparines et les héparanes sulfates (Taupitz, 2013), participant ainsi au rehaussement du signal T1. Fingerhut explique ainsi, au moins en partie, les différences de concentrations de Gd par l'hétérogénéité de la vascularisation, ce qui semble cohérent (Fingerhut, 2018b). Du Gd chélaté resterait temporairement piégé au niveau sous-pial périvasculaire, avant d'être éliminé, de façon périvasculaire également, par l'IPAD, tout comme les chélates de Gd ayant diffusé dans le parenchyme cérébral (dont l'élimination totale a lieu en quelques mois), favorisant la dissociation progressive des chélates de Gd piégés les moins stables thermodynamiquement.

Ainsi, si nous résumons l'accumulation au niveau des structures cérébrales d'intérêt :

- La majorité du Gd (chélaté pour les complexes de Gd macrocycliques, partiellement déchélaté pour les linéaires), est piégé en périvasculaire, dans l'espace entre pie-mère et *glia limitans*, faisant de la vascularisation cérébrale et de sa densité locale (Fingerhut, 2018b) un élément important de l'accumulation du Gd ;
- Au niveau des noyaux gris centraux, contenant le *globus pallidus*, un espace périvasculaire existe bel et bien, permettant éventuellement l'accès plus facile ou en quantités plus importantes de chélates de Gd depuis le LCR jusqu'au parenchyme
- Un second paramètre est la proximité entre les structures anatomiques et les ventricules cérébraux, permettant la diffusion des chélates de Gd à travers l'épendyme ;
- Un troisième paramètre est l'abondance en métaux et en phosphore des structures anatomiques, favorisant une déchélation locale, puis l'association à des macromolécules, ou la précipitation du Gd sous forme de  $\text{GdPO}_4$ .



Tableau 22 : caractéristiques des structures d'intérêt pour la capture cérébrale, chez l'Homme et chez le Rat, expliquant les différences d'accumulation (d'après les travaux (données internes et données publiées) de LA-ICP-MS de l'équipe Karst et Fingerhut) (Fingerhut 2018b).

	Fe (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)	P (µg/g)	Densité vasculaire	Proximité d'un ventricule	Accumulation de Gd (µg/g)
<b>DCN Rat</b>	+++ > 100	+ ~ 10	+ ~ 10	+	++	+++	++ (10-15) Surtout soluble
<b>Couche granulaire Rat</b>	++ ~ 50	+ ~ 10	+ ~ 10-15	++	++	++ (en distance)	++ insoluble & soluble ?
<b>Noyau dentelé Homme</b>	+++ ~ 70	+++ ~ 70	+ ~ 25	++ ~ 50-70	+++	+++	+++ (~50) soluble & insoluble
<b>Couche granulaire Homme</b>	+ ~ 5-10	+ ~ 5-10	+ ~ 5-10	+ < 12	++	+	~



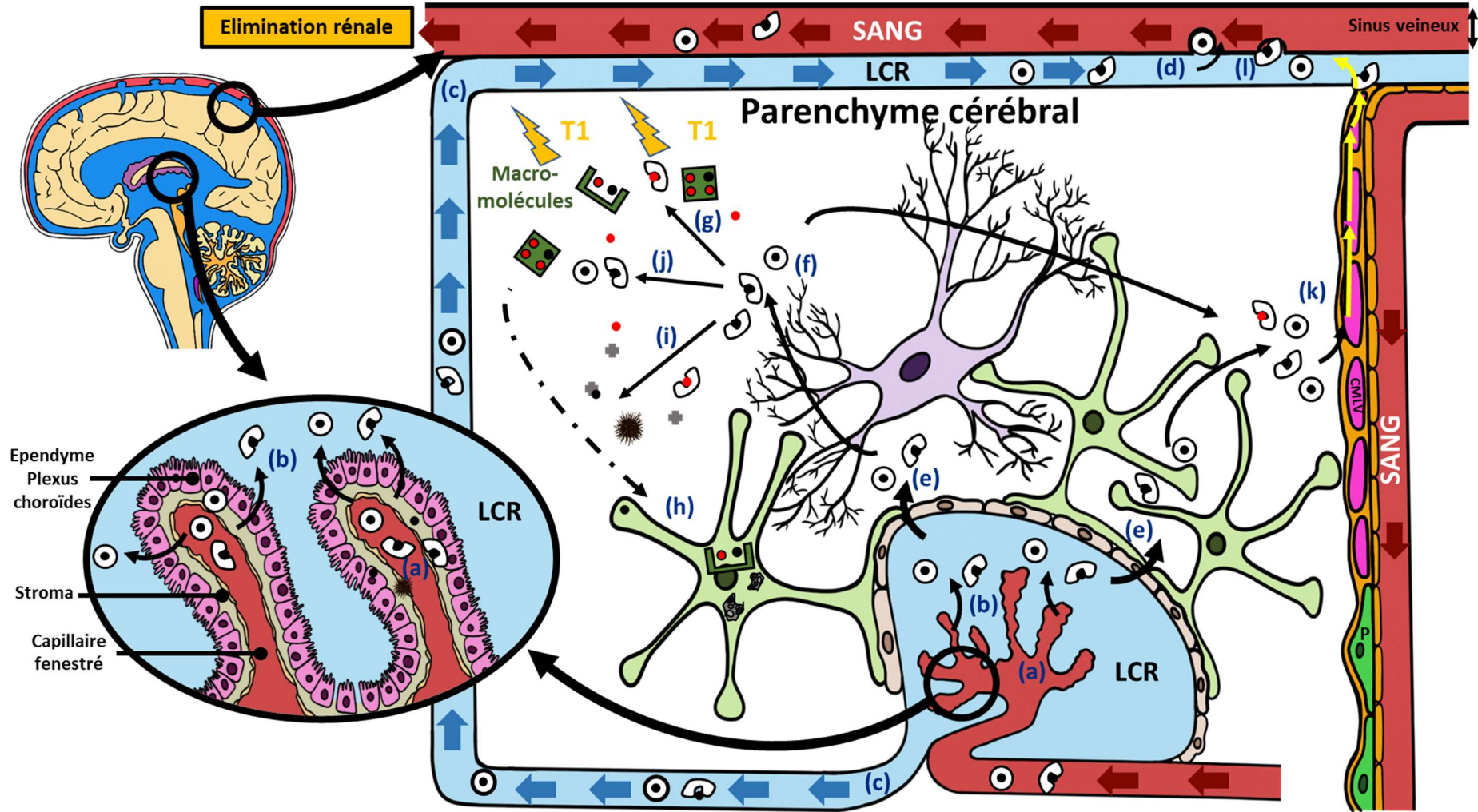


Figure 125 : Hypothèse mécanistique de distribution et d'accumulation des chélates de Gd macrocycliques et linéaires – Partie 1 : passage trans-épendymaire (voir légende dans la Figure 126) (illustration : Miguel Soares).



- (a) Les plexus choroïdes constituent un premier filtre, retenant du Gd circulant dissocié ainsi que des chélates de Gd intacts (au sein du stroma, des lames basales ou en intracellulaire) (Zheng, 2001 ; dosages de Gd dans les plexus et hypersignaux observés ; étude de microscopie électronique ; hypersignal observé en cas de fortes doses ou d'insuffisance rénale ; Cao, 2016).
- (b) Une quantité non négligeable de chélates de Gd traverse les plexus choroïdes et se retrouve ainsi en solution dans le liquide céphalorachidien au niveau de ventricules cérébraux (Bozzao, 2003 ; Morris, 2007 ; Naganawa, 2010 ; Naganawa, 2014, Nehra, 2018 ; Mamourian, 2000 ; Iliff, 2013 ; Jost, 2017)
- (c) La majorité des chélates de Gd circule depuis les ventricules cérébraux vers l'espace sous-arachnoïdien, ...
- (d) ... où ils rejoignent le sinus veineux (voie de renouvellement du LCR), au niveau des villosités arachnoïdiennes (Morris, 2007)...
- (e) Une partie des chélates de Gd présents dans les ventricules cérébraux vont progressivement traverser l'épendyme, entre les pieds astrocytaires enchevêtrés par exemple, et diffuser dans l'interstitium cérébral (Bui, 1999 ; Morris, 2007 ; Roales-Bujan, 2012).
- (f) Si par diffusion, les chélates de Gd accèdent à une zone riche en métaux endogènes, en phosphore, ou les deux (c'est notamment le cas des noyaux cérébelleux profonds, globus pallidus, de la couche granulaire du cortex cérébelleux chez le Rat),
- (g) le Gd d'une partie des chélates les moins stables thermodynamiquement, pourra subir une transmétallation avec un ion métallique endogène (Fe, Zn, Cu), ou bien une transligation avec une macromolécule (par exemple la transferrine ou la ferritine) présente dans le fluide interstitiel. La liaison à ces macromolécules du Gd<sup>3+</sup> dissocié et présent dans le fluide interstitiel sera en grande partie responsable du rehaussement du signal T1 observé avec les chélates linéaires...
- (h) Les macromolécules peuvent éventuellement se retrouver ensuite dans l'espace intracellulaire, et leur dégradation peut mener à du Gd dans des dépôts de lipofuscine, comme observé en microscopie électronique.
- (i) ... ou bien précipiter sous forme de GdPO<sub>4</sub> en présence de phosphate (Publication 3 : étude de microscopie électronique ; Fingerhut, 2018 ; Frenzel, 2018 ; Robert, 2018a ; Gianolio, 2018).
- (j) Une légère fraction peut éventuellement se retrouver piégée sous forme de chélates de Gd intacts, mettant quelques mois à être totalement éliminés (Robert, 2018a ; Jost, 2018). Ce paramètre cinétique pourra jouer également en défaveur des chélates linéaires de Gd moins stables cinétiquement, favorisant ainsi la survenue d'une dissociation ultérieure (Robert, 2018a).
- (k) Les chélates de Gd ne rencontrant pas de structure cérébrale riche en métaux endogènes ou en phosphate, ou bien ne se déchélatant pas, diffuseront dans le fluide interstitiel jusqu'à rencontrer l'espace péri-artériel intra-pariétal (IPAD), au sein de la lame basale de capillaires, puis diffuseront entre les cellules musculaires lisses (CMLV) au niveau d'artérioles (Weller, 2018) ...
- (l) ... jusqu'à leur réabsorption dans les sinus veineux au niveau des villosités arachnoïdiennes.





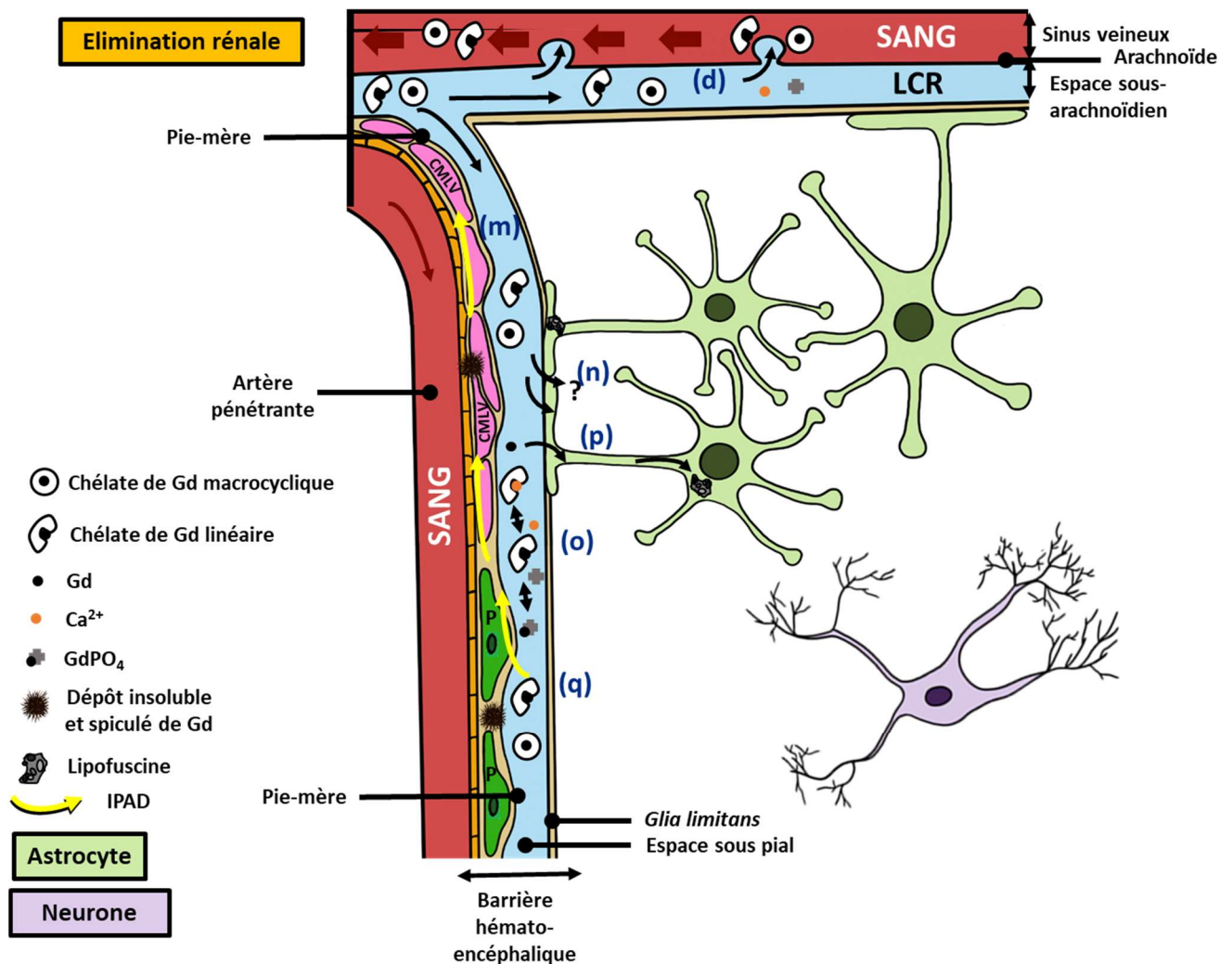


Figure 126 : Hypothèse mécanistique de distribution et d'accumulation des chélates de Gd macrocycliques et linéaires – Partie 2, voie péri-vasculaire (illustration : Miguel Soares).

(d) Alors que la plupart des chélates de Gd circulant dans l'espace sous-arachnoïdien vont être réabsorbés au niveau des sinus veineux ...

(m) ... une petite partie plongera dans le parenchyme cérébral, le long d'artères pénétrantes puis d'artérioles, via l'espace sous-pial périvasculaire, situé entre la pie-mère et la glia limitans. Cet espace est parfois confondu avec l'espace de Virchow-Robin et le début du système glymphatique (Naganawa, 2017 ; Ohashi, 2018a ; Iliff, 2013 ; Eide, 2015 ; Öner, 2017 ; Freeze, 2017) (cet espace n'est pas physiquement béant, contrairement à ce qui est représenté sur le schéma dans un souci de lisibilité) (Weller, 2018).

(n) Nous ignorons si les chélates intacts accèdent au parenchyme en traversant la glia limitans et les pieds astrocytaire. Cela nous semble peu probable.

(o) Le liquide céphalo-rachidien contient des ions Ca<sup>2+</sup> et du PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. L'espace périartériel est enrichi en calcium (Muio, 2014 ; Iadecola, 2017 ; Wang, 2009 ; McConnell, 2017). Ainsi, les chélates de Gd les moins stables thermodynamiquement seraient en mesure d'échanger le Gd avec le Ca présent à ce niveau (déplacement de l'équilibre lié à la forte concentration locale de Ca<sup>2+</sup>) et le Gd dissocié pourrait précipiter localement sous forme de GdPO<sub>4</sub> (colocalisation Gd-Ca observée en fluorescence X ; étude de microscopie électronique ; Fingerhut, 2018b). Une partie des chélates de Gd pourrait ainsi être piégé dans cet espace périvasculaire.

(q) La plupart des chélates de Gd intacts présents dans l'espace sous-pial périvasculaire seront cependant éliminés sous cette forme par la voie de l'espace périartériel intrapariétal (IPAD).

## Perspectives

Ce que nous proposons ici reste, bien entendu, hypothétique, seules des études complémentaires permettront de conclure avec certitude.

Si les localisations subcellulaires d'accumulation du Gd sont bien celles que nous suspectons, il serait intéressant de renseigner exactement les modes de transport/passage des chélates de Gd, à travers les plexus choroïdes, les cellules épendymaires, mais aussi le parenchyme depuis l'espace sous-pial. Nous ne savons en effet pas s'ils empruntent des transporteurs ou canaux particuliers. Une approche pharmacologique *in vitro* serait alors envisageable. Un second axe de recherche concernerait l'identification des molécules de liaison au Gd, une fois cet élément accumulé dans le SNC (mis en évidence par les études de spéciation). S'agit-il effectivement de molécules en lien avec les métaux endogènes ? Des études de métabolomique, par la technique de MALDI-TOF (Kapoor, 2009) par exemple, seraient ici utiles. Selon les protéines et macromolécules concernées, nous pourrions mieux orienter les études de recherche de neurotoxicité, selon une approche basée sur des hypothèses. Les rôles effectifs des métaux endogènes et du phosphore devraient être étudiés également. Les conséquences de l'accumulation de Gd périvasculaire sur l'intégrité de la BHE et la viabilité de ces cellules pourraient aussi être analysées, par exemple sur des modèles *in vitro*.

En conclusion, l'utilisation des chélates de Gd a donc changé après la mise en évidence de leur accumulation cérébrale. Les autorités sanitaires européennes ont interdit les chélates de Gd linéaires. Aux USA et dans d'autres pays, le recours aux chélates de Gd est désormais plus réfléchi que par le passé. L'emploi de chélates de Gd linéaires a fortement décru là où ils sont encore autorisés, par exemple au Japon (Mugikura, 2017) mais l'utilisation du gadodiamide reste par exemple majoritaire dans certains pays du Tiers-Monde comme par exemple le Ghana (où, de plus, un peu plus de 50% des répondants à un questionnaire étaient informés de la capture cérébrale de Gd) probablement pour des raisons économiques (Piersson, 2018).

Certains auteurs mentionnent que le futur des chélates de Gd réside dans des produits de haute stabilité thermodynamique et il est très difficile de les contredire, mais aussi de plus haute relaxivité. Des chélates de Gd de plus haute relaxivité pourraient être administrés à des doses plus faibles, améliorant ainsi potentiellement la sécurité pour une même efficacité sur le signal (Lawson, 2015 ; Runge, 2018).

Les contributions des travaux de cette thèse à la compréhension du phénomène sont présentées en Annexe 7.



# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## A

Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006; **7**:41-53.

Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 2010; **37**:13-25.

Abbott NJ, Pizzo ME, Preston JE, Janigro D, Thorne RG. The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: is there a 'glymphatic' system? *Acta Neuropathol*. 2018; **135**:387-407.

Abraham JL, Thakral C, Skov L, Rossen K, Marckmann P. Dermal inorganic gadolinium concentrations: evidence for in vivo transmetallation and long-term persistence in nephrogenic systemic fibrosis. *Br J Dermatol*. 2008a; **158**:273-280.

Abraham JL, Thakral C. Tissue distribution and kinetics of gadolinium and nephrogenic systemic fibrosis. *Eur J Radiol*. 2008b; **66**:200-207.

Abu-Alfa AK. Nephrogenic systemic fibrosis and gadolinium-based contrast agents. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2011; **18**:188-198.

American College of Radiology. ACR Manual on Contrast Media. Version 10.3. 2018. Disponible à : [https://www.acr.org/-/media/ACR/Files/Clinical-Resources/Contrast\\_Media.pdf](https://www.acr.org/-/media/ACR/Files/Clinical-Resources/Contrast_Media.pdf)

Adams MD, Barco SJ, Galen KP, Hynes MR, Ralston WH. Motor coordination testing of the neurotoxicity of paramagnetic chelates. In: Rinck PA, Müller RN, eds. *New Developments in Contrast Agents: Proceedings of the 3rd special topic seminar of the European Magnetic Resonance Forum*. Hamburg: European Magnetic Resonance Forum Foundation. 1993; p. 51-58.

Adding LC, Bannenberg GL, Gustafsson LE. Basic experimental studies and clinical aspects of gadolinium salts and chelates. *Cardiovasc Drug Rev*. 2001; **19**:41-56.

Adin ME, Kleinberg L, Vaidya D, Zan E, Mirbagheri S, Yousem DM. Hyperintense dentate nuclei on T1-weighted MRI: relation to repeat gadolinium administration. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2015; **36**:1859-1865.

Agris J, Pietsch H, Balzer T. What evidence is there that gadobutrol causes increasing signal intensity within the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1W MRI in patients with RRMS? *Eur Radiol*. 2016; **26**:816-817.

Aime S, Caravan P. Biodistribution of gadolinium-based contrast agents, including gadolinium deposition. *J Magn Reson Imaging*. 2009; **30**:1259-1267.

Alamri FF, Shoyaib AA, Biggers A, Jayaraman S, Guindon J, Karamyan VT. Applicability of the grip strength and automated von Frey tactile sensitivity tests in the mouse photothrombotic model of stroke. *Behav Brain Res*. 2018; **336**:250-255.

Albargothy NJ, Johnston DA, MacGregor-Sharp M, Weller RO, Verma A, Hawkes CA, Carare RO. Convective influx/glymphatic system: tracers injected into the CSF enter and leave the brain along separate periarterial basement membrane pathways. *Acta Neuropathol*. 2018; **136**:139-152.



Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR. Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res*. 1990; **85**:119-146.

Ali M, Kumar A, Kumar M, Pandey BN. The interaction of human serum albumin with selected lanthanide and actinide ions: Binding affinities, protein unfolding and conformational changes. *Biochimie*. 2016; **123**:117-129.

Allard M, Caillé JM, Bonnemain B, Meyer D, Simonnet G. Action of gadolinium complexes on different enzyme systems. *Acta Radiol*. 1986; **369**:572-574.

Allard M, Kien P, Caille JM, Bonnemain B, Doucet D, Simonnet G. Subcellular localisation of gadolinium in the rat brain. *J Neuroradiol*. 1987; **14**:159-162.

Allard M, Doucet D, Kien P, Bonnemain B, Caillé JM. Experimental study of DOTA-gadolinium. Pharmacokinetics and pharmacologic properties. *Invest Radiol*. 1988; **23**:S271-S274.

Angle CR. Chelation therapies for metal intoxication. In: Chang LW, editor. *Toxicology of Metals*. CRC Press; Boca Raton, FL, USA. 1996; p. 487-504.

Arena F, Bardini P, Blasi F, Gianolio E, Marini GM, La Cava F, Valbusa G, Aime S. Gadolinium presence, MRI hyperintensities, and glucose uptake in the hypoperfused rat brain after repeated administrations of gadodiamide. *Neuroradiology*. 2018. Sous presse.

Arlt S, Cepek L, Rustenbeck HH, Prange H, Reimers CD. Gadolinium encephalopathy due to accidental intrathecal administration of gadopentetate dimeglumine. *J Neurol*. 2007; **254**:810-812.

Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson BR, Betsholtz C. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*. 2010; **468**: 557-561.

Aschner M, Gannon M. Manganese (Mn) transport across the rat blood-brain barrier: saturable and transferrin-dependent transport mechanisms. *Brain Res Bull*. 1994; **33**:345-349.

Asem JS, Holland PC. Dorsolateral striatum implicated in the acquisition, but not expression, of immediate response learning in rodent submerged T-maze. *Neurobiol Learn Mem*. 2015; **123**:205-216.

## B

Bae S, Lee HJ, Han K, Park YW, Choi YS, Ahn SS, Kim J, Lee SK. Gadolinium deposition in the brain: association with various GBCAs using a generalized additive model. *Eur Radiol*. 2017; **27**:3353-3361.

Bakshi R, Ariyaratana S, Benedict RH, Jacobs L. Fluid-attenuated inversion recovery magnetic resonance imaging detects cortical and juxtacortical multiple sclerosis lesions. *Arch Neurol*. 2001; **58**:742-748.

Bangsgaard N, Hansen JM, Marckmann P, Skov L. Nephrogenic systemic fibrosis symptoms alleviated by renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; **40**:86-87.

Bao C, Liu P, Liu H, Jin X, Shi Y, Wu L, Zeng X, Zhang J, Wang D, Calhoun VD, Tian J, Wu H. Difference in regional neural fluctuations and functional connectivity in Crohn's disease: a resting-state functional MRI study. *Brain Imaging Behav*. 2018; **12**:1795-1803.



Baranyai Z, Brücher E, Uggeri F, Maiocchi A, Tóth I, András M, Gáspár A, Zékány L, Aime S. The role of equilibrium and kinetic properties in the dissociation of Gd[DTPA-bis(methylamide)] (Omniscan) at near to physiological conditions. *Chemistry*. 2015; **21**:4789-4799.

Barbieri S, Schroeder C, Froehlich JM, Pasch A, Thoeny HC. High signal intensity in dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted MR images in three patients with impaired renal function and vascular calcification. *Contrast Media Mol Imaging*. 2016; **11**:245-50.

Barden JA, Cooke R, Wright PE, dos Remedios CG. Proton nuclear magnetic resonance and electron paramagnetic resonance studies on skeletal muscle actin indicate that the metal and nucleotide binding sites are separate. *Biochemistry*. 1980; **19**:5912-5916.

Baron PW, Cantos K, Hillebrand DJ, Hu KQ, Ojogho ON, Nehlsen-Cannarella S, Concepcion W. Nephrogenic fibrosing dermopathy after liver transplantation successfully treated with plasmapheresis. *Am J Dermatopathol*. 2003; **25**: 204-209.

Barski JJ, Hartmann J, Rose CR, Hoebeek F, Mörl K, Noll-Hussong M, De Zeeuw CI, Konnerth A, Meyer M. Calbindin in cerebellar Purkinje cells is a critical determinant of the precision of motor coordination. *J Neurosci*. 2003; **23**:3469-3977.

Bashir MR. Magnetic resonance contrast agents for liver imaging. *Magn Reson Imaging Clin N Am*. 2014; **22**:283-293.

Bauer K, Lathrum A, Raslan O, Kelly PV, Zhou Y, Hewing D, Botkin C, Turner JA, Osman M. Do Gadolinium-based contrast agents affect (18)F-FDG PET/CT uptake in the dentate nucleus and the globus Ppallidus? A pilot study. *J Nucl Med Technol*. 2017; **45**:30-33.

Baumann O, Borra RJ, Bower JM, Cullen KE, Habas C, Ivry RB, Leggio M, Mattingley JB, Molinari M, Moulton EA, Paulin MG, Pavlova MA, Schmahmann JD, Sokolov AA. Consensus paper: the role of the cerebellum in perceptual processes. *Cerebellum*. 2015; **14**:197-220.

Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C, Lasky LA. Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 1994; **84**:2554-2565.

Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*. 2004; **84**:869-901.

Beck MJ, Padgett EL, Bowman CJ, Wilson DT, Kaufman LE, Varsho BJ, Stump DG, Nemec MD, Holson JF: Nonclinical juvenile toxicology testing. In: Hood RD (Ed): Developmental and reproductive toxicology. A practical approach. Tylor & Francis, Boca Raton, FL, USA. 2006. p. 263-328.

Behzadi AH, Farooq Z, Zhao Y, Shih G, Prince MR. Dentate nucleus signal Intensity decrease on T1-weighted MR Images after switching from gadopentetate dimeglumine to gadobutrol. *Radiology*. 2018; **287**:816-823.

Bellin MF, Van Der Molen AJ. Extracellular gadolinium-based contrast media: an overview. *Eur J Radiol*. 2008; **66**:160-167.

Benarroch EE. Circumventricular organs. *Neurology*. 2011; **77**:1198-1204.

Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, Mulinyawe SB, Bohlen CJ, Adil A, Tucker A, Weissman IL, Chang EF, Li G, Grant GA, Hayden Gephart MG, Barres BA. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; **113**:E1738-E1746.



Bernini A, Venditti V, Spiga O, Ciutti A, Prischi F, Consonni R, Zetta L, Arosio I, Fusi P, Guagliardi A, Niccolai N. NMR studies on the surface accessibility of the archaeal protein Sso7d by using TEMPOL and Gd(III)(DTPA-BMA) as paramagnetic probes. *Biophys Chem.* 2008; **137**:71-75.

Bertin A, Michou-Gallani AI, Gallani JL, Felder-Flesch D. In vitro neurotoxicity of magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents: influence of the molecular structure and paramagnetic ion. *Toxicol In Vitro.* 2010; **24**:1386-1394.

Bertini I, Gelis I, Katsaros N, Luchinat C, Provenzani A. Tuning the affinity for lanthanides of calcium binding proteins. *Biochemistry.* 2003; **42**:8011-8021.

Biagi, B. and J. Enyeart. Gadolinium blocks low and high-threshold calcium currents in pituitary cells. *Am J Physiol.* 1990; **259**:515-520.

Birka M, Wehe CA, Telgmann L, Sperling M, Karst U. Sensitive quantification of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents in surface waters using hydrophilic interaction liquid chromatography and inductively coupled plasma sector field mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2013; **1308**:125-131.

Bjørnerud A, Vatnehol SAS, Larsson C, Due-Tønnessen P, Hol PK, Groote IR. Signal enhancement of the dentate nucleus at unenhanced MR Imaging after very high cumulative doses of the macrocyclic gadolinium-based contrast agent gadobutrol: an observational study. *Radiology.* 2017; **285**:434-444.

Bloch F, Hansen WW, Packard M. Nuclear induction. *Phys Rev.* 1946; **69**:127.

Bolles GM, Yazdani M, Stalcup ST, Creedon SG, Collins HR, Nietert PJ, Roberts DR. Development of high signal intensity within the globus pallidus and dentate nucleus following multiple administrations of gadobenate dimeglumine. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2018; **39**:415-420.

Bolon B, Garman R, Jensen K, Krinke G, Stuart B; Ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. A 'best practices' approach to neuropathologic assessment in developmental neurotoxicity testing--for today. *Toxicol Pathol.* 2006; **34**:296-313. Erratum in: *Toxicol Pathol.* 2006; **34**:697.

Bose C, Megyesi JK, Shah SV, Hiatt KM, Hall KA, Karaduta O, Swaminathan S. Evidence suggesting a role of iron in a mouse model of nephrogenic systemic fibrosis. *PLoS One.* 2015; **10**:e0136563.

Bostan AC, Strick PL. The basal ganglia and the cerebellum: nodes in an integrated network. *Nat Rev Neurosci.* 2018; **19**:338-350.

Bottomley PA, Foster TH, Argersinger RE, Pfeifer LM. A review of normal tissue hydrogen NMR relaxation times and relaxation mechanisms from 1-100 MHz: dependence on tissue type, NMR frequency, temperature, species, excision, and age. *Med Phys.* 1984; **11**:425-448.

Bourrinet P, Martel E, El Amrani AI, Champeroux P, Richard S, Fauchou N, Le Coz F, Drici M, Bonnemain B, Gaillard S. Cardiovascular safety of gadoterate meglumine (Gd-DOTA). *Invest Radiol.* 2007; **42**:63-77.

Bousquet JC, Saini S, Stark DD, Hahn PF, Nigam M, Wittenberg J, Ferrucci JT Jr. Gd-DOTA: characterization of a new paramagnetic complex. *Radiology.* 1988; **166**:693-698.

Boyken J, Frenzel T, Lohrke J, Jost G, Schütz G, Pietsch H. Impact of treatment with chelating agents depends on the stability of administered GBCAs: a comparative study in rats. *Invest Radiol.* 2019; **54**:468-474.





- Bozzao A, Floris R, Fasoli F, Fantozzi LM, Colonnese C, Simonetti G. Cerebrospinal fluid changes after intravenous injection of gadolinium chelate: assessment by FLAIR MR imaging. *Eur Radiol.* 2003; **13**:592-597.
- Bradbury MW. Transport of iron in the blood-brain-cerebrospinal fluid system. *J Neurochem.* 1997; **69**:443-454.
- Braidy N, Poljak A, Marjo C, Rutledge H, Rich A, Jugder BE, Jayasena T, Inestrosa NC, Sachdev PS. Identification of cerebral metal ion imbalance in the brain of aging *Octodon degus*. *Front Aging Neurosci.* 2017; **29**:66.
- Braun M, Naidich T. Le cervelet. Anatomie et Imagerie. IRM 9.4 T *in vitro*. Faculté de Médecine Nancy Université de Lorraine. Disponible à : <http://docplayer.fr/22808832-Le-cervelet-anatomie-et-imagerie.html>
- Breen PJ, Hild EK, Horrocks WD. Spectroscopic studies of metal ion binding to a tryptophan-containing parvalbumin. *Biochemistry.* 1985; **24**:4991-4997
- Bressler JP, Olivi L, Cheong JH, Kim Y, Maerten A, Bannon D. Metal transporters in intestine and brain: their involvement in metal-associated neurotoxicities. *Hum Exp Toxicol.* 2007; **26**:221-229.
- Brettschneider J, Petzold A, Süßmuth SD, Ludolph AC, Tumani H. Axonal damage markers in cerebrospinal fluid are increased in ALS. *Neurology.* 2006; **66**:852-856.
- Brettschneider J, Petzold A, Süßmuth S, Tumani H. Cerebrospinal fluid biomarkers in Guillain-Barré syndrome--where do we stand? *J Neurol.* 2009; **256**:3-12.
- Brightman MW. The distribution within the brain of ferritin injected into cerebrospinal fluid compartments. I. Ependymal distribution. *J Cell Biol.* 1965; **26**:99-123.
- Brinker T, Stopa E, Morrison J, Klinge P. A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids Barriers CNS.* 2014; **11**:10.
- Brücher E. Kinetic stability of gadolinium (III) chelates used as MRI contrast agents. *Top Curr Chem.* 2002; **221**:103-122.
- Bruni JE. Ependymal development, proliferation, and functions: a review. *Microsc Res Tech.* 1998; **41**:2-13.
- Brunk UT, Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med.* 2002; **33**:611-619.
- Bulman RA. Metabolism and toxicity of the lanthanides. *Met Ions Biol Syst.* 2003; **40**:683-706.
- Bünzli J-CG and Eliseeva SV. Intriguing aspects of lanthanide luminescence. *Chem Sci.* 2013; **4**:1939-1949.
- Burke LM, Ramalho M, AlObaidy M, Chang E, Jay M, Semelka RC. Self-reported gadolinium toxicity: a survey of patients with chronic symptoms. *Magn Reson Imaging* 2016; **34**:1078-1080.
- Bui JD, Nammari DR, Buckley DL, Inglis BA, Silver XS, Mareci TH, Phillips MI. In vivo dynamics and distribution of intracerebroventricularly administered gadodiamide, visualized by magnetic resonance imaging. *Neuroscience.* 1999; **90**:1115-1122.
- Burtnick LD. Tb<sup>3+</sup> as a luminescent probe of actin structure: effects of polymerization, KI, and the binding of deoxyribonuclease I. *Arch Biochem Biophys.* 1982; **216**:81-87.



Bussi S, Coppo A, Botteron C, Fraimbault V, Fanizzi A, De Laurentiis E, Colombo Serra S, Kirchin MA, Tedoldi F, Maisano F. Differences in gadolinium retention after repeated injections of macrocyclic MR contrast agents to rats. *J Magn Reson Imaging*. 2018; **47**:746-752.

## C

Cabantchik ZI. Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology. *Front Pharmacol*. 2014; **5**:45.

Cabella C, Crich SG, Corpillo D, Barge A, Ghirelli C, Bruno E, Lorusso V, Uggeri F, Aime S. Cellular labeling with Gd(III) chelates: only high thermodynamic stabilities prevent the cells acting as 'sponges' of Gd<sup>3+</sup> ions. *Contrast Media Mol Imaging*. 2006; **1**:23-29.

Cacheris WP, Quay SC, Rocklage SM. The relationship between thermodynamics and the toxicity of gadolinium complexes. *Magn Reson Imaging*. 1990; **8**:467-81.

Caille JM, Bidabé AM, Dousset V, Berge J. The use of contrast media in the brain. 18<sup>th</sup> International Congress of Radiology, 1994; p. 757-758.

Caldwell RA, Clemo HF, Baumgarten CM. Using gadolinium to identify stretch-activated channels: technical considerations. *Am J Physiol*. 1998; **275**:C619-C621.

Campos AC, Fogaça MV, Aguiar DC, Guimarães FS. Animal models of anxiety disorders and stress. *Rev Bras Psiquiatr*. 2013; **35**:S101-S111.

Canto CB, Broersen R, De Zeeuw CI. Intrinsic excitement in cerebellar nuclei neurons during learning. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018; **115**:9824-9826.

Cao Y, Zhang Y, Shih G, Zhang Y, Bohmart A, Hecht EM, Prince MR. Effect of renal function on gadolinium-related signal increases on unenhanced T1-weighted brain magnetic resonance imaging. *Invest Radiol*. 2016; **51**:677-682.

Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem Rev*. 1999; **99**:2293-2352.

Caron NS, Wright GEB, Hayden MR. Huntington Disease. 1998. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018. Disponible à : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1305/>

Casabona A, Bosco G, Perciavalle P, Valle M. Processing of limb kinematics in the interpositus nucleus. *Cerebellum* 2010; **9**:103-110.

Castelhana-Carlos MJ, Baumans V. The impact of light, noise, cage cleaning and in-house transport on welfare and stress of laboratory rats. *Lab Anim*. 2009; **43**:311-327.

Cavagna FM, Maggioni F, Castelli PM, Daprà M, Imperatori LG, Lorusso V, Jenkins BG. Gadolinium chelates with weak binding to serum proteins. A new class of high-efficiency, general purpose contrast agents for magnetic resonance imaging. *Invest Radiol*. 1997; **32**:780-96.

Cenci MA, Whishaw Q, Schallert T. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci*. 2002; **3**:574-579.



Cerminara NL, Lang EJ, Sillitoe RV, Apps R. Redefining the cerebellar cortex as an assembly of non-uniform Purkinje cell microcircuits. *Nat Rev Neurosci*. 2015; **16**:79-93.

Chachuat A, Molinier P, Bonnemain B, Chambon C, Gayet JL. Pharmacokinetics and tolerance of Gd-DOTA (Dotarem) in healthy volunteers and in patients with chronic renal failure. *Eur Radiol*. 1992; **2**:326-329.

Chacko AM, Li C, Pryma DA, Brem S, Coukos G, Muzykantov V. Targeted delivery of antibody-based therapeutic and imaging agents to CNS tumors: crossing the blood-brain barrier divide. *Expert Opin Drug Deliv*. 2013; **10**:907-926.

Chaurasia CS, Müller M, Bashaw ED, Benfeldt E, Bolinder J, Bullock R, Bungay PM, DeLange EC, Derendorf H, Elmquist WF, Hammarlund-Udenaes M, Joukhadar C, Kellogg DL Jr, Lunte CE, Nordstrom CH, Rollema H, Sawchuk RJ, Cheung BW, Shah VP, Stahle L, Ungerstedt U, Welty DF, Yeo H. AAPS-FDA workshop white paper: microdialysis principles, application and regulatory perspectives. *Pharm Res*. 2007; **24**:1014-1025.

Chaumont J. Thèse es sciences. Organisation fonctionnelle de la boucle olivo-cortico-nucléaire : Influence de l'activité des cellules de Purkinje. Université de Strasbourg. 2014.

Chen MK, Guilarte TR. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther*. 2008; **118**:1-17.

Chen YJ, Cheng FC, Sheu ML, Su HL, Chen CJ, Sheehan J, Pan HC. Detection of subtle neurological alterations by the Catwalk XT gait analysis system. *J Neuroeng Rehabil*. 2014; **11**:62.

Civin CL, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 1984; **133**:157-165.

Clases D, Fingerhut S, Jeibmann A, Sperling M, Doble P, Karst U. LA-ICP-MS/MS improves limits of detection in elemental bioimaging of gadolinium deposition originating from MRI contrast agents in skin and brain tissues. *J Trace Elem Med Biol*. 2019; **51**:212-218.

Clément O, Dewachter P, Mouton-Faivre C, Nevoret C, Guilloux L, Bloch Morot E, Katsahian S, Laroche D, the investigators of the CIRTACI study. Immediate hypersensitivity to contrast agents: the French 5-year CIRTACI study. *EclinicalMedicine*. 2018; **1**:51-61.

Collidge TA, Thomson PC, Mark PB, Traynor JP, Jardine AG, Morris ST, Simpson K, Roditi GH. Gadolinium-enhanced MR imaging and nephrogenic systemic fibrosis: retrospective study of a renal replacement therapy cohort. *Radiology*. 2007; **245**:168-165. Erratum in: *Radiology*. 2010; **255**:308.

Conte G, Preda L, Cocorocchio E, Raimondi S, Giannitto C, Minotti M, De Piano F, Petralia G, Ferrucci PF, Bellomi M. Signal intensity change on unenhanced T1-weighted images in dentate nucleus and globus pallidus after multiple administrations of gadoxetate disodium: an intraindividual comparative study. *Eur Radiol*. 2017; **27**:4372-4378.

Corot C, Idée JM, Hentsch AM, Santus R, Mallet C, Goulas V, Bonnemain B, Meyer D. Structure–activity relationship of macrocyclic and linear gadolinium chelates: investigation of transmetallation effect on the zinc-dependent metallopeptidase angiotensin-converting enzyme. *J Magn Reson Imaging* 1998; **8**:695–702.

Corot C, Robert P, Idée JM, Port M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006; **58**:1471-1504.



Costello JR, Kalb B, Martin DR. Incidence and risk factors for gadolinium-based contrast agent immediate reactions. *Top Magn Reson Imaging*. 2016; **25**:257-263.

Cowper SE, Robin HS, Steinberg SM, Su LD, Gupta S, LeBoit PE. Scleromyxoedema-like cutaneous diseases in renal-dialysis patients. *Lancet*. 2000; **356**:1000-1001.

Cowper SE. Nephrogenic systemic fibrosis: the nosological and conceptual evolution of nephrogenic fibrosing dermopathy. *Am J Kidney Dis*. 2005; **46**:763-765.

Cowper SE. Nephrogenic systemic fibrosis: a review and exploration of the role of gadolinium. *Adv Dermatol*. 2007; **23**:131-154.

Cowper SE, Rabach M, Girardi M. Clinical and histological findings in nephrogenic systemic fibrosis. *Eur J Radiol*. 2008; **66**:191-199.

Cuffy MC, Singh M, Formica R, Simmons E, Abu Alfa AK, Carlson K, Girardi M, Cowper SE, Kulkarni S. Renal transplantation for nephrogenic systemic fibrosis: a case report and review of the literature. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; **26**:1099-1101.

Culley DJ, Baxter MG, Yukhananov R, Crosby G. Long-term impairment of acquisition of a spatial memory task following isoflurane-nitrous oxide anesthesia in rats. *Anesthesiol*. 2004; **100**:309e14.

Currie S, Hoggard N, Craven IJ, Hadjivassiliou M, Wilkinson ID. Understanding MRI: basic MR physics for physicians. *Postgrad Med J*. 2013; **89**:209-223.

Cutler RW, Deuel RK, Barlow CF. Albumin exchange between plasma and cerebrospinal fluid. *Arch Neurol*. 1967; **17**:261-270.

## D

D'Angelo E, De Zeeuw CI. Timing and plasticity in the cerebellum: focus on the granular layer. *Trends Neurosci*. 2009; **32**:30-40.

Da Cunha MM, Trepout S, Messaoudi C, Wu TD, Ortega R, Guerquin-Kern JL, Marco S. Overview of chemical imaging methods to address biological questions. *Micron*. 2016; **84**:23-36.

Damadian R. Tumor detection by nuclear magnetic resonance. *Science*. 1971; **171**:1151-1153.

Damadian R, Goldsmith M, Minkoff L. NMR in cancer: XVI. FONAR image of the live human body. *Physiol Chem Phys*. 1977; **9**:97-100, 108.

Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015; **7**:a020412.

Davson H. 1967. Physiology of CSF. Churchill, London.

De Kerviler E, Cuenod CA, Clément O, Halimi P, Fria J, Fria J. Qu'est-ce qui est blanc en T1 ? *J Radiol*. 1998; **79**:117-126.

De León-Rodríguez LM, Martins AF, Pinho MC, Rofsky NM, Sherry AD. Basic MR relaxation mechanisms and contrast agent design. *J Magn Reson Imaging*. 2015; **42**:545-565.



De Schaepdrijver LM, Bailey GP, Coogan TP, Ingram-Ross JL. Juvenile Animal Toxicity Assessments: Decision Strategies and Study Design. *Pediatric Drug Development: Concepts and Applications*. 2013:201-221.

Deacon RM, Rawlins JN. T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc*. 2006; **1**:7-12.

Deacon RM. Measuring the strength of mice. *J Vis Exp*. 2013; **76**:2705.

Deblonde GJ, Sturzbecher-Hoehne M, Mason AB, Abergel RJ. Receptor recognition of transferrin bound to lanthanides and actinides: a discriminating step in cellular acquisition of f-block metals. *Metallomics*. 2013; **5**:619-626.

Debroye E, Laurent S, Vander Elst L, Muller RN, Parac-Vogt TN. Dysprosium complexes and their micelles as potential bimodal agents for magnetic resonance and optical imaging. *Chemistry*. 2013; **19**:16019-16028.

Deeken JF, Loscher W. The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. *Clin Cancer Res*. 2007; **13**:1663-1674.

Delafiori J, Ring G, Furey A. Clinical applications of HPLC-ICP-MS element speciation: A review. *Talanta*. 2016; **153**:306-331.

Deray G, Bellin MF, Baumelou B, Rey JP, Boulechfar H, Grellet J, Jacobs C. Renal tolerance of the paramagnetic contrast medium Gd-DOTA in patients with chronic renal failure. *Am J Nephrol*. 1990; **10**:522-523.

Didelot JM, Siwiec L. Etat de l'art de la spectrométrie in vivo du proton par RMN. Projet DESS "TBH", Université Technologique de Compiègne. 00-01, p. 66. Disponible à : [http://www.utc.fr/~farges/DESS\\_TBH/00-01/Projets/spectro/srm.htm](http://www.utc.fr/~farges/DESS_TBH/00-01/Projets/spectro/srm.htm)

Dorman DC, Struve MF, Wong BA, Dye JA, Robertson ID. Correlation of brain magnetic resonance imaging changes with pallidal manganese concentrations in rhesus monkeys following subchronic manganese inhalation. *Toxicol Sci*. 2006; **92**:219-227.

Drel VR, Tan C, Barnes JL, Gorin Y, Lee DY, Wagner B. Centrality of bone marrow in the severity of gadolinium-based contrast-induced systemic fibrosis. *FASEB J*. 2016; **30**:3026-3038.

Dumoulin SO, Fracasso A, van der Zwaag W, Siero JCW, Petridou N. Ultra-high field MRI: Advancing systems neuroscience towards mesoscopic human brain function. *Neuroimage*. 2018; **168**:345-357.

Dünger D, Krause M, Gräfe D, Merckenschlager A, Roth C, Sorge I. Do we need gadolinium-based contrast medium for brain magnetic resonance imaging in children? *Pediatr Radiol*. 2018; **48**:858-864.

Duru OK, Vargas RB, Kermah D, Nissenson AR, Norris KC. High prevalence of stage 3 chronic kidney disease in older adults despite normal serum creatinine. *J Gen Intern Med*. 2009; **24**:86-92.

Duval ER, Javanbakht A, Liberzon I. Neural circuits in anxiety and stress disorders: a focused review. *Ther Clin Risk Manag*. 2015; **11**:115-126.

Duvernoy HM, Risold PY. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res Rev*. 2007; **56**:119-147.



## E

Eide PK, Ringstad G. MRI with intrathecal MRI gadolinium contrast medium administration: a possible method to assess glymphatic function in human brain. *Acta Radiol Open*. 2015; **4**:2058460115609635.

Eisele P, Alonso A, Szabo K, Ebert A, Ong M, Schoenberg SO, Gass A. Lack of increased signal intensity in the dentate nucleus after repeated administration of a macrocyclic contrast agent in multiple sclerosis: An observational study. *Medicine (Baltimore)*. 2016; **95**:e4624.

Ek CJ, Dziegielewska KM, Habgood MD, Saunders NR. Barriers in the developing brain and neurotoxicology. *Neurotoxicology*. 2012; **33**:586-604.

El Hamrani D. Thèse es sciences. Evaluation quantitative par IRM et 1H SRM de l'exposition à des xénobiotiques chez le petit animal dans un contexte clinique et environnemental. Université de Bordeaux. 2è Partie, chapitre 4, p.78-102. 2018.

Eliseeva SV, Bünzl J-CG. Rare earths: jewels for functional materials of the future. *New J Chem*. 2011; **35**:1165-1176.

Elster AD. Field-strength dependence of gadolinium enhancement: theory and implications. *AJNR Am J Neuroradiol* 1994; **15**:1420-1423.

EMA. European Medicine Agency. Assessment report for gadolinium-containing contrast agents. Procedure No. EMEA/H/A-31/1097. July 1, 2010. Disponible à : [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Referrals\\_document/gadolinium\\_31/WC500099538.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/gadolinium_31/WC500099538.pdf)

EMA HP: EMA's final opinion confirms restrictions on use of linear gadolinium agents in body scans, 2017. Disponible à : [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Referrals\\_document/gadolinium\\_contrast\\_agents\\_31/Opinion\\_provided\\_by\\_Committee\\_for\\_Medicinal\\_Products\\_for\\_Human\\_Use/WC500231824.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/gadolinium_contrast_agents_31/Opinion_provided_by_Committee_for_Medicinal_Products_for_Human_Use/WC500231824.pdf)

Emsley J. Nature's building blocks: an A-Z guide to the elements. Oxford University Press, New York, NY, USA. 2011.

Endrikat J, Dohanish S, Schleyer N, Schwenke S, Agarwal S, Balzer T. 10 Years of nephrogenic systemic fibrosis: A comprehensive analysis of nephrogenic systemic fibrosis reports received by a pharmaceutical company from 2006 to 2016. *Invest Radiol*. 2018; **53**:541-550.

Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res*. 2010; **215**:244-254.

Ennaceur A, Chazot PL. Preclinical animal anxiety research - flaws and prejudices. *Pharmacol Res Perspect*. 2016; **4**:e00223.

Erdene K, Nakajima T, Kameo S, Khairinisa MA, Lamid-Ochir O, Tumenjargal A, Koibuchi N, Koyama H, Tsushima Y. Organ retention of gadolinium in mother and pup mice: effect of pregnancy and type of gadolinium-based contrast agents. *Jpn J Radiol*. 2017; **35**:568-573.

Erikson KM, Syversen T, Steinnes E, Aschner M. Globus pallidus: a target brain region for divalent metal accumulation associated with dietary iron deficiency. *J Nutr Biochem*. 2004; **15**:335-341.





Errante Y, Cirimele V, Mallio CA, Di Lazzaro V, Zobel BB, Quattrocchi CC. 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*. 2014; **49**:685-690.

Esclapez M, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Tobin AJ, Houser CR. Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J Neurosci*. 1994; **14**:1834-1855.

ESUR Guidelines on Contrast agents, version 10.0, 2018. Disponible à : <http://www.esur-cm.org/index.php/en/>

Evans CH. Interesting and Useful Biochemical Properties of Lanthanides. Volume 8, Issue 12, p.445-449, 1983; 8:12.

Evans CH. Toxicology and pharmacology of the lanthanides. *Biochemistry of the Lanthanides*. Plenum Press, New York. 1990; p. 339-380.

## F

Faghihi R, Zeinali-Rafsanjani B, Mosleh-Shirazi MA, Saeedi-Moghadam M, Lotfi M, Jalli M, Iravani V. Magnetic resonance spectroscopy and its clinical applications: A review. *J Med Im Rad Sci* 2017; **48**: 233-253.

FDA, Guidance for Industry: estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. 2005. Disponible à : <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM078932.pdf%23search=%27guidekines+for+industry+sfe+starting%27>

FDA, Food and Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: new warnings for using gadolinium based contrast agents in patients with kidney dysfunction. October 9, 2010. Disponible à : <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm223966.htm>.

FDA, Drug Safety Communication: FDA evaluating the risk of brain deposits with repeated use of gadolinium based contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI). 2015. Disponible à : <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/UCM455390.pdf>

FDA, Food and Drug Administration. FDA drug safety communication: FDA warns that gadolinium-based contrast agents (GBCAs) are retained in the body; requires new class warnings. 2018. Disponible à : <https://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm589213.htm>

Feng YD, Li J, Zhou WC, Jia ZG, Wei Q. Identification of the critical structural determinants of the EF-hand domain arrangements in calcium binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2012; **1824**:608-619.

Ferbinteanu J. Contributions of hippocampus and striatum to memory-guided behavior depend on past experience. *J Neurosci*. 2016; **36**:6459-6470.

Ferrier, J., Marchand, F. and Balayssac, D. Assessment of mechanical allodynia in rats using the electronic Von Frey test. *Bio-protocol*. 2016; **6**:e1933.

Fingerhut S, Niehoff AC, Sperling M, Jeibmann A, Paulus W, Niederstadt T, Allkemper T, Heindel W, Holling M, Karst U. Spatially resolved quantification of gadolinium deposited in the brain of a patient treated with gadolinium-based contrast agents. *J Trace Elem Med Biol*. 2018a; **45**:125-130.



Fingerhut S, Sperling M, Holling M, Niederstadt T, Allkemper T, Radbruch A, Heindel W, Paulus W, Jeibmann A, Karst U. Gadolinium-based contrast agents induce gadolinium deposits in cerebral vessel walls, while the neuropil is not affected: an autopsy study. *Acta Neuropathol.* 2018b; **136**:127-138.

Firsching FH, Brune SN. Solubility products of the trivalent rare-earth phosphates. *J Chem Eng Data.* 1991; **36**:93-95

Flood TF, Stence NV, Maloney JA, Mirsky DM. Pediatric brain: repeated exposure to linear gadolinium-based contrast material is associated with increased signal intensity at unenhanced T1-weighted MR imaging. *Radiology.* 2017; **282**:222-228.

Flora SJ, Pachauri V. Chelation in metal intoxication. *Int J Environ Res Public Health.* 2010; **7**:2745-2788.

Flourens MJP. Recherches expérimentales sur les propriétés et les fonctions du système nerveux, dans les animaux vertébrés (éd. 1). Paris, Crevot. 1824 ; 26, 20.

Ford JM, Hait WN. Pharmacologic circumvention of multidrug resistance. *Cytotechnology.* 1993; **12**:171-212.

Forslin Y, Shams S, Hashim F, Aspelin P, Bergendal G, Martola J, Fredrikson S, Kristoffersen-Wiberg M, Granberg T. Retention of gadolinium-based contrast agents in multiple sclerosis: retrospective analysis of an 18-year longitudinal study. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2017; **38**:1311-1316.

Freeze WM, Schnerr RS, Palm WM, Jansen JF, Jacobs HI, Hoff EI, Verhey FR, Backes WH. Pericortical enhancement on delayed postgadolinium fluid-attenuated inversion recovery images in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer disease. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2017; **38**:1742-1747.

Frenzel T, Lengsfeld P, Schirmer H, Hütter J, Weinmann HJ. Stability of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents in human serum at 37 degrees C. *Invest Radiol.* 2008; **43**:817-828.

Frenzel T, Apte C, Jost G, Schöckel L, Lohrke J, Pietsch H. 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.* 2017; **52**:396-404.

Fretellier N, Idée JM, Guerret S, Hollenbeck C, Hartmann D, González W, Robic C, Port M, Corot C. Clinical, biological, and skin histopathologic effects of ionic macrocyclic and nonionic linear gadolinium chelates in a rat model of nephrogenic systemic fibrosis. *Invest Radiol.* 2011a; **46**:85-93.

Fretellier N, Idée JM, Dencausse A, Karroum O, Guerret S, Poveda N, Jestin G, Factor C, Raynal I, Zamia P, Port M, Corot C. Comparative in vivo dissociation of gadolinium chelates in renally impaired rats: a relaxometry study. *Invest Radiol.* 2011b; **46**:292-300.

Fretellier N, Bouzian N, Parmentier N, Bruneval P, Jestin G, Factor C, Mandet C, Daubiné F, Massicot F, Laprévotte O, Hollenbeck C, Port M, Idée JM, Corot C. Nephrogenic systemic fibrosis-like effects of magnetic resonance imaging contrast agents in rats with adenine-induced renal failure. *Toxicol Sci.* 2013; **131**:259-270.

Fretellier N, Granottier A, Rasschaert M, Grindel AL, Baudimont F, Robert P, Idée JM, Corot C. Does age interfere with gadolinium toxicity and presence in brain and bone tissues? A comparative gadoterate versus gadodiamide study in juvenile and adult rats. *Invest Radiol.* 2019; **54**:61-71.

Fretellier N. Thèse es sciences. Rôle des complexes de gadolinium dans le mécanisme de la fibrose systémique néphrogénique. Médecine Humaine et Pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013.



## G

- Gadolin J. Undersökning af en svart tung Stenart ifrån Ytterby Stenbrott i Roslagen. *K Vetenskaps-Akad Nya Handl.* 1794; **15**:137-155.
- Galera C, Ozygit L, Demoly P. Anaphylaxie aux produits de contraste gadolinés. *Rev Fr Allerg.* 2010; **50**:556-562.
- Garcia AM, Cardenas FP, Morato S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiol Behav.* 2005; **85**:265-270.
- Garman RH. Histology of the central nervous system. *Toxicol Pathol.* 2011; **39**:22-35.
- Garman RH, Recommended methods for brain processing and quantitative analysis in rodent developmental neurotoxicity Studies. *Toxicol Pathol.* 2016; **44**:14-42.
- Geara AS, El-Imad B, El-Sayegh S. Acetazolamide therapy in meningeal involvement of nephrogenic systemic fibrosis. *Intern Med J.* 2010; **40**:e4-e5.
- Georgakopoulou EA, Tsimaratou K, Evangelou K, Fernandez Marcos PJ, Zoumpourlis V, Trougakos IP, Kletsas D, Bartek J, Serrano M, Gorgoulis VG. Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Aging.* 2013; **5**:37-50.
- George SJ, Webb SM, Abraham JL, Cramer SP. Synchrotron X-ray analyses demonstrate phosphate-bound gadolinium in skin in nephrogenic systemic fibrosis. *Br J Dermatol.* 2010; **163**:1077-1081.
- Giakoumaki SG. Cognitive and prepulse inhibition deficits in psychometrically high schizotypal subjects in the general population: relevance to schizophrenia research. *J Int Neuropsychol Soc.* 2012; **18**:643-656.
- Gianolio E, Bardini P, Arena F, Stefania R, Di Gregorio E, Iani R, Aime S. Gadolinium retention in the rat brain: assessment of the amounts of insoluble gadolinium-containing species and intact gadolinium complexes after repeated administration of gadolinium-based contrast agents. *Radiology.* 2017; **285**:839-849.
- Gillies MJ, Hyam JA, Weiss AR, Antoniadou CA, Bogacz R, Fitzgerald JJ, Aziz TZ, Whittington MA, Green AL. The Cognitive role of the globus pallidus interna; insights from disease states. *Exp Brain Res.* 2017; **235**:1455-1465.
- Girard E, Chantalat L, Vicat J, Kahn R. Gd-HPDO3A, a complex to obtain high-phasing-power heavy-atom derivatives for SAD and MAD experiments: results with tetragonal hen egg-white lysozyme. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2002; **58**:1-9.
- Girardi M, Kay J, Elston DM, Leboit PE, Abu-Alfa A, Cowper SE. Nephrogenic systemic fibrosis: clinicopathological definition and workup recommendations. *J Am Acad Dermatol.* 2011; **65**:1095-1106.
- Glushakova OY, Jeromin A, Martinez J, Johnson D, Denslow N, Streeter J, Hayes RL, Mondello S. Cerebrospinal fluid protein biomarker panel for assessment of neurotoxicity induced by kainic acid in rats. *Toxicol Sci.* 2012; **130**:158-167.
- Gold BI. Further studies on the role of calcium in the regulation of glutamate decarboxylase activity in brain slices. *Neurochem Res.* 1983; **8**:185-191.



Goldman JG, Vernaleo BA, Camicioli R, Dahodwala N, Dobkin RD, Ellis T, Galvin JE, Marras C, Edwards J, Fields J, Golden R, Karlawish J, Levin B, Shulman L, Smith G, Tangney C, Thomas CA, Tröster AI, Uc EY, Coyan N, Ellman C, Ellman M, Hoffman C, Hoffman S, Simmonds D. Cognitive impairment in Parkinson's disease: a report from a multidisciplinary symposium on unmet needs and future directions to maintain cognitive health. *NPJ Parkinsons Dis*. 2018; **26**:4-19.

Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE. 19-Nordeoxycorticosterone, aldosterone, and corticosterone excretion in sequential urine samples from male and female rats. *Steroids*. 1991; **56**:451-454.

Gorter CJ, Paramagnetic relaxation. *Physica (The Hague)*. 1936; **3**:504-505.

Götz ME, Double K, Gerlach M, Youdim MB, Riederer P. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; **1012**:193-208.

Grekin SJ, Holcomb MJ, Modi GM, Huttenbach YT, Poythress EL, Diwan AH. Lollipop lesions in nephrogenic systemic fibrosis mimicking a deep fungal infection. *J Cutan Pathol*. 2012; **39**: 981-984.

Gretz N, Waldherr R, Strauch M. In: Gretz N, Strauch M, eds. *The Remnant Kidney Model*. Karger, Basel, Switzerland. 1993. p. 1-28.

Gries H. Extracellular MRI contrast agents based on gadolinium. *Top. Curr. Chem*. 2002; **221**:1-24.

Grobner T. Gadolinium: a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol Dial Transplant*. 2006; **21**: 1104-1108. Erratum in: *Nephrol Dial Transplant*. 2006; **21**:1745.

Gross PM. Circumventricular organ capillaries. *Prog Brain Res*. 1992; **91**:219-233.

Guerquin-Kern JL, Wu TD, Quintana C, Croisy A. Progress in analytical imaging of the cell by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS microscopy). *Biochim Biophys Acta*. 2005; **1724**:228-238.

Guilmette RA, Hakimi R, Durbin PW, Xu J, Raymond KN. Competitive binding of Pu and Am with bone mineral and novel chelating agents. *Radiat Prot Dosimetry*. 2003; **105**:527-534.

Gulani V, Calamante F, Shellock FG, Kanal E, Reeder SB, International Society for Magnetic Resonance in Medicine. Gadolinium deposition in the brain: summary of evidence and recommendations. *Lancet Neurol*. 2017; **16**:564-570.

Gutiérrez AM, González E, Echevarría M, Hernández CS, Whittembury G. The proximal straight tubule (PST) basolateral cell membrane water channel: selectivity characteristics. *J Membr Biol*. 1995; **143**:189-197.

Güven M, Elalmış DD, Binokay S, Tan U. Population-level right-paw preference in rats assessed by a new computerized food-reaching test. *Int J Neurosci*. 2003; **113**:1675-1689.

Gwenzi W, Mangori L, Danha C, Chaukura N, Dunjana N, Sanganyado E. Sources, behaviour, and environmental and human health risks of high-technology rare earth elements as emerging contaminants. *Sci Total Environ*. 2018; **636**:299-313.

## H

Habas C, Kamdar N, Nguyen D, Prater K, Beckmann CF, Menon V, Greicius MD. Distinct cerebellar contributions to intrinsic connectivity networks. *J Neurosci*. 2009; **29**:8586-8594.



- Habas C. Functional imaging of the deep cerebellar nuclei: a review. *Cerebellum*. 2010; 9:22-28.
- Habermeyer J, von Hörste S, Schütz G, Pietsch H. Behavioral phenotyping in rats 5 to 30 weeks after multiple injections of gadobutrol and gadodiamide. European Congress of Radiology. 2018. Vienna. Abstract C-2326.
- Haelewyn B, Freret T, Pacary E, Schumann-Bard P, Boulouard M, Bernaudin M, Bouët V. Long-term evaluation of sensorimotor and mnesic behaviour following striatal NMDA-induced unilateral excitotoxic lesion in the mouse. *Behav Brain Res*. 2007; **178**:235-243.
- Haley TJ, Raymond K, Komesu N, Upham HC. Toxicological and pharmacological effects of gadolinium and samarium chlorides. *Br J Pharmacol Chemother*. 1961; **17**:526-532.
- Haley PJ. Pulmonary toxicity of stable and radioactive lanthanides. *Health Phys*. 1991; **61**:809-820.
- Hallgren B, Sourander P. The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J Neurochem*. 1958; **3**:41-51.
- Hamm B, Staks T, Mühler A, Bollow M, Taupitz M, Frenzel T, Wolf KJ, Weinmann HJ, Lange L. Phase I clinical evaluation of Gd-EOB-DTPA as a hepatobiliary MR contrast agent: safety, pharmacokinetics, and MR imaging. *Radiology*. 1995; **195**:785-792.
- Hanana H, Turcotte P, André C, Gagnon C, Gagné F. Comparative study of the effects of gadolinium chloride and gadolinium - based magnetic resonance imaging contrast agent on freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere*. 2017; **181**:197-207.
- Hannocks MJ, Pizzo ME, Huppert J, Deshpande T, Abbott NJ, Thorne RG, Sorokin L. Molecular characterization of perivascular drainage pathways in the murine brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018; **38**:669-686.
- Hardonk MJ, Dijkhuis FW, Hulstaert CE, Koudstaal J. Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation. *J Leukoc Biol*. 1992; **52**:296-302.
- Harpur ES, Worah D, Hals PA, Holtz E, Furuhashi K, Nomura H. Preclinical safety assessment and pharmacokinetics of gadodiamide injection, a new magnetic resonance imaging contrast agent. *Invest Radiol*. 1993; **28**:S28-S43.
- Hasan KM, Walimuni IS, Kramer LA, Narayana PA. Human brain iron mapping using atlas-based T2 relaxometry. *Magn Reson Med*. 2012; **67**:731-739.
- Havnes MB, Kerlefsen Y, Møllerløkken A. S100B and NSE serum concentrations after simulated diving in rats. *Physiol Rep*. 2015; **3**:e12546.
- He X, Zhang Z, Zhang H, Zhao Y, Chai Z. Neurotoxicological evaluation of long-term lanthanum chloride exposure in rats. *Toxicol Sci*. 2008; **103**:354-361.
- He N, Huang P, Ling H, Langley J, Liu C, Ding B, Huang J, Xu H, Zhang Y, Zhang Z, Hu X, Chen S, Yan F.. Dentate nucleus iron deposition is a potential biomarker for tremor-dominant Parkinson's disease. *NMR Biomed*. 2017; **30**:e3554.
- Herazo-Bustos C, Tramontini JC, Mora SJAs, Aluja JF, Navas C. Evaluación de la intensidad de señal en núcleo dentado, puente, globus pallidus y tálamo en pacientes con esclerosis múltiple: Valoración de la retención de gadolinio. *Rev Chil Radiol*. 2017; **23**:02-06.



Herculano-Houzel S. Coordinated scaling of cortical and cerebellar numbers of neurons. *Front Neuroanat.* 2010; **10**:4-12.

Herndon RM. The fine structure of the Purkinje cell. *J Cell Biol.* 1963; **18**:167-180.

Hesselink JR, Press GA. MR contrast enhancement of intracranial lesions with Gd-DTPA. *Radiol Clin North Am.* 1988; **26**:873-887.

High WA, Ayers RA, Chandler J, Zito G, Cowper SE. Gadolinium is detectable within the tissue of patients with nephrogenic systemic fibrosis. *J Am Acad Dermatol.* 2007; **56**:21-26.

Hider RC, Roy S, Ma YM, Le Kong X, Preston J. The potential application of iron chelators for the treatment of neurodegenerative diseases. *Metallomics.* 2011; **3**:239-249.

Hippocrate de Cros. Epidémies. 410 av. J.C.

Hirano S, Suzuki KT. Exposure, metabolism, and toxicity of rare earths and related compounds. *Environ Health Perspect.* 1996; **104**:85-95.

Hitomi E, Simpkins AN, Luby M, Latour LL, Leigh RJ, Leigh R. Blood-ocular barrier disruption in patients with acute stroke. *Neurology.* 2018; **90**:e915-e923.

Hladky SB, Barrand MA. Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence. *Fluids Barriers CNS.* 2014; **11**:26.

Ho LT, Sprague SM. Renal osteodystrophy in chronic renal failure. *Semin Nephrol.* 2002; **22**:488-493.

Höck A, Demmel U, Schicha H, Kasperek K, Feinendegen LE. Trace element concentration in human brain. Activation analysis of cobalt, iron, rubidium, selenium, zinc, chromium, silver, cesium, antimony and scandium. *Brain.* 1975; **98**:49-64.

Holter KE, Kehlet B, Devor A, Sejnowski TJ, Dale AM, Omholt SW, Ottersen OP, Nagelhus EA, Mardal K-A, Pettersen KH. Interstitial solute transport in 3D reconstructed neuropil occurs by diffusion rather than bulk flow. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017; **114**:9894-9899.

Hope TA, High WA, Leboit PE, Chaopathomkul B, Rogut VS, Herfkens RJ, Brasch RC. Nephrogenic systemic fibrosis in rats treated with erythropoietin and intravenous iron. *Radiology.* 2009; **253**:390-398.

Hu HH, Pokorney A, Towbin RB, Miller JH. Increased signal intensities in the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted images: evidence in children undergoing multiple gadolinium MRI exams. *Pediatr Radiol.* 2016; **46**:1590-1598.

Hui FK, Mullins M. Persistence of gadolinium contrast enhancement in CSF: a possible harbinger of gadolinium neurotoxicity? *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009; **30**:e1.

Hurst C. 2010. China's rare earth element industry: What can the West learn? Institute for the analysis of Global Security, Washington DC, USA. Disponible à : <http://www.iags.org/rareearth0310hurst.pdf>

Husztik, E., G. Lázár, and A. Párducz. Electron microscopic study of Kupffer-cell phagocytosis blockade induced by gadolinium chloride. *Br J Exp Pathol.* 1980; **61**:624-630.





Iadecola C. The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease. *Neuron*. 2017; **96**:17-42.

Ichikawa S, Motosugi U, Omiya Y, Onishi H. Contrast agent-induced high signal intensity in dentate nucleus on unenhanced T1-weighted images: comparison of gadodiamide and gadoxetic acid. *Invest Radiol*. 2017; **52**:389-395.

Ichikawa S, Omiya Y, Onishi H, Motosugi U. Linear gadolinium-based contrast agent (gadodiamide and gadopentetate dimeglumine)-induced high signal intensity on unenhanced T(1) -weighted images in pediatric patients. *J Magn Reson Imaging*. 2019; **48**:1046-1052.

Idée JM, Berthommier C, Goulas V, Corot C, Santus R, Hermine C, Schaefer M, Bonnemain B. Haemodynamic effects of macrocyclic and linear gadolinium chelates in rats: role of calcium and transmetallation. *Biometals*. 1998; **11**:113-123.

Idée JM, Port M, Raynal I, Schaefer M, Le Greneur S, Corot C. Clinical and biological consequences of transmetallation induced by contrast agents for magnetic resonance imaging: a review. *Fundam Clin Pharmacol*. 2006; **20**:563-576. Erratum in: *Fundam Clin Pharmacol*. 2007; **21**:335.

Idée JM, Port M, Dencausse A, Lancelot E, Corot C. Involvement of gadolinium chelates in the mechanism of nephrogenic systemic fibrosis: an update. *Radiol Clin North Am*. 2009b; **47**:855-869.

Idée JM, Port M, Robic C, Medina C, Sabatou M, Corot C. Role of thermodynamic and kinetic parameters in gadolinium chelate stability. *J Magn Reson Imaging*. 2009a; **30**:1249-1258.

Idland AV, Wyller TB, Støen R, Dahl GT, Frihagen F, Brækhus A, Hassel B, Watne LO. Cerebrospinal Fluid Phosphate in Delirium after Hip Fracture. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. 2017; **7**:309-317.

Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, Nagelhus EA, Nedergaard M. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid  $\beta$ . *Sci Transl Med*. 2012; **4**:147ra111.

Iliff JJ, Wang M, Zeppenfeld DM, Venkataraman A, Plog BA, Liao Y, Deane R, Nedergaard M. Cerebral arterial pulsation drives paravascular CSF-interstitial fluid exchange in the murine brain. *J Neurosci*. 2013; **33**:18190-18199.

Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia*. 1968; **13**:222-257.

Ishibashi H, Hirao K, Yamaguchi J, Nabekura J. Inhibition of chloride outward transport by gadolinium in cultured rat spinal cord neurons. *Neurotoxicology*. 2009; **30**:155-159.

Islam MK, Kim S, Kim HK, Kim YH, Lee YM, Choi G, Baek AR, Sung BK, Kim M, Cho AE, Kang H, Lee GH, Choi SH, Lee T, Park JA, Chang Y. Synthesis and evaluation of manganese(II)-based ethylenediaminetetraacetic acid-ethoxybenzyl conjugate as a highly stable hepatobiliary magnetic resonance imaging contrast agent. *Bioconjug Chem*. 2018 ; **29**:3614-3625.



## J

- Jaffe TA, Miller CM, Merkle EM. Practice patterns in imaging of the pregnant patient with abdominal pain: a survey of academic centers. *AJR Am J Roentgenol.* 2007; **189**:1128-1134.
- Jakovljević I, Petrović Đ, Joksović L, Lazarević I, Đurđević P. Computer simulation of speciation of trivalent aluminum, gadolinium and yttrium ions in human blood plasma. *Acta Chim Slov.* 2013; **60**:861-869.
- Jaw TS, Chen SH, Wang YM, Hsu JS, Kuo YT, Chiu YY, Tsai KB, Hsieh TJ, Liu GC. Comparison of Gd-Bz-TTDA, Gd-EOB-DTPA, and Gd-BOPTA for dynamic MR imaging of the liver in rat models. *Kaohsiung J Med Sci.* 2012; **28**:130-137.
- Jaworski K, Styczyńska M, Mandecka M, Walecki J, Kosior DA. Fahr Syndrome – an Important Piece of a Puzzle in the Differential Diagnosis of Many Diseases. *Pol J Radiol.* 2017; **82**:490-493.
- Jefferies WA, Brandon MR, Hunt SV, Williams AF, Gatter KC, Mason DY. Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature.* 1984; **312**:162-163.
- Jeong HK, Ji K, Min K, Joe EH. Brain inflammation and microglia: facts and misconceptions. *Exp Neurobiol.* 2013; **22**:59-67.
- Jessen NA, Munk AS, Lundgaard I, Nedergaard M. The Glymphatic system: A beginner's guide. *Neurochem Res.* 2015; **40**:2583-2599.
- Jiang X, Lachance M, Rossignol E. Involvement of cortical fast-spiking parvalbumin-positive basket cells in epilepsy. In: *Progress in Brain Research, 226 Neurobiology of Epilepsy. From Genes to Networks* Eds: E Rossignol, L Carmant, JC Lacaille, Elsevier 2011.
- Jiménez AJ, Domínguez-Pinos MD, Guerra MM, Fernández-Llebrez P, Pérez-Fígares JM. Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers.* 2014; **2**:e28426.
- Joëls M, de Kloet ER. 30 years of the mineralocorticoid receptor: The brain mineralocorticoid receptor: a saga in three episodes. *J Endocrinol.* 2017; **234**:T49-T66.
- Joffé P, Thomsen HS, Meusel M. Pharmacokinetics of gadodiamide injection in patients with severe renal insufficiency and patients undergoing hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Acad Radiol.* 1998; **5**:491-502.
- Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, Kowalski ML, Mygind N, Ring J, van Cauwenberge P, van Hage-Hamsten M, Wüthrich B; EAACI (the European Academy of Allergology and Clinical Immunology) nomenclature task force. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy.* 2001; **56**:813-824.
- Johansson PA, Dziegielewska KM, Ek CJ, Habgood MD, Mollgard K, Potter A, Schuliga M, Saunders NR: Aquaporin-1 in the choroid plexuses of developing mammalian brain. *Cell Tissue Res.* 2005; **322**:353-364.
- Jost G, Lenhard DC, Sieber MA, Lohrke J, Frenzel T, Pietsch H. Signal increase on unenhanced T1-weighted images in the rat brain after repeated, extended doses of gadolinium-based contrast agents: comparison of linear and macrocyclic agents. *Invest Radiol.* 2016; **51**:83-89.



Jost G, Frenzel T, Lohrke J, Lenhard DC, Naganawa S, Pietsch H. 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*. 2017; **27**:2877-2885.

Jost G, Frenzel T, Boyken J, Lohrke J, Nischwitz V, Pietsch H. Long-term Excretion of gadolinium-based contrast agents: linear versus macrocyclic agents in an experimental rat model. *Radiology*. 2019;**290**:340-348

Jung SE, Byun JY, Lee JM, Rha SE, Kim H, Choi BG, Hahn ST. MR imaging of maternal diseases in pregnancy. *Am J Roentgenol*. 2001; **177**:1293-1300.

## K

Kahn J, Posch H, Steffen IG, Geisel D, Bauknecht C, Liebig T, Denecke T. Is there long-term signal intensity increase in the central nervous system on T1-weighted images after MR imaging with the hepatospecific contrast agent gadoxetic acid? A cross-sectional study in 91 patients. *Radiology*. 2017; **282**:708-716.

Kanamalla US, Boyko OB. Gadolinium diffusion into orbital vitreous and aqueous humor, perivascular space, and ventricles in patients with chronic renal disease. *AJR Am J Roentgenol*. 2002; **179**:1350-1352.

Kanda T, Ishii K, Kawaguchi H, Kitajima K, Takenaka D. 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*. 2014; **270**:834-841.

Kanda T, Osawa M, Oba H, Toyoda K, Kotoku J, Haruyama T, Takeshita K, Furui S. High signal intensity in dentate nucleus on unenhanced T1-weighted MR images: association with linear versus macrocyclic gadolinium chelate administration. *Radiology*. 2015a; **275**:803-809.

Kanda T, Fukusato T, Matsuda M, Toyoda K, Oba H, Kotoku J, Haruyama T, Kitajima K, Furui S. 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*. 2015b; **276**:228-232.

Kang H, Hii M, Le M, Tam R, Riddehough A, Traboulee A, Kolind S, Freedman MS, Li DKB. Gadolinium deposition in deep brain structures: relationship with dose and ionization of linear gadolinium-based contrast agents. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2018; **39**:1597-1603.

Kang KM, Choi SH, Hwang M, Yun TJ, Kim JH, Sohn CH. T1 shortening in the globus pallidus after multiple administrations of gadobutrol: assessment with a multidynamic multiecho sequence. *Radiology*. 2018; **287**:258-266.

Kapoor RA, Ladak SS, Gomase VS. MALDI-TOF based metabolomic approach. *Int J Gen*. 2009; **1**:44-46.

Kapoor R, Liu J, Devasenapathy A, Gordin V. Gadolinium encephalopathy after intrathecal gadolinium injection. *Pain Physician*. 2010; **13**:E321-E326.

Kartamihardja AA, Nakajima T, Kameo S, Koyama H, Tsushima Y. Impact of impaired renal function on gadolinium retention after administration of gadolinium-based contrast agents in a mouse model. *Invest Radiol*. 2016a; **51**:655-660.

Kartamihardja AA, Nakajima T, Kameo S, Koyama H, Tsushima Y. Distribution and clearance of retained gadolinium in the brain: differences between linear and macrocyclic gadolinium based contrast agents in a mouse model. *Br J Radiol*. 2016b; **89**:20160509.



Kasahara S, Miki Y, Kanagaki M, Yamamoto A, Mori N, Sawada T, Taoka T, Okada T, Togashi K. Hyperintense dentate nucleus on unenhanced T1-weighted MR images is associated with a history of brain irradiation. *Radiology*. 2011; **258**:222-228.

Kasper E, Schemuth HP, Horry S, Kinner S. Changes in signal intensity in the dentate nucleus at unenhanced T1-weighted magnetic resonance imaging depending on class of previously used gadolinium-based contrast agent. *Pediatr Radiol*. 2018;**48**:686-693.

Kastler B, Vetter D, Patay Z, Pousse A, Parmentier M. Images T1, T2 et densité protonique. *Encycl Méd Chir (Elsevier)*. 2003; 35-010-C10.

Kaur C, Rathnasamy G, Ling EA. The choroid plexus in healthy and diseased brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2016; **75**:198-213.

Kay J, High WA. Imatinib mesylate treatment of nephrogenic systemic fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2008; **58**: 2543-2548.

Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J*. 2015; **282**:4067-4079.

Kelemen P, Alaoui J, Sieron D, Chan A, Kamm CP, Heldner MR, Gralla J, Wiest R, Verma RK. T1-weighted grey matter signal intensity alterations after multiple administrations of gadobutrol in patients with multiple sclerosis, referenced to white matter. *Sci Rep*. 2018; **8**:16844.

Kellogg, J.M.B.; Rabi, I.I.; Ramsey, N.F. Jr.; Zacharias, J.R. The magnetic moment of the proton and the deuteron. The radiofrequency spectrum of 2H in various magnetic fields. *Phys Rev*. 1939; **56**:728-743.

Kelly B, Petitt M, Sanchez R. Nephrogenic systemic fibrosis is associated with transforming growth factor beta and Smad without evidence of renin-angiotensin system involvement. *J Am Acad Dermatol*. 2008; **58**:1025-1030.

Kervezee L, Hartman R, van den Berg DJ, Shimizu S, Emoto-Yamamoto Y, Meijer JH, de Lange EC. Diurnal variation in P-glycoprotein-mediated transport and cerebrospinal fluid turnover in the brain. *AAPS J*. 2014; **16**:1029-1037.

Khadilkar S, Jaggi S, Patel B, Yadav R, Hanagandi P, Faria do Amaral LL. A practical approach to diseases affecting dentate nuclei. *Clin Radiol*. 2016; **71**:107-119.

Khairinisa MA, Takatsuru Y, Amano I, Erdene K, Nakajima T, Kameo S, Koyama H, Tsushima Y, Koibuchi N. The effect of perinatal gadolinium-based contrast agents on adult mice behavior. *Invest Radiol*. 2018; **53**:110-118.

Khant ZA, Hirai T, Kadota Y, Masuda R, Yano T, Azuma M, Suzuki Y, Tashiro K. T(1) shortening in the cerebral cortex after multiple administrations of gadolinium-based contrast agents. *Magn Reson Med Sci*. 2017; **16**:84-86.

Kim SY, Maurer MH, Richter JK, Heverhagen JT, Boehm IB. Gadolinium depositions after the application of the hepatospecific gadolinium-based contrast agent gadoxetate disodium. *Eur J Intern Med*. 2018; **47**:e9-e11.

Kimura J, Ishiguchi T, Matsuda J, Ohno R, Nakamura A, Kamei S, Ohno K, Kawamura T, Murata K. Human comparative study of zinc and copper excretion via urine after administration of magnetic resonance imaging contrast agents. *Radiat Med*. 2005; **23**:322-326.



- Kinner S, Schubert TB, Bruce RJ, Rebsamen SL, Diamond CA, Reeder SB, Rowley HA. Deep brain nuclei T1 shortening after gadobenate dimeglumine in children: influence of radiation and chemotherapy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2018; **39**:24-30.
- Kirchin MA, Pirovano GP, Spinazzi A. Gadobenate dimeglumine (Gd-BOPTA): an overview. *Invest Radiol*. 1998; **33**:798-809.
- Kissel K, Hamm S, Schulz M, Vecchi A, Garlanda C, Engelhardt B. Immunohistochemical localization of the murine transferrin receptor (TfR) on blood-tissue barriers using a novel anti-TfR monoclonal antibody. *Histochem Cell Biol*. 1998; **110**:63-72.
- Knappe A, Möller P, Dulski P, Pekdeger A. Positive gadolinium anomaly in surface water and ground water of the urban area Berlin, Germany. *Chem Erde*. 2005; **65**:167-189.
- Knoepp F, Bettmer J, Fronius M. Gadolinium released by the linear gadolinium-based contrast-agent Gd-DTPA decreases the activity of human epithelial Na(+) channels (ENaCs). *Biochim Biophys Acta*. 2017; **1859**:1040-1048.
- Kochanek PM, Berger RP, Fink EL, Au AK, Bayir H, Bell MJ, Dixon CE, Clark RS. The potential for bio-mediators and biomarkers in pediatric traumatic brain injury and neurocritical care. *Front Neurol*. 2013; **4**:40.
- Koeppen AH. The history of iron in the brain. *J Neurol Sci*. 1995; **134**:1-9.
- Koeppen AH, Michael SC, Knutson MD, Haile DJ, Qian J, Levi S, Santambrogio P, Garrick MD, Lamarche JB. The dentate nucleus in Friedreich's ataxia: the role of iron-responsive proteins. *Acta Neuropathol*. 2007; **114**:163-173.
- Koeppen AH, Ramirez RL, Yu D, Collins SE, Qian J, Parsons PJ, Yang KX, Chen Z, Mazurkiewicz JE, Feustel PJ. Friedreich's ataxia causes redistribution of iron, copper, and zinc in the dentate nucleus. *Cerebellum*. 2012; **11**:845-860.
- Koppel H, Lewis PD, Wigglesworth JS. A study of the vascular supply to the external granular layer of the postnatal rat cerebellum. *J Anat*. 1982; **134**:73-84.
- Koziol LF, Budding DE, Chidekel D. From movement to thought: executive function, embodied cognition, and the cerebellum. *Cerebellum*. 2012; **11**:505-525.
- Kozler P, Sobek O, Pokorný J. Signs of myelin impairment in cerebrospinal fluid after osmotic opening of the blood-brain barrier in rats. *Physiol Res*. 2015; **64**:S603-S608.
- Kralik SF, Singhal KK, Frank MS, Ladd LM. Evaluation of gadolinium deposition in the brain after MR arthrography. *AJR Am J Roentgenol*. 2018; **211**:1063-1067
- Kramer KK, Liu J, Choudhuri S, Klaassen CD. Induction of metallothionein mRNA and protein in murine astrocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996; **136**:94-100.
- Kromrey ML, Liedtke KR, Ittermann T, Langner S, Kirsch M, Weitschies W, Kühn JP. Intravenous injection of gadobutrol in an epidemiological study group did not lead to a difference in relative signal intensities of certain brain structures after 5 years. *Eur Radiol*. 2017; **27**:772-777. Erratum in: *Eur Radiol*. 2017; **27**:778.
- Kumar A. NMDA receptor function during senescence: implication on cognitive performance. *Front Neurosci*. 2015; **9**:473.



Kumar BP, D'Souza SL, Shivakumar K, Rathinam K. Cerium stimulates protein biosynthesis in rat heart in vivo. *Biol Trace Elem Res.* 1995; **50**:237-242.

Kuno H, Jara H, Buch K, Qureshi MM, Chapman MN, Sakai O. Global and regional brain assessment with quantitative mr imaging in patients with prior exposure to linear gadolinium-based contrast agents. *Radiology.* 2017; **283**:195-204.

Kuo PH, Kanal E, Abu-Alfa AK, Cowper SE. Gadolinium-based MR contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis. *Radiology.* 2007; **242**:647-649.

Küper M, Dimitrova A, Thürling M, Maderwald S, Roths J, Elles HG, Gizewski ER, Ladd ME, Diedrichsen J, Timmann D. Evidence for a motor and a non-motor domain in the human dentate nucleus—an fMRI study. *Neuroimage.* 2011; **54**:2612-22.

## L

Le Bas JF, Esteve F, Grand S, Rubin C, Rémy C, Benabib AL, Décorps M. Spectroscopie RMN et pathologie cérébrale. *J. Neuroradiol.* 1998; **25**:55-69

Lancelot E. Revisiting the pharmacokinetic profiles of gadolinium-based contrast agents: differences in long-term biodistribution and excretion. *Invest Radiol.* 2016; **51**:691-700.

Langlet F, Mullier A, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B. Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *J Comp Neurol.* 2013; **521**:3389-3405.

Langner S, Kromrey ML, Kuehn JP, Grothe M, Domin M. Repeated intravenous administration of gadobutrol does not lead to increased signal intensity on unenhanced T1-weighted images—a voxel-based whole brain analysis. *Eur Radiol.* 2017; **27**:3687-3693.

La Noce A, Frigeni V, Filatori I, Danieli A, Tirone P. Gadobenate dimeglumine and cerebral glucose metabolism. Continuous monitoring of striatal lactate levels in freely moving rats. *Acta Radiol.* 2000; **41**:394-349.

Lansman, J. Blockade of current through single calcium channels by trivalent lanthanide cations. Effect of ionic radius on the rates of ion entry and exit. *J Gen Physiol.* 1990; **95**:679-696.

Larsell O, Jansen J. The comparative anatomy and histology of the cerebellum. The Human Cerebellum, Cerebellar Connections, and Cerebellar Cortex. The University of Minnesota Press; Minneapolis, USA. 1972.

Lau WL, Huisa BN, Fisher M. The cerebrovascular-chronic kidney disease connection: perspectives and mechanisms. *Transl Stroke Res.* 2017; **8**:67-76.

Lauffer RB. Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and design. *Chem Rev.* 1987; **87**:901-927.

Laurent S, Elst LV, Copoix F, Muller RN. Stability of MRI paramagnetic contrast media: a proton relaxometric protocol for transmetallation assessment. *Invest Radiol.* 2001; **36**:115-122.

Laurent S, Elst LV, Muller RN. Comparative study of the physicochemical properties of six clinical low molecular weight gadolinium contrast agents. *Contrast Med. Mol. Imaging.* 2006; **1**:128-137.





Laurent S, Vander Elst L, Henoumont C, Muller RN. How to measure the transmetallation of a gadolinium complex. *Contrast Media Mol Imaging*. 2010; **5**:305-308.

Lauterbur PC. Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature*. 1973; **242**:190-191.

Lawson D, Barger A, Terreno E, Parker D, Aime S, Botta M. Optimizing the high-field relaxivity by self-assembling of macrocyclic Gd(III) complexes. *Dalton Transactions*. 2015; **44**:4910-4917.

Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, Grenier P, Cabanis E, Laval-Jeantet M. MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology*. 1986; **161**:401-407.

Ledneva E, Karie S, Launay-Vacher V, Janus N, Deray G. Renal safety of gadolinium-based contrast media in patients with chronic renal insufficiency. *Radiology*. 2009; **250**:618-628.

Lee L, Sykes BD. Nuclear magnetic resonance determination of metal-proton distances in the EF site of carp parvalbumin using the susceptibility contribution to the line broadening of lanthanide-shifted resonances. *Biochemistry*. 1980; **19**:3208-3214.

Lee JY, Park JE, Kim HS, Kim SO, Oh JY, Shim WH, Jung SC, Choi CG, Kim SJ. Up to 52 administrations of macrocyclic ionic MR contrast agent are not associated with intracranial gadolinium deposition: Multifactorial analysis in 385 patients. *PLoS One*. 2017; **12**:e0183916.

Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, Freret T. Object recognition test in mice. *Nat Protoc*. 2013; **8**:2531-2537.

Leite RAA, Otaduy MCG, Silva GEG, Ferreira MLB, Aragao MFV. Diagnostic methods for extra-temporal neocortical focal epilepsies. *Arq. Neuro-Psiquiatr*. 2010; **68**: 119-126.

Leung V, Zhang E, Pang DS. Real-time application of the Rat Grimace Scale as a welfare refinement in laboratory rats. *Sci Rep*. 2016; **6**:31667.

Lev MH, Schaefer PW. Subarachnoid gadolinium enhancement mimicking subarachnoid hemorrhage on FLAIR MR images. Fluid attenuated inversion recovery (letter). *AJR Am J Roentgenol*. 1999; **173**:1414-1415.

Levine JM, Taylor RA, Elman LB, Bird SJ, Lavi E, Stolzenberg ED, McGarvey ML, Asbury AK, Jimenez SA. Involvement of skeletal muscle in dialysis-associated systemic fibrosis (nephrogenic fibrosing dermopathy). *Muscle Nerve*. 2004; **30**:569-577.

Levy LM. Exceeding the limits of the normal blood-brain barrier: quo vadis gadolinium? *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007; **28**:1835-1836.

Li J, Zhang Z, Liu X, Wang Y, Mao F, Mao J, Lu X, Jiang D, Wan Y, Lv JY, Cao G, Zhang J, Zhao N, Atkinson M, Greiner DL, Prud'homme GJ, Jiao Z, Li Y, Wang Q. Study of GABA in healthy volunteers: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Front Pharmacol*. 2015; **6**:260.

Li R, Ji Z, Chang CH, Dunphy DR, Cai X, Meng H, Zhang H, Sun B, Wang X, Dong J, Lin S, Wang M, Liao YP, Brinker CJ, Nel A, Xia T.. Surface interactions with compartmentalized cellular phosphates explain rare earth oxide nanoparticle hazard and provide opportunities for safer design. *ACS Nano*. 2014; **8**:1771-1783.

Liddel SA. Development of the choroid plexus and blood-CSF barrier. *Front Neurosci*. 2015; **9**:32.



Lohrke J, Frisk AL, Frenzel T, Schöckel L, Rosenbruch M, Jost G, Lenhard DC, Sieber MA, Nischwitz V, Küppers A, Pietsch H. 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*. 2017; **52**:324–333.

López-Pedrajas R, Ramírez-Lamelas DT, Muriach B, Sánchez-Villarejo MV, Almansa I, Vidal-Gil L, Romero FJ, Barcia JM, Muriach M. Cocaine promotes oxidative stress and microglial-macrophage activation in rat cerebellum. *Front Cell Neurosci*. 2015; **9**:279.

Lorusso V, Arbughi T, Tirone P, de Haën C. Pharmacokinetics and tissue distribution in animals of gadobenate ion, the magnetic resonance imaging contrast enhancing component of gadobenate dimeglumine 0.5 M solution for injection (MultiHance). *J Comput Assist Tomogr*. 1999; **23**: S181-S194.

Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J. Corrigendum: Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2016; **533**:278.

Luciani L. Il cervelletto: nuovi studi di fisiologia normale e patologica. Le Monnier. 1891.

Lück D, Scharf H, Jakubowski N, Panne U. A novel solid phase extraction method for pre-concentration of gadolinium and gadolinium based MRI contrast agents from the environment. *J Anal At Spectrom*. 2010; **25**:1573–1580.

Luong TN, Carlisle HJ, Southwell A, Patterson PH. Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam. *J Vis Exp*. 2011;(49).pii: 2376.

## M

Malhotra A, LeSar B, Wu X, Durand D, Das N, Anzai Y, Sanelli P. Progressive T1 shortening of the dentate nucleus in patients with multiple sclerosis: result of multiple administrations of linear gadolinium contrast agents versus intrinsic disease. *AJR Am J Roentgenol*. 2018; **211**:1099-1105.

Mamourian AC, Hoopes PJ, Lewis LD. Visualization of intravenously administered contrast material in the CSF on fluid-attenuated inversion-recovery MR images: an in vitro and animal-model investigation. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2000; **21**:105-111.

Mansfield P, Maudsley AA. Planar spin imaging by NMR. *J Phys C: Solid State Phys* 1976; **9**: L409-L412.

Manto M, Oulad Ben Taib N. Cerebellar nuclei: key roles for strategically located structures. *Cerebellum*. 2010; **9**:17-21.

Manto M. Toxic agents causing cerebellar ataxias. *Handb Clin Neurol* 2012; **103**:201-213.

Manto M, Bower JM, Conforto AB, Delgado-García JM, da Guarda SN, Gerwig M, Habas C, Hagura N, Ivry RB, Mariën P, Molinari M, Naito E, Nowak DA, Oulad Ben Taib N, Pelisson D, Tesche CD, Tilikete C, Timmann D. Consensus paper: roles of the cerebellum in motor control--the diversity of ideas on cerebellar involvement in movement. *Cerebellum*. 2012; **11**: 457–487.

Manto M. Agents causing cerebellar ataxia: SH Subramony, A Dürr, eds. *Handbook of Clinical Neurology. Ataxic Disorders*. Vol. 103 (3rd Series). Elsevier B.V. Edinburgh, 2012; p. 201-213.

Manto M Perrotta G. Toxic-induced cerebellar syndrome: from the fetal period to the elderly. *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 155 (3rd series). The Cerebellum: Disorders and Treatment. M. Manto and T.A.G.M. Huisman, Eds, 2018.



- Manzo L, Castoldi AF, Coccini T, Prockop LD. Assessing effects of neurotoxic pollutants by biochemical markers. *Environ Res*. 2001; **85**:31-36.
- Maramattom BV, Manno EM, Wijdicks EF, Lindell EP. Gadolinium encephalopathy in a patient with renal failure. *Neurology*. 2005; **64**:1276-1278.
- Marckmann P, Skov L, Rossen K, Dupont A, Damholt MB, Heaf JG, Thomsen HS. Nephrogenic systemic fibrosis: suspected causative role of gadodiamide used for contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *J Am Soc Nephrol*. 2006; **17**: 2359-2362.
- Marcos HB, Semelka RC, Worowattanakul S. Normal placenta: gadolinium-enhanced dynamic MR imaging. *Radiology*. 1997; **205**:493-496.
- Maricelli JW, Lu QL, Lin DC, Rodgers BD. Trendelenburg-like gait, instability and altered step patterns in a mouse model for limb girdle muscular dystrophy 2i. *PLoS One*. 2016; **11**:e0161984.
- Marie GPO, Pozeg P, Meuli RA, Maeder P, Forget J. spatiotemporal pattern of gadodiamide-related T1 hyperintensity increase within the deep brain nuclei. *Invest Radiol*. 2018; **53**:748-754.
- Mariën P, Ackermann H, Adamaszek M, Barwood CH, Beaton A, Desmond J, De Witte E, Fawcett AJ, Hertrich I, Küper M, Leggio M, Marvel C, Molinari M, Murdoch BE, Nicolson RI, Schmahmann JD, Stoodley CJ, Thürling M, Timmann D, Wouters E, Ziegler W. Consensus paper: Language and the cerebellum: an ongoing enigma. *Cerebellum*. 2014; **13**:386-410.
- Marmolino D, Manto M. Pregabalin antagonizes copper-induced toxicity in the brain: in vitro and in vivo studies. *Neurosignals*. 2010; **18**:210-222.
- Marr D. A theory of cerebellar cortex. *J Physiol*. 1969; **202**:437-470.
- Marsden CD. [Functions of the basal ganglia]. *Rinsho Shinkeigaku*. 1982; **22**:1093-1094.
- Martin JH, Cooper SE, Hacking A, Ghez C. Differential effects of deep cerebellar nuclei inactivation on reaching and adaptive control. *J Neurophysiol*. 2000; **83**:1886-1899.
- Matsumae M, Sato O, Hirayama A, Hayashi N, Takizawa K, Atsumi H, Sorimachi T. Research into the physiology of cerebrospinal fluid reaches a new horizon: intimate exchange between cerebrospinal fluid and interstitial fluid may contribute to maintenance of homeostasis in the central nervous system. *Neurologia Medico-Chirurgica*. 2016; **56**:416-441.
- McBean LD, Dove JT, Halsted JA, Smith JC Jr. Zinc concentration in human tissues. *Am J Clin Nutr*. 1972; **25**:672-676.
- McConnell HL, Kersch CN, Woltjer RL, Neuwelt EA. The translational significance of the neurovascular unit. *J Biol Chem*. 2017; **292**:762-770.
- McDonald RJ, McDonald JS, Kallmes DF, Jentoft ME, Murray DL, Thielen KR, Williamson EE, Eckel LJ. Intracranial gadolinium deposition after contrast-enhanced MR Imaging. *Radiology*. 2015; **275**:772-782.
- McDonald RJ, McDonald JS, Dai D, Schroeder D, Jentoft ME, Murray DL, Kadirvel R, Eckel LJ, Kallmes DF. Comparison of gadolinium concentrations within multiple rat organs after intravenous administration of linear versus macrocyclic gadolinium chelates. *Radiology*. 2017a; **285**:536-545.



McDonald RJ, McDonald JS, Kallmes DF, Jentoft ME, Paolini MA, Murray DL, Williamson EE, Eckel LJ. Gadolinium deposition in human brain tissues after contrast-enhanced MR imaging in adult patients without intracranial abnormalities. *Radiology* 2017b; **285**:546–554.

Megyesi JF, Del Maestro RF. Nuclear magnetic resonance in the investigation of cerebral tumors and cerebral edema: a clue to the cellular alterations that may affect the distribution of water. *Biochem Cell Biol.* 1988; **66**:1100-1109.

Menacherry S, Hubert W, Justice JB Jr. In vivo calibration of microdialysis probes for exogenous compounds. *Anal Chem.* 1992; **64**:577-583.

Menjot de Champfleure N, Costalat V. 2015 : <https://www.yumpu.com/fr/document/view/26827574/role-de-la-barriere-hematoencephalique-faculte-de-medecine-de->

Mestre H, Kostrikov S, Mehta RI, Nedergaard M. Perivascular spaces, glymphatic dysfunction, and small vessel disease. *Clin Sci.* 2017; **131**:2257–2274.

Metz GA, Merkler D, Dietz V, Schwab ME, Fouad K. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Res.* 2000; **883**:165-177.

Meyer D, Schaefer M, Bonnemain B. Gd-DOTA, A Potential MRI contrast agent. Current status of physicochemical knowledge. *Invest Radiol.* 1988; **23**: S232-S235.

Middleton FA, Strick PL. Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000; **31**:236-250.

Miller DS, Bauer B, Hartz AM. Modulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: opportunities to improve central nervous system pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 2008; **60**:196-209.

Miller JH, Hu HH, Pokorney A, Cornejo P, Towbin R. MRI brain signal intensity changes of a child during the course of 35 gadolinium contrast examinations. *Pediatrics.* 2015; **136**:e1637-1640.

Mills E, Dong XP, Wang F, Xu H. Mechanisms of brain iron transport: insight into neurodegeneration and CNS disorders. *Future Med Chem.* 2010; **2**:51-64.

Milward E, Acikyol B, Bassett B, Williams E, Graham R, Delima R, Trinder D, Olynyk J, Johnstone D. Brain changes in iron loading disorders. In W. Linert and H. Kozłowski (eds.), *Metal Ions in Neurological Systems*, 2012. Springer-Verlag., Vienna. pp. 17-29.

Mink JW. The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol.* 1996; **50**:381-425.

Mitoma H, Manto M, Hampe CS. Pathogenic roles of glutamic acid decarboxylase 65 autoantibodies in cerebellar ataxias. *J Immunol Res.* 2017; **2017**:2913297.

Miyata S. New aspects in fenestrated capillary and tissue dynamics in the sensory circumventricular organs of adult brains. *Front Neurosci.* 2015; **9**:390.

Montagne A, Toga AW, Zlokovic BV. Blood-Brain Barrier Permeability and Gadolinium: Benefits and Potential Pitfalls in Research. *JAMA Neurol.* 2016; **73**:13-14.



- Montoya CP, Campbell-Hope LJ, Pemberton KD, Dunnett SB. The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J Neurosci Methods*. 1991; **36**:219-228.
- Moreno J, Vaz NB, Soler JC, Carrasco JL, Podlipnick S, Puig S, Oleaga L. High signal intensity in the dentate nucleus on unenhanced T1-weighted MR Images in meloma patients receiving macrocyclic gadolinium-based contrast. *J Radiol Diagn Methods*. 2018; **1**:101.
- Morisetti A, Bussi S, Tirone P, de Haën C. Toxicological safety evaluation of gadobenate dimeglumine 0.5 M solution for injection (MultiHance), a new magnetic resonance imaging contrast medium. *J Comput Assist Tomogr*. 1999; **23**:S207-S217.
- Morita S, Miyata S. Different vascular permeability between the sensory and secretory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res*. 2012; **349**:589-603.
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984; **11**:47-60.
- Morris JM, Miller GM. Increased signal in the subarachnoid space on fluid-attenuated inversion recovery imaging associated with the clearance dynamics of gadolinium chelate: a potential diagnostic pitfall. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007; **28**:1964-1967.
- Moser FG, Watterson CT, Weiss S, Austin M, Mirocha J, Prasad R, Wang J. High signal intensity in the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted mr images: comparison between gadobutrol and linear gadolinium-based contrast agents. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2018. Sous presse.
- Motekaitis RJ, Sun Y, Martell AE. New synthetic, selective, high-affinity ligands for effective trivalent metal ion binding and transport. *Inorg Chim Acta*. 1992; **198-200**:421-428.
- Motovilova E., Shaoying H. Magnetic materials for nuclear magnetic resonance and magnetic resonance imaging. In: *Advances in Magnetic Materials*, ed. Sam Zhang and Dongliang Zhao. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 2017.
- Mrini A, Moukhles H, Jacomy H, Bosler O, Doucet G. Efficient immunodetection of various protein antigens in glutaraldehyde-fixed brain tissue. *J Histochem Cytochem*. 1995; **43**:1285-1291.
- Mufaddel AA, Al-Hassani GA. Familial idiopathic basal ganglia calcification (Fahr's disease). *Neurosciences (Riyadh)*. 2014; **19**:171-177.
- Mugikura S, Takase K. Fear of linear gadolinium-based contrast agents and the Japanese radiologist's choice. *Jpn J Radiol*. 2017; **35**:695-696.
- Mühler A, Saeed M, Brasch RC, Higgins CB. 1992 Amelioration of cardiodepressive effects of gadopentate dimeglumine with addition of ionic calcium. *Radiology*. 1992; **184**, 159-164.
- Mühler MR, Clément O, Salomon LJ, Balvay D, Autret G, Vayssettes C, Cuénod CA, Siauve N. Maternofetal pharmacokinetics of a gadolinium chelate contrast agent in mice. *Radiology*. 2011; **258**:455-460.
- Müller A, Jurcoane A, Mädler B, Ditter P, Schild H, Hattingen E. Brain relaxometry after macrocyclic Gd-based contrast agent. *Clin Neuroradiol*. 2017; **27**:459-468.
- Mulqueen P, Tingey JM, Horrocks WD Jr. Characterization of lanthanide (III) ion binding to calmodulin using luminescence spectroscopy. *Biochemistry*. 1985; **24**:6639-6645.



Muoio V, Persson PB, Sendeski MM. The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014; **210**:790-798.

Murata N, Gonzalez-Cuyar LF, Murata K, Fligner C, Dills R, Hippe D, Maravilla KR. 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*. 2016; **51**:447-453.

## N

Nachtigall LB, Karavitaki N, Kiseljak-Vassiliades K, Ghalib L, Fukuoka H, Syro LV, Kelly D, Fleseriu M. Physicians' awareness of gadolinium retention and MRI timing practices in the longitudinal management of pituitary tumors: a "Pituitary Society" survey. *Pituitary*. 2019; **22**:37-45.

Naganawa S, Kawai H, Sone M, Nakashima T. Increased sensitivity to low concentration gadolinium contrast by optimized heavily T2-weighted 3D-FLAIR to visualize endolymphatic space. *Magn Reson Med Sci*. 2010; **9**:73-80.

Naganawa S, Suzuki K, Yamazaki M, Sakurai Y, Ikeda M. Time course for measuring endolymphatic size in healthy volunteers following intravenous administration of gadoteridol. *Magn Reson Med Sci*. 2014; **13**:73-80.

Naganawa S, Nakane T, Kawai H, Taoka T. Gd-based contrast enhancement of the perivascular spaces in the basal ganglia. *Magn Reson Med Sci*. 2017; **16**:61-65.

Naganawa S, Taoka T, Kawai H, Yamazaki M, Suzuki K. Appearance of the organum vasculosum of the lamina terminalis on contrast-enhanced MR imaging. *Magn Reson Med Sci*. 2018; **17**:132-137.

Nambu A, Tokuno H, Takada M. Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neurosci Res*. 2002; **43**:111-117.

Nandi P, Lunte SM. Recent trends in microdialysis sampling integrated with conventional and microanalytical systems for monitoring biological events: a review. *Anal Chim Acta*. 2009; **651**:1-14.

Nassery A, Palmese CA, Sarva H, Groves M, Miravite J, Kopell BH. Psychiatric and cognitive effects of deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2016; **16**:87.

Nathan BP, Yost J, Litherland MT, Struble RG, Switzer PV. Olfactory function in apoE knockout mice. *Behav Brain Res*. 2004; **150**:1-7.

Nau R, Sörgel F, Eiffert H. Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev*. 2010; **23**:858-883.

Naud J, Laurin LP, Michaud J, Beauchemin S, Leblond FA, Pichette V. Effects of chronic renal failure on brain drug transporters in rats. *Drug Metab Dispos*. 2012; **40**:39-46.

Nedergaard M, Goldman SA. Brain drain. *Sci Am*. 2016; **314**:44-49.

Nehra AK, McDonald RJ, Bluhm AM, Gunderson TM, Murray DL, Jannetto PJ, Kallmes DF, Eckel LJ, McDonald JS. Accumulation of gadolinium in human cerebrospinal fluid after gadobutrol-enhanced MR imaging: a prospective observational cohort Study. *Radiology*. 2018; **288**:416-423.





Nelson AB, Kreitzer AC. Reassessing models of basal ganglia function and dysfunction. *Annu Rev Neurosci*. 2014; **37**:117-135.

Nilsson C, Ståhlberg F, Thomsen C, Henriksen O, Herning M, Owman C. Circadian variation in human cerebrospinal fluid production measured by magnetic resonance imaging. *Am J Physiol*. 1992; **262**:R20-R24.

Nishimura N, Nishimura H, Ghaffar A, Tohyama CTI. Localization of metallothionein in the brain of rat and mouse. *J Histochem Cytochem*. 1992; **40**:309-315.

Nongnuch A, Panorchan K, Davenport A. Brain-kidney crosstalk. *Crit Care*. 2014; **18**:225-235.

## O

O'Callaghan JP. Assessment of neurotoxicity: use of glial fibrillary acidic protein as a biomarker. *Biomed Environ Sci*. 1991; **4**:197-206.

Ogawa S, Lee TM, Kay AR, Tank DW. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; **87**:9868-9872.

Ogurusu T, Wakabayashi S, Shigekawa M. Functional characterization of lanthanide binding sites in the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase: do lanthanide ions bind to the calcium transport site? *Biochemistry*. 1991; **30**:9966-9973.

Oh KY, Roberts VH, Schabel MC, Grove KL, Woods M, Frias AE. Gadolinium chelate contrast material in pregnancy: fetal biodistribution in the nonhuman primate. *Radiology*. 2015; **276**:110-118.

Ohashi T, Naganawa S, Katagiri T, Kuno K. Relationship between contrast enhancement of the perivascular space in the basal ganglia and endolymphatic volume ratio. *Magn Reson Med Sci* 2018; **17**:67-72.

Ohashi T, Naganawa S, Ogawa E, Katagiri T, Kuno K. Signal intensity of the cerebrospinal fluid after intravenous administration of gadolinium-based cContrast agents: strong contrast enhancement around the vein of Labbe. *Magn Reson Med Sci*. 2018. Sous presse.

Ohta M, Ohta K. Detection of myelin basic protein in cerebrospinal fluid. *Expert Rev Mol Diagn*. 2002; **2**:627-633

Okazaki O, Murayama N, Masubuchi N, Nomura H, Hokusui H. Placental transfer and milk secretion of gadodiamide injection in rats. *Arzneimittelforschung*. 1996; **46**:83-86.

Oksendal AN, Hals PA. Biodistribution and toxicity of MR imaging contrast media. *J Magn Reson Imaging*. 1993; **3**:157-165.

Olchowy C, Cebulski K, Łasecki M, Chaber R, Olchowy A, Kałwak K, Zaleska-Dorobisz U. The presence of the gadolinium-based contrast agent depositions in the brain and symptoms of gadolinium neurotoxicity - A systematic review. *PLoS One*. 2017; **12**:e0171704.

Öner AY, Barutcu B, Aykol Ş, Tali ET. Intrathecal Contrast-enhanced magnetic resonance imaging-related brain signal changes: residual gadolinium deposition? *Invest Radiol*. 2017; **52**:195-197.

Ong EM, Yeh IB. High signal in the cerebrospinal fluid following prior gadolinium administration in a patient with renal impairment. *Singapore Med J*. 2007; **48**:e296-e298.



Ortonne N, Lipsker D, Chantrel F, Boehm N, Grosshans E, Cribier B. Presence of CD45RO+ CD34+ cells with collagen synthesis activity in nephrogenic fibrosing dermopathy: a new pathogenic hypothesis. *Br J Dermatol*. 2004; **150**:1050-1052.

## P

Pal A, Prasad R. Regional distribution of copper, zinc and iron in brain of wistar rat model for non-wilsonian brain copper toxicosis. *Ind J Clin Biochem*. 2016; **31**:93-98

Pałasz A, Czekaj P. Toxicological and cytophysiological aspects of lanthanides action. *Acta Biochim Pol*. 2000; **47**:1107-1114.

Pardridge WM. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today*. 2007; **12**:54–61.

Parillo M, Sapienza M, Arpaia F, Magnani F, Mallio CA, D'Alessio P, Quattrocchi CC. A structured survey on adverse events occurring within 24 hours after intravenous exposure to gadodiamide or gadoterate meglumine: a controlled prospective comparison study. *Invest Radiol*. 2018. Sous presse.

Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6è edition. Elsevier Academic Press. Londres, Royaume Uni. 2007.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985; **14**:149-167.

Peres TV, Eying H, Lopes SC, Colle D, Gonçalves FM, Venske DK, Lopes MW, Ben J, Bornhorst J, Schwerdtle T, Aschner M, Farina M, Prediger RD, Leal RB. Developmental exposure to manganese induces lasting motor and cognitive impairment in rats. *Neurotoxicology*. 2015; **50**:28-37.

Perrotta G, Metens T, Absil J, Lemort M, Manto M. Absence of clinical cerebellar syndrome after serial injections of more than 20 doses of gadoterate, a macrocyclic GBCA: a monocenter retrospective study. *J Neurol*. 2017; **264**:2277-2283.

Petros AM, Mueller L, Kopple KD. NMR identification of protein surfaces using paramagnetic probes. *Biochemistry*. 1990; **29**:10041-10048.

Piersson AD, Gorleku PN. The use of gadolinium-based contrast agents in Ghana with a focus on residual intracranial gadolinium deposition. *Radiography (Lond.)*. 2018; **24**:e51-e55.

Pietsch H, Lengsfeld P, Steger-Hartmann T, Löwe A, Frenzel T, Hütter J, Sieber MA. Impact of renal impairment on long-term retention of gadolinium in the rodent skin following the administration of gadolinium-based contrast agents. *Invest Radiol*. 2009; **44**:226-233.

Pizzo ME, Thorne RG. The extracellular and perivascular spaces of the brain. In: Badaut J, Plesnila N (eds). *Brain Edema: from Molecular Mechanisms to Clinical Practice*, 1st edn. Elsevier (Imprint: Academic Press), London. 2017; p. 103-128.

Plog BA, Nedergaard M. The glymphatic system in central nervous system health and disease: past, present, and future. *Annu Rev Pathol*. 2018; **13**:379-394.

PMDA. Pharmaceutical and Medical Devices Agency. Report on the investigation results, 11 November 2017. Disponible à <http://www.pmda.go.jp/files/000221379.pdf>



Popescu BF, Robinson CA, Rajput A, Rajput AH, Harder SL, Nichol H. Iron, copper, and zinc distribution of the cerebellum. *Cerebellum*. 2009; **8**:74-79.

Popescu BF, Nichol H. Mapping brain metals to evaluate therapies for neurodegenerative disease. *CNS Neurosci Ther*. 2011; **17**:256-268.

Port M, Corot C, Violas X, Robert P, Raynal I, Gagneur G. How to compare the efficiency of albumin-bound and nonalbumin-bound contrast agents in vivo: the concept of dynamic relaxivity. *Invest Radiol*. 2005; **40**:565-573.

Port M, Idée JM, Medina C, Robic C, Sabatou M, Corot C. Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: a critical review. *Biometals*. 2008; **21**:469-490.

Prekop HT, Kroiss A, Rook V, Zagoraïou L, Jessell TM, Fernandes C, Delogu A, Wingate RJT. Sox14 is required for a specific subset of cerebello-olivary projections. *J Neurosci*. 2018; **38**:9539-9550.

Pritt ML, Hall DG, Jordan WH, Ballard DW, Wang KK, Müller UR, Watson DE. Initial biological qualification of SBDP-145 as a biomarker of compound-induced neurodegeneration in the rat. *Toxicol Sci*. 2014; **141**:398-408.

Prybylski JP, Semelka RC, Jay M. Can gadolinium be re-chelated in vivo? Considerations from decorporation therapy. *Magn Reson Imaging*. 2016; **34**:1391-1393.

Purcell EM, Torrey HC, Pound RV. Resonance absorption by nuclear moments in a solid. *Phys Rev*. 1946; **69**:37-38.

Puttagunta NR, Gibby WA, Smith GT. Human in vivo comparative study of zinc and copper transmetallation after administration of magnetic resonance imaging contrast agents. *Invest Radiol*. 1996; **12**:739-42.

## Q

Quattrocchi CC, Mallio CA, Errante Y, Cirimele V, Carideo L, Ax A, Zobel BB. 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*. 2015; **50**:470-472.

Quattrocchi CC, Mallio CA, Errante Y, Zobel BB. High T1 signal intensity in dentate nucleus after multiple injections of linear gadolinium chelates. *Radiology*. 2015; **276**:616-617.

Quattrocchi CC, Piervincenzi C, Cirimele V, Carducci F. Gadolinium-retention effect on brain resting state functional connectivity in patients with inflammatory bowel disease and repetitive not-confounded i.v. exposure to gadodiamide. *Invest Radiol: CMR*. 2017; **52**:12,767 abstract 31.

Quintana C, Wu TD, Delatour B, Dhenain M, Guerquin-Kern JL, Croisy A. Morphological and chemical studies of pathological human and mice brain at the subcellular level: correlation between light, electron, and nanosims microscopies. *Microsc Res Tech*. 2007; **70**:281-295.

## R

Rabi II. Space quantization in a gyrating magnetic field. *Phys Rev*. 1937; **51**:652-654.



Radbruch A, Weberling LD, Kieslich PJ, Eidel O, Burth S, Kickingereeder P, Heiland S, Wick W, Schlemmer HP, Bendszus M. Gadolinium retention in the dentate nucleus and globus pallidus is dependent on the class of contrast agent. *Radiology*. 2015; **275**:783-791.

Radbruch A, Weberling LD, Kieslich PJ, Hepp J, Kickingereeder P, Wick W, Schlemmer HP, Bendszus M. High-signal intensity in the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted images: evaluation of the macrocyclic gadolinium-based contrast Agent gadobutrol. *Invest Radiol*. 2015; **50**:805-810.

Radbruch A. Are some agents less likely to deposit gadolinium in the brain? *Magn Reson Imaging*. 2016; **34**:1351-1354.

Radbruch A, Roberts DR, Clément O, Rovira A, Quattrocchi CC. Chelated or dechelated gadolinium deposition. *Lancet Neurol*. 2017; **16**:955.

Radbruch A, Haase R, Kickingereeder P, Bäumer P, Bickelhaupt S, Paech D, Wick W, Schlemmer HP, Seitz A, Bendszus M. Pediatric Brain: No increased signal intensity in the dentate nucleus on unenhanced T1-weighted MR images after consecutive exposure to a macrocyclic gadolinium-based contrast Agent. *Radiology*. 2017; **283**:828-836.

Rai RM, Zhang JX, Clemens MG, Diehl AM. Gadolinium chloride alters the acinar distribution of phagocytosis and balance between pro and anti-inflammatory cytokines. *Shock*. 1996; **6**:243-247.

Rai AT, Hogg JP. Persistence of gadolinium in CSF: a diagnostic pitfall in patients with end-stage renal disease. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2001; **22**:1357-1361.

Ramalho J, Castillo M, AIObaidy M, Nunes RH, Ramalho M, Dale BM, Semelka RC. High signal intensity in globus pallidus and dentate nucleus on unenhanced T1-weighted MR images: evaluation of two linear gadolinium-based contrast agents. *Radiology*. 2015; **276**:836-44.

Ramalho J, Ramalho M, AIObaidy M, Nunes RH, Castillo M, Semelka RC. T1 signal-intensity increase in the dentate nucleus after multiple exposures to gadodiamide: intraindividual comparison between 2 commonly used sequences. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016; **37**:1427-1431.

Ramalho J, Ramalho M, Semelka RC. Gadolinium deposition and toxicity: a global concern. *Curr Radiol Rep* 2016; **4**:59.

Ramalho J, Semelka RC, AIObaidy M, Ramalho M, Nunes RH, Castillo M. Signal intensity change on unenhanced T1-weighted images in dentate nucleus following gadobenate dimeglumine in patients with and without previous multiple administrations of gadodiamide. *Eur Radiol*. 2016; **26**:4080-4088.

Ray DE, Cavanagh JB, Nolan CC, Williams SC. Neurotoxic effects of gadopentetate dimeglumine: behavioral disturbance and morphology after intracerebroventricular injection in rats. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1996; **17**:365-373.

Rees JA, Deblonde GJ, An DD, Ansoborlo C, Gauny SS, Abergel RJ. Evaluating the potential of chelation therapy to prevent and treat gadolinium deposition from MRI contrast agents. *Sci Rep*. 2018; **8**:4419.

Rej RN, Holme KR, Perlin AS. Marked stereoselectivity in the binding of copper ions by heparin. Contrasts with the binding of gadolinium and calcium ions. *Carbohydr Res*. 1990; **207**:143-152.



Renz DM, Kümpel S, Böttcher J, Pfeil A, Streitparth F, Waginger M, Reichenbach JR, Teichgräber UK, Mentzel HJ. Comparison of unenhanced T1-weighted signal intensities within the dentate nucleus and the globus pallidus after serial applications of gadopentetate dimeglumine versus gadobutrol in a pediatric population. *Invest Radiol*. 2018; **53**:119-127.

Rinck PA, Muller RN. Field strength and dose dependence of contrast enhancement by gadolinium- based MR contrast agents. *Eur Radiol* 1999; **9**:998-1004

Roales-Buján R, Páez P, Guerra M, Rodríguez S, Vío K, Ho-Plagaro A, García-Bonilla M, Rodríguez-Pérez LM, Domínguez-Pinos MD, Rodríguez EM, Pérez-Fígares JM, Jiménez AJ. Astrocytes acquire morphological and functional characteristics of ependymal cells following disruption of ependyma in hydrocephalus. *Acta Neuropathol*. 2012; **124**:531-546.

Robert P, Lehericy S, Grand S, Violas X, Fretellier N, Idée JM, Ballet S, Corot C. 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*. 2015; **50**:473-480.

Robert P, Violas X, Grand S, Lehericy S, Idée JM, Ballet S, Corot C. Linear gadolinium-based contrast agents are associated with brain gadolinium retention in healthy rats. *Invest Radiol*. 2016; **51**:73-82.

Robert P, Fingerhut S, Factor C, Vives V, Letien J, Sperling M, Rasschaert M, Santus R, Ballet S, Idée JM, Corot C, Karst U. One-year retention of gadolinium in the brain: comparison of gadodiamide and gadoterate meglumine in a rodent model. *Radiology*. 2018a; **288**:424-433.

Robert P, Frenzel T, Factor C, Jost G, Rasschaert M, Schuetz G, Fretellier N, Boyken J, Idée JM, Pietsch H. Methodological aspects for preclinical evaluation of gadolinium presence in brain tissue: critical appraisal and suggestions for harmonization. A joint initiative. *Invest Radiol*. 2018b; **53**:499-517.

Roberts DR, Chatterjee AR, Yazdani M, Marebwa B, Brown T, Collins H, Bolles G, Jenrette JM, Nietert PJ, Zhu X. Pediatric patients demonstrate progressive T1-weighted hyperintensity in the dentate nucleus following multiple doses of gadolinium-based contrast agent. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016; **37**:2340-2347.

Roberts DR, Holden KR. Progressive increase of T1 signal intensity in the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted MR images in the pediatric brain exposed to multiple doses of gadolinium contrast. *Brain Dev*. 2016; **38**:331-336.

Roberts DR, Welsh CA, LeBel DP 2nd, Davis WC. Distribution map of gadolinium deposition within the cerebellum following GBCA administration. *Neurology*. 2017; **88**:1206-1208.

Roberts RA, Aschner M, Calligaro D, Guilarte TR, Hanig JP, Herr DW, Hudzik TJ, Jeromin A, Kallman MJ, Liachenko S, Lynch JJ 3rd, Miller DB, Moser VC, O'Callaghan JP, Slikker W Jr, Paule MG. Translational biomarkers of neurotoxicity: a Health and Environmental Sciences Institute perspective on the way forward. *Toxicol Sci*. 2015; **148**:332-340.

Robic C, Catoen S, De Goltstein MC, Idée JM, Port M. The role of phosphate on Omniscan® dechelation: an in vitro relaxivity study at pH 7. *Biometals*. 2011; **24**:759-768.

Robison RK, Pokorney A, Miller JH. Evaluation of the effect of switching from a linear to a macrocyclic contrast agent on the T(1) -weighted brain signal intensity of a child during the course of 43 contrast-enhanced MRI examinations. *J Magn Reson Imaging*. 2019; **49**:608-609.



Roccatagliata L, Vuolo L, Bonzano L, Pichiecchio A, Mancardi GL. Multiple sclerosis: hyperintense dentate nucleus on unenhanced T1-weighted MR images is associated with the secondary progressive subtype. *Radiology*. 2009; **251**:503-510.

Rogowska J, Olkowska E, Ratajczyk W, Wolska L. Gadolinium as a new emerging contaminant of aquatic environments. *Environ Toxicol Chem*. 2018; **37**:1523-1534.

Rohrer M, Bauer H, Mintorovitch J, Requardt M, Weinmann HJ. Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Invest Radiol*. 2005; **40**:715-724.

Rose C, Butterworth RF, Zayed J, Normandin L, Todd K, Michalak A, Spahr L, Huet PM, Pomier-Layrargues G. Manganese deposition in basal ganglia structures results from both portal-systemic shunting and liver dysfunction. *Gastroenterology*. 1999; **117**:640-644.

Rosenson RS, McCormick A, Uretz EF. Distribution of blood viscosity values and biochemical correlates in healthy adults. *Clin Chem*. 1996; **42**:1189-1195.

Rossi Espagnet MC, Bernardi B, Pasquini L, Figà-Talamanca L, Tomà P, Napolitano A. Signal intensity at unenhanced T1-weighted magnetic resonance in the globus pallidus and dentate nucleus after serial administrations of a macrocyclic gadolinium-based contrast agent in children. *Pediatr Radiol*. 2017; **47**:1345-1352. Erratum in: *Pediatr Radiol*. 2017; **47**:1366.

Rostami E, Davidsson J, Ng KC, Lu J, Gyorgy A, Walker J, Wingo D, Plantman S, Bellander BM, Agoston DV, Risling M. A model for mild traumatic brain injury that induces limited transient memory impairment and increased levels of axon related serum biomarkers. *Front Neurol*. 2012; **3**:115.

Roux S, Sablé E, Porsolt RD. Primary observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agent and its effects on behavior and physiological function. *Curr Protoc Pharmacol*. 2005; Chapter 10:Unit 10.10.

Runge VM. Macrocyclic versus linear gadolinium chelates. *Invest Radiol*. 2015; **50**:811.

Runge VM, Heverhagen JT. Advocating the Development of next-generation high-relaxivity gadolinium chelates for clinical magnetic resonance. *Invest Radiol*. 2018; **53**:381-389.

## S

Sadowski EA, Bennett LK, Chan MR, Wentland AL, Garrett AL, Garrett RW, Djamali A. Nephrogenic systemic fibrosis: risk factors and incidence estimation. *Radiology*. 2007; **243**:148-157.

Sajja VS, Hlavac N, VandeVord PJ. Role of glia in memory deficits following traumatic brain injury: biomarkers of glia dysfunction. *Front Integr Neurosci*. 2016; **10**:7.

Salvan AM, Vion-Dury J, Confort-Gouny S, Nicoli F, Lamoureux S, Cozzone PJ. Brain proton magnetic resonance spectroscopy in HIV-related encephalopathy: identification of evolving metabolic patterns in relation to dementia and therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1997; **13**:1055-1066.

Schieren G, Wirtz N, Altmeyer P, Rump LC, Weiner SM, Kreuter A. Nephrogenic systemic fibrosis--a rapidly progressive disabling disease with limited therapeutic options. *J Am Acad Dermatol*. 2009; **61**:868-874.





Schlachetzki F, Pardridge WM. P-glycoprotein and caveolin-1alpha in endothelium and astrocytes of primate brain. *Neuroreport*. 2003; **14**:2041-2046.

Schlemm L, Chien C, Bellmann-Strobl J, Dörr J, Wuerfel J, Brandt AU, Paul F, Scheel M. Gadopentetate but not gadobutrol accumulates in the dentate nucleus of multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2017; **23**:963-972.  
Schmahmann JD, Weilburg JB, Sherman JC. The neuropsychiatry of the cerebellum - insights from the clinic. *Cerebellum*. 2007; **6**:254-267.

Schmahmann JD. The role of the cerebellum in cognition and emotion: personal reflections since 1982 on the dysmetria of thought hypothesis, and its historical evolution from theory to therapy. *Neuropsychol Rev*. 2010; **20**:236-260.

Schmitt C, Strazielle N, Richaud P, Bouron A, Gherzi-Egea JF. Active transport at the blood-CSF barrier contributes to manganese influx into the brain. *J Neurochem*. 2011; **117**:747-756.

Schneider GK, Stroeder J, Roditi G, Colosimo C, Armstrong P, Martucci M, Buecker A, Raczeck P. T1 Signal Measurements in pediatric brain: findings after multiple exposures to gadobenate dimeglumine for imaging of nonneurologic disease. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2017; **38**:1799-1806.

Schomäcker K, Mocker D, Münze R, Beyer GJ. Stabilities of lanthanide-protein complexes. *Int J Rad Appl Instrum A*. 1988; **39**:261-264.

Schroll H, Hamker FH. Computational models of basal-ganglia pathway functions: focus on functional neuroanatomy. *Front Syst Neurosci*. 2013; **7**:122.

Sears ME. Chelation: harnessing and enhancing heavy metal detoxification—a review. *ScientificWorldJournal*. 2013; **2013**:219840.

Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*. 2015; (96):e52434.

Semelka RC, Ramalho M, AlObaidy M, Ramalho J. Gadolinium in humans: A family of disorders. *AJR Am J Roentgenol*. 2016a; **207**:229-233.

Semelka RC, Ramalho J, Vakharia A, AlObaidy M, Burke LM, Jay M, Ramalho M. Gadolinium deposition disease: Initial description of a disease that has been around for a while. *Magn Reson Imaging*. 2016; **34**:1383-1390.

Semelka RC, Commander CW, Jay M, Burke LM, Ramalho M. Presumed gadolinium toxicity in subjects with normal renal function: a report of 4 cases. *Invest Radiol*. 2016; **51**:661-665.

Semelka RC, Ramalho M, Jay M, Hickey L, Hickey J. Intravenous calcium-/zinc-diethylene triamine penta-acetic acid in patients with presumed gadolinium deposition disease: A preliminary report on 25 patients. *Invest Radiol*. 2018; **53**:373-379.

Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haesslein LJ. Brain development in rodents and humans: identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*. 2013; **106-107**:1-16.

Sen S, Flynn MR, Du G, Tröster AI, An H, Huang X. Manganese accumulation in the olfactory bulbs and other brain regions of "asymptomatic" welders. *Toxicol Sci*. 2011; **121**:160-167.

Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's. *Int J Prev Med*. 2013; **4**:624–630.



- Sessler JL, Mody TD, Hemmi GW, Lynch V. Synthesis and structural characterization of lanthanide(III) texaphyrins. *Inorg Chem.* 1993; **32**:3175-3187.
- Shah A, Garzon-Muvdi T, Mahajan R, Duenas VJ, Quiñones-Hinojosa A. Animal models of neurological disease. *Adv Exp Med Biol.* 2010; **671**:23-40.
- Shah R, D'Arco F, Soares B, Cooper J, Brierley J. Use of gadolinium contrast agents in paediatric population: Donald Rumsfeld meets Hippocrates! *Br J Radiol.* 2019; **92**(1094):20180746.
- Shellock FG, Kanal E. Safety of magnetic resonance imaging contrast agents. *J Magn Reson Imaging.* 1999; **10**:477-484.
- Sherry AD, Caravan P, Lenkinski RE. Primer on gadolinium chemistry. *J Magn Reson Imaging.* 2009; **30**:1240-8.
- Shimada H, Nagano M, Funakoshi T, Kojima S. Pulmonary toxicity of systemic terbium chloride in mice. *J Toxicol Environ Health.* 1996; **48**:81-92.
- Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells.* 2014; **32**:1380-1389.
- Sieber MA, Lengsfeld P, Frenzel T, Golfier S, Schmitt-Willich H, Siegmund F, Walter J, Weinmann HJ, Pietsch H. Preclinical investigation to compare different gadolinium-based contrast agents regarding their propensity to release gadolinium in vivo and to trigger nephrogenic systemic fibrosis-like lesions. *Eur Radiol.* 2008; **18**:2164-2173.
- Silverman AP. An ethologist's approach to behavioural toxicology. *Neurotoxicol Teratol.* 1988; **10**:85-92.
- Simon P, Dupuis R, Costentin J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behav Brain Res.* 1994; **61**:59-64.
- Smith AJ, Jin B, Verkman AS. Muddying the water in brain edema? *Trends Neurosci* 2015; **38**:1-2.
- Smith AP, Marino M, Roberts J, Crowder JM, Castle J, Lowery L, Morton C, Hibberd MG, Evans PM. Clearance of gadolinium from the brain with no pathologic effect after repeated administration of gadodiamide in healthy rats: an analytical and histologic study. *Radiology* 2017; **282**:743–751.
- Smith RM, Martell, AE. Critical Stability Constants, Vol. 6, Plenum Press, New York, USA. 1989.
- Sobotta J. Sobotta's Textbook and Atlas of Human Anatomy. WB Saunders. Philadelphia, PA, USA. 1909.
- Soher BJ, Dale BM, Merkle EM. A review of MR physics: 3T versus 1.5T. *Magn Reson Imaging Clin N Am.* 2007; **15**:277-290.
- Somogyi A, Medjoubi K, Baranton G, Le Roux V, Ribbens M, Polack F, Philippot P, Samama JP. Optical design and multi-length-scale scanning spectro-microscopy possibilities at the Nanoscopium beamline of Synchrotron Soleil. *J Synchrotron Radiat.* 2015; **22**:1118-1129.
- Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, Mapplebeck JC, Wei P, Zhan S, Zhang S, McDougall JJ, King OD, Mogil JS. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain.* 2011; **7**:55.



- Sousa N, Almeida OF, Wotjak CT. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. *Genes Brain Behav.* 2006; **5**:5-24.
- Spalding JF, Holland LM, Tietjen GL. Influence of the visible color spectrum on activity in mice. II. Influence of sex, color, and age on activity. *Lab Anim Care.* 1969; **19**:209-213
- Speck U, Press WR, Mützel W. Osmolality-related effects of injections into the central nervous system. *Invest Radiol.* 1988; **23**:S114-S117.
- Spencer AJ, Wilson SA, Batchelor J, Reid A, Rees J, Harpur E. Gadolinium chloride toxicity in the rat. *Toxicol Pathol.* 1997; **25**:245-255.
- Spinazzi A, Lorusso V, Pirovano G, Kirchin M. Safety, tolerance, biodistribution and MR imaging enhancement of the liver with Gd-BOPTA: results of clinical pharmacologic and pilot imaging studies in non-patient and patient volunteers. *Acad Radiol* 1999; **6**:282-291.
- Splendiani A, Perri M, Marsecano C, Vellucci V, Michelini G, Barile A, Di Cesare E. Effects of serial macrocyclic-based contrast materials gadotérate meglumine and gadobutrol administrations on gadolinium-related dentate nuclei signal increases in unenhanced T1-weighted brain: a retrospective study in 158 multiple sclerosis (MS) patients. *Radiol Med.* 2018; **123**:125-134.
- Srivanitchapoom P, Pitakpatapee Y, Suengtaworn A. Parkinsonian syndromes: A review. *Neurol India.* 2018; **66**:S15-S25.
- Stanisz GJ, Odrobina EE, Pun J, Escaravage M, Graham SJ, Bronskill MJ, Henkelman RM. T1, T2 relaxation and magnetization transfer in tissue at 3T. *Magn Reson Med.* 2005; **54**:507-512.
- Stevens LA, Viswanathan G, Weiner DE. Chronic kidney disease and end-stage renal disease in the elderly population: current prevalence, future projections, and clinical significance. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010; **17**:293-301.
- Stojanov DA, Aracki-Trenkic A, Vojinovic S, Benedeto-Stojanov D, Ljubisavljevic S. 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.* 2016; **26**:807-15.
- Stratta P, Canavese C, Aime S. Gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging, renal failure and nephrogenic systemic fibrosis/nephrogenic fibrosing dermopathy. *Curr Med Chem.* 2008; **15**:1229-1235.
- Strazielle N, Ghersi-Egea JF. Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000; **59**:561-574.
- Strick PL, Dum RP, Fiez JA. Cerebellum and nonmotor function. *Annu Rev Neurosci.* 2009; **32**:413-434.
- Sultan F, Glickstein M. The cerebellum: Comparative and animal studies. *Cerebellum.* 2007; **6**:168-176.
- Sulzer D, Mosharov E, Talloczy Z, Zucca FA, Simon JD, Zecca L. Neuronal pigmented autophagic vacuoles: lipofuscin, neuromelanin, and ceroid as macroautophagic responses during aging and disease. *J Neurochem.* 2008; **106**:24-36.
- Sundgren PC. Is there a need for use of contrast in the pregnant mother and in small children. In: Proc 17th Annual Meeting International Society of Magnetic Resonance in Medicine, ISMRM. Honolulu, USA; 2009.



Sundgren PC, Leander P. Is administration of gadolinium-based contrast media to pregnant women and small children justified? *J Magn Reson Imaging*. 2011; **34**:750-757.

Suzuki KT, Kobayashi E, Ito Y, Ozawa H, Suzuki E. Localization and health effects of lanthanum chloride instilled intratracheally into rats. *Toxicology*. 1992; **76**:141-152.

Suzuki S, Nishio S, Takata K, Morioka T, Fukui M. Radiation-induced brain calcification: paradoxical high signal intensity in T1-weighted MR images. *Acta Neurochir (Wien)*. 2000; **142**:801-804.

Swaminathan S, Shah SV. New insights into nephrogenic systemic fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2007; **18**:2636-2643.

Sweeney MD, Ayyadurai S, Zlokovic BV. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci*. 2016; **19**:771-783.

Switzer RC 3rd, Lowry-Franssen C, Benkovic SA. Recommended neuroanatomical sampling practices for comprehensive brain evaluation in nonclinical safety studies. *Toxicol Pathol*. 2011; **39**:73-84.

## T

Tagliaferro P, Tandler CJ, Ramos AJ, Pecci Saavedra J, Brusco A. Immunofluorescence and glutaraldehyde fixation. A new procedure based on the Schiff-quenching method. *J Neurosci Methods*. 1997; **77**:191-197. Erratum in: *J Neurosci Methods*. 1998; **82**:235-236.

Taillieu F, Salomon LJ, Siauve N, Clément O, Faye N, Balvay D, Vayssettes C, Frija G, Ville Y, Cuenod CA. Placental perfusion and permeability: simultaneous assessment with dual-echo contrast-enhanced MR imaging in mice. *Radiology*. 2006; **241**:737-745.

Tamrazi B, Liu CJ, Cen SY, Nelson MB, Dhall G, Nelson MD. Brain irradiation and gadobutrol administration in pediatric patients with brain tumors: effect on MRI brain signal intensity. *Radiology*. 2018; **289**:188-194.

Tamrazi B, Nguyen B, Liu CJ, Azen CG, Nelson MB, Dhall G, Nelson MD. Changes in signal intensity of the dentate nucleus and globus pallidus in pediatric patients: impact of brain irradiation and presence of primary brain tumors independent of linear gadolinium-based contrast agent administration. *Radiology*. 2018; **287**:452-460.

Tanaka M, Nakahara K, Kinoshita M. Increased signal intensity in the dentate nucleus of patients with multiple sclerosis in comparison with neuromyelitis optica spectrum disorder after multiple doses of gadolinium contrast. *Eur Neurol*. 2016; **75**:195-8.

Taoka T, Jost G, Frenzel T, Naganawa S, Pietsch H. Impact of the glymphatic system on the kinetic and distribution of gadodiamide in the rat brain: observations by dynamic MRI and effect of circadian rhythm on tissue gadolinium concentrations. *Invest Radiol*. 2018; **53**:529-534.

Taupitz M, Stolzenburg N, Ebert M, Schnorr J, Hauptmann R, Kratz H, Hamm B, Wagner S. Gadolinium-containing magnetic resonance contrast media: investigation on the possible transchelation of Gd(3+) to the glycosaminoglycan heparin. *Contrast Media Mol Imaging*. 2013; **8**:108-116.

Taylor DM, Duffield JR, Williams DR, Yuele L, Gaskin PW, Unalkat P. Binding of f-elements to the iron transport protein transferrin. *Eur J Solid State Inorg Chem*. 1991; **28**:271-274.



- Taylor DM, Leggett RW. A generic biokinetic model for predicting the behavior of the lanthanide elements in the human body. *Radiat Prot Dosimetry*. 2003; **105**:193-198.
- Tedeschi E, Palma G, Canna A, Coccozza S, Russo C, Borrelli P, Lanzillo R, Angelini V, Postiglione E, Morra VB, Salvatore M, Brunetti A, Quarantelli M. In vivo dentate nucleus MRI relaxometry correlates with previous administration of gadolinium-based contrast agents. *Eur Radiol*. 2016; **26**:4577-4584.
- Teigler A, Komljenovic D, Draguhn A, Gorgas K, Just WW. Defects in myelination, paranode organization and Purkinje cell innervation in the ether lipid-deficient mouse cerebellum. *Hum Mol Genet*. 2009; **18**:1897-1908.
- Telgmann L, Wehe CA, Künnemeyer J, Bülter AC, Sperling M, Karst U. Speciation of Gd-based MRI contrast agents and potential products of transmetalation with iron ions or parenteral iron supplements. *Anal Bioanal Chem*. 2012; **404**:2133-2141.
- Temel Y, Blokland A, Steinbusch HW, Visser-Vandewalle V. The functional role of the subthalamic nucleus in cognitive and limbic circuits. *Prog Neurobiol*. 2005; **76**:393-413.
- Thakral C, Alhariri J, Abraham JL. Long-term retention of gadolinium in tissues from nephrogenic systemic fibrosis patient after multiple gadolinium-enhanced MRI scans: case report and implications. *Contrast Media Mol Imaging*. 2007; **2**:199-205.
- Thakral C, Abraham JL. Gadolinium-induced nephrogenic systemic fibrosis is associated with insoluble Gd deposits in tissues: in vivo transmetalation confirmed by microanalysis. *J Cutan Pathol*. 2009; **36**:1244-1254.
- Thomsen HS. Magnetic resonance contrast media. *Eur J Hosp Pharm*. 2005; **2**:60-62.
- Thomsen HS. Nephrogenic systemic fibrosis: a serious adverse reaction to gadolinium - 1997-2006-2016. Part 1. *Acta Radiol*. 2016; **57**:515-520.
- Thomsen MS, Routhe LJ, Moos T. The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017; **37**:3300-3317.
- Tibussek D, Rademacher C, Caspers J, Turowski B, Schaper J, Antoch G, Klee D. Gadolinium brain deposition after macrocyclic gadolinium administration: a pediatric case-control study. *Radiology*. 2017; **285**:223-230.
- Tracqui A, Tayot J, Kintz P, Alves G, Bosque MA, Mangin P. Determination of manganese in human brain samples. *Forensic Sci Int*. 1995; **76**:199-203.
- Turk O, Ozdemir NG, Atci IB, Saygi T, Yilmaz H, Antar V. Intraventricular Gadoteric Acid Intoxication: First Report. *World Neurosurg*. 2018; **111**:264-268.
- Tuschl K, Mills PB, Clayton PT. Manganese and the brain. *Int Rev Neurobiol*. 2013; **110**:277-312.
- Tweedle MF, Hagan JJ, Kumar K, Mantha S, Chang CA. Reaction of gadolinium chelates with endogenously available ions. *Magn Reson Imaging*. 1991; **9**:409-415.
- Tweedle MF, Wedeking P, Kumar K. Biodistribution of radiolabeled, formulated gadopentetate, gadoteridol, gadoterate, and gadodiamide in mice and rats. *Invest Radiol*. 1995; **30**:372-380.



## V

Valiathan MS, Kartha CC, Eapen JT, Dang HS, Sunta CM. A geochemical basis for endomyocardial fibrosis. *Cardiovasc Res*. 1989; **23**:647-648.

Van der Molen AJ. Diagnostic efficacy of gadolinium-based contrast media. In: H. S. Thomsen and J. A. W. Webb (eds.), *Contrast Media, Medical Radiology. Diagnostic Imaging*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2014. p. 181-191.

Vander Elst L, Maton F, Laurent S, Seghi F, Chapelle F, Muller RN. A multinuclear MR study of Gd-EOB-DTPA: comprehensive preclinical characterization of an organ specific MRI contrast agent. *Magn Reson Med*. 1997; **38**:604-614.

Varani J, DaSilva M, Warner RL, Deming MO, Barron AG, Johnson KJ, Swartz RD. Effects of gadoliniumbased magnetic resonance imaging contrast agents on human skin in organ culture and human skin fibroblasts. *Invest Radiol*. 2009; **44**:74-81.

Varga J, Ferenczi S, Kovács KJ, Garafova A, Jezova D, Zelena D. Comparison of stress-induced changes in adults and pups: is aldosterone the main adrenocortical stress hormone during the perinatal period in rats? *PLoS One*. 2013; **8**:e72313.

Vercruyse KP, Li H, Luo Y, Prestwich GD. Thermosensitive lanthanide complexes of hyaluronan. *Biomacromolecules*. 2002; **3**:639-643.

Vergauwen E, Vanbinst AM, Brussaard C, Janssens P, De Clerck D, Van Lint M, Houtman AC, Michel O, Keymolen K, Lefevre B, Bohler S, Michielsen D, Jansen AC, Van Velthoven V, Gläsker S. Central nervous system gadolinium accumulation in patients undergoing periodical contrast MRI screening for hereditary tumor syndromes. *Heredit Cancer Clin Pract*. 2018; **16**:2.

Vidaud C, Bourgeois D, Meyer D. Bone as target organ for metals: the case of f-elements. *Chem Res Toxicol*. 2012; **25**:1161-1175.

Vilgrain V, Van Beers BE, Pastor CM. Insights into the diagnosis of hepatocellular carcinomas with hepatobiliary MRI. *J Hepatol*. 2016; **64**:708-716.

Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*. 2006; **1**:848-858.

## W

Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007; **2**:322-328.

Walsh RN, Cummins RA. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull*. 1976; **83**:482-504.

Wan C, Zhan Y, Xue R, Wu Y, Li X, Pei F. Gd-DTPA-induced dynamic metabonomic changes in rat biofluids. *Magn Reson Imaging*. 2017; **44**:15-25.

Wang HW, Amin MS, El-Shahat E, Huang BS, Tuana BS, Leenen FH. Effects of central sodium on epithelial sodium channels in rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010; **299**:R222-R233.





- Wang J, Zhang H, Yang K, Niu C. Computer simulation of Gd(III) speciation in human interstitial fluid. *Biometals*. 2004; **17**:599-603
- Wang X, Takano T, Nedergaard M. Astrocytic calcium signaling: mechanism and implications for functional brain imaging. *Methods Mol Biol*. 2009; **489**:93-109.
- Wang XK, Zhang HL, Meng FH, Chang M, Wang YZ, Jin T, Mix E, Zhu J. Elevated levels of S100B, tau and pNFH in cerebrospinal fluid are correlated with subtypes of Guillain-Barré syndrome. *Neurol Sci*. 2013; **34**:655-61.
- Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, Crichton RR, Zecca L. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol*. 2014; **13**:1045-1060
- Wastie ML, Latief KH. Gadolinium: named after Finland's most famous chemist. *Br J Radiol*. 2004; **77**:146-147.
- Waubant E. Biomarkers indicative of blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Dis Markers*. 2006; **22**:235-244.
- Webb JA, Thomsen HS, Morcos SK; Members of Contrast Media Safety Committee of European Society of Urogenital Radiology (ESUR). The use of iodinated and gadolinium contrast media during pregnancy and lactation. *Eur Radiol*. 2005; **15**:1234-1240.
- Weberling LD, Kieslich PJ, Kickingereder P, Wick W, Bendszus M, Schlemmer HP, Radbruch A. Increased signal intensity in the dentate Nucleus on unenhanced T1-weighted images after gadobenate dimeglumine administration. *Invest Radiol*. 2015; **50**:743-748.
- Wedeking P, Kumar K, Tweedle MF. Dissociation of gadolinium chelates in mice: relationship to chemical characteristics. *Magn Reson Imaging*. 1992; **10**:641-648.
- Wei K, Yin Z, Xie Y. Roles of the kidney in the formation, remodeling and repair of bone. *J Nephrol*. 2016; **29**:349-357.
- Welk B, McArthur E, Morrow SA, MacDonald P, Hayward J, Leung A, Lum A. Association between gadolinium contrast exposure and the risk of parkinsonism. *JAMA*. 2016; **316**:96-98.
- Weller RO, Sharp MM, Christodoulides M, Carare RO, Møllgård K. The meninges as barriers and facilitators for the movement of fluid, cells and pathogens related to the rodent and human CNS. *Acta Neuropathol*. 2018; **135**:363-385.
- Wiedemeyer K, Kutzner H, Abraham JL, Thakral C, Carlson JA, Tran TA, Hausser I, Hartschuh W. The evolution of osseous metaplasia in localized cutaneous nephrogenic systemic fibrosis: a case report. *Am J Dermatopathol*. 2009; **31**:674-681.
- Willan KJ, Wallace KH, Jatton JC, Dwek RA. The use of gadolinium as a probe in the Fc region of a homogeneous anti-(type-III pneumococcal polysaccharide) antibody. *Biochem J*. 1977; **161**:205-211.
- Williams and Grimm, 2014. A survey of the chronic effects of retained Gd from contrast MRIs. Disponible à : <https://gdtoxicity.files.wordpress.com/2014/09/gd-symptom-survey.pdf>
- Woimant F, Trocillo JM, Chaine P, Rémy P, Chappuis P. La maladie de Wilson. *Neurologie.com*. 2010; **2**:255-258.



Wolak DJ, Thorne RG. Diffusion of macromolecules in the brain: implications for drug delivery. *Mol Pharm.* 2013; **10**:1492-1504.

Wong AD, Ye M, Levy AF, Rothstein JD, Bergles DE, Searson PC. The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng.* 2013; **30**:6-7.

## X

Xia D, Davis RL, Crawford JA, Abraham JL. Gadolinium released from MR contrast agents is deposited in brain tumors: in situ demonstration using scanning electron microscopy with energy dispersive X-ray spectroscopy. *Acta Radiol.* 2010; **51**:1126-1236.

Xie Z, Culley DJ, Dong Y, Zhang G, Zhang B, Moir RD, Frosch MP, Crosby G, Tanzi RE. The common inhalation anesthetic isoflurane induces caspase activation and increases amyloid beta-protein level in vivo. *Ann Neurol.* 2008; **64**:618e27.

Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiyagarajan M, O'Donnell J, Christensen DJ, Nicholson C, Iliff JJ, Takano T, Deane R, Nedergaard M. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science.* 2013; **342**:373-377.

## Y

Yager JY, Hartfield DS: Neurologic manifestations of iron deficiency in childhood. *Pediatr Neurol.* 2002; **27**:85-92.

Yang H, Ji Q, Zhang X. [Studies on effects of yttrium chloride and praseodymium chloride on frequency of micronucleus in human blood lymphocytes] (en Chinois). *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 1998; **32**:156-158.

Yang L, Krefting I, Gorovets A, Marzella L, Kaiser J, Boucher R, Rieves D. Nephrogenic systemic fibrosis and class labeling of gadolinium-based contrast agents by the Food and Drug Administration. *Radiology.* 2012; **265**:248-253.

Yang Z, Wang KK. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci.* 2015; **38**:364-374.

Young JR, Pope WB, Bobinski M. Gadolinium deposition within the pediatric brain: no increased intrinsic T1-weighted signal intensity within the dentate nucleus following the administration of a minimum of 4 doses of the macrocyclic agent gadoteridol. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2018; **39**:1604-1608.

Young JR, Orosz I, Franke MA, Kim HJ, Woodworth D, Ellingson BM, Salamon N, Pope WB. Gadolinium deposition in the paediatric brain: T1-weighted hyperintensity within the dentate nucleus following repeated gadolinium-based contrast agent administration. *Clin Radiol.* 2018; **73**:290-295.

Young JR, Qiao J, Orosz I, Salamon N, Franke MA, Kim HJ, Pope WB. Gadolinium deposition within the paediatric brain: no increased intrinsic T1-weighted signal intensity within the dentate nucleus following the administration of a minimum of four doses of the macrocyclic agent gadobutrol. *Eur Radiol.* 2018. Sous presse.

## Z

Zak O, Aisen P. Spectroscopic and thermodynamic studies on the binding of gadolinium(III) to human serum transferrin. *Biochemistry.* 1988; **27**:1075-1080.



Zalewski P, Truong-Tran A, Lincoln S, Ward D, Shankar A, Coyle P, Jayaram L, Copley A, Grosser D, Murgia C, Lang C, Ruffin R. Use of a zinc fluorophore to measure labile pools of zinc in body fluids and cell-conditioned media. *Biotechniques*. 2006; **40**:509-520.

Zanetta L, Marcus SG, Vasile J, Dobryansky M, Cohen H, Eng K, Shamamian P, Mignatti P. Expression of Von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: a potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. *Int J Cancer*. 2000; **85**:281-288.

Zapata A, Chefer VI, Shippenberg TS. Microdialysis in rodents. *Curr Protoc Neurosci*. 2009; Chapter 7:Unit7.2.

Zhang ET, Inman CB, and Weller RO. Interrelationships of the pia mater and the perivascular (Virchow-Robin) spaces in the human cerebrum. *J. Anat*. 1990; **170**:111-123.

Zhang Y, Cao Y, Shih GL, Hecht EM, Prince MR. Extent of signal hyperintensity on unenhanced T1-weighted brain MR images after more than 35 administrations of linear gadolinium-based contrast agents. *Radiology*. 2017; **282**:516-525.

Zhao J, Zhou ZQ, Jin JC, Yuan L, He H, Jiang FL, Yang XG, Dai J, Liu Y. Mitochondrial dysfunction induced by different concentrations of gadolinium ion. *Chemosphere*. 2014; **100**:194-199.

Zheng W. Toxicology of choroid plexus: special reference to metal-induced neurotoxicities. *Microsc Res Tech*. 2001; **52**:89-103.

Zheng W. Blood-Brain Barrier and Blood-CSF Barrier in Metal-Induced Neurotoxicities. In: Massaro E.J. (eds) *Handbook of Neurotoxicology*. Humana Press, Totowa, NJ, USA. 2002.

Zheng L, Yang J, Liu Q, Yu F, Wu S, Jin C, Lu X, Zhang L, Du Y, Xi Q, Cai Y. Lanthanum chloride impairs spatial learning and memory and downregulates NF- $\kappa$ B signalling pathway in rats. *Arch Toxicol*. 2013; **87**:2105-2117.

Zhong J, Carrozza DP, Williams K, Pritchett DB, Molinoff PB. Expression of mRNAs encoding subunits of the NMDA receptor in developing rat brain. *J Neurochem*. 1995;**64**: 531-539.

Zhu WF, Xu SQ, Zhang H, Shao PP, Wu DS, Yang WJ, Gu JH. [Investigation of children intelligence quotient in REE mining area—I. Bio-effect study of REE mining area in South Jiangxi.] (en Chinois). *Chin. Sci. Bull*. 1996; **41**:914–916.



## Sites internet

**Site internet 1** : Physics of MRI – Detailed. My-MS.org.  
[https://my-ms.org/mri\\_physics.htm](https://my-ms.org/mri_physics.htm)

**Site internet 2** : Physics of MRI.  
[http://199.116.233.101/index.php/Physics\\_of\\_MRI](http://199.116.233.101/index.php/Physics_of_MRI)

**Site internet 3** : Le phénomène de résonance magnétique.  
<https://clemedicine.com/2-le-phenomene-de-resonance-magnetique/>

**Site internet 4** : IRM du cartilage du genou.  
<http://www.imosteoarticulaire-carrillon.com/blog/2016/08/05/le-cartilage-du-genou/>

**Site internet 5** : Contraste en T1, T2 et densité protonique.  
<https://clemedicine.com/5-contraste-en-t1-t2-et-densite-protonique/>

**Site internet 6** : Société Française de Radiologie. Echo de Spin et dérivés Flair, Stir, ESR, Bandes de saturation (Cours Pr. B. Kastler).  
[http://www.sfrnet.org/Data/upload/documents/CERF/DES/IRM/09\\_03\\_2010/COURS%20DES%202010.pdf](http://www.sfrnet.org/Data/upload/documents/CERF/DES/IRM/09_03_2010/COURS%20DES%202010.pdf)

**Site internet 7** : Terres rares – Le monopole chinois fait débat.  
<https://lepetitjournal.com/shanghai/actualites/terres-rares-le-monopole-chinois-fait-debat-42462>

**Site internet 8** : Les ganglions de la base ou noyaux gris centraux. M. Bosc, E Hérault.  
<https://slideplayer.fr/slide/1302481/#>

**Site internet 9** : Laboratoire de Physique des Solides, Université Paris-Sud.  
<https://www.stem.lps.u-psud.fr/book/export/html/233>

**Site internet 10** : Electron energy loss spectroscopy (EELS) for chemical and compositional analysis.  
<http://www.gatan.com/techniques/eels>

**Site internet 11** : Blood-Brain Barrier. iKnowledge.  
<https://clinicalgate.com/blood-brain-barrier/>

**Site internet 12** : Blood brain barrier and cerebral metabolism. Dash, P. University of Texas Health Sciences Center at Houston, Houston, USA.  
<https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/m/s4/chapter11.html>

**Site internet 13** : Atlas d'histologie en microscopie optique. McGill University, Montréal, QC, Canada.  
[http://audilab.bmed.mcgill.ca/HA/html/nrv\\_29\\_F.html](http://audilab.bmed.mcgill.ca/HA/html/nrv_29_F.html)

**Site internet 14** : Atlas d'histologie humaine et animale. Substance grise et substance blanche.  
<http://webapps.fundp.ac.be/umdb/histohuma/histohuma/index.php?go=img&chap=58&pos=3&dsc=1>

**Site internet 15** : Cerebellar pathways. College of Medicine & Health Sciences, Al Ain, Emirats Arabes Unis.  
<http://humanphysiology.academy/Neurosciences%202015/Chapter%205/A.5p%20Cerebellar%20Pathways.html>

**Site internet 16** : Neuroscience Products, Lafayette Instrument.  
<http://lafayetteneuroscience.com/products/>



# ANNEXES



## Annexe 1 : Tableau des études cliniques rétrospectives rapportant des hypersignaux cérébraux ou non

Etudes cliniques rétrospectives, publiées dans des journaux à comité de lecture (au 4 septembre 2018) concernant la prise progressive de signal T1 dans des structures cérébrales chez des patients adultes.

Référence	Chélate(s) de Gd	Structures SNC étudiées	Diagnostic	N patients	Fonction rénale	Principaux résultats
<b>Adin</b> <i>AJNR 2015</i>	Multiples (surtout gadopentate)	ND	Tumeurs SNC	184	N	↑ signal T1 du ND
<b>Bae</b> <i>Eur Radiol 2017</i>	Gadobutrol Gadodiamide Gadopentétate Gadotérate (tous : double dose)	GP, ND	Métastases SNC	Linéaires : 6 Macrocycliques : 44 Les 2 catégories : 72	N (96% des pts)	↑ signal T1 avec les linéaires
<b>Barbieri</b> <i>CMMI 2016</i>	Gadobénate Gadobutrol Gadodiamide Gadotérate Gadotéridol	GP, ND	Diverses	3 rapports de cas	Anormale	↑ signal T1 de GP et ND. Signes neurologiques transitoires (cause indéterminée) FSN chez 2 pts
<b>Bauer</b> <i>J Nucl Med Technol 2016</i>	? (« multiples types et marques »)	GP, ND	?	15 (CE-IRM + TEP-CT) & 15 pts témoins (IRM non injectée + TEP-CT)	N	SUV <sub>max</sub> de ND et GP des pts CE-IRM < pts témoins → ↓ capture F <sup>18</sup> DG





<b>Behzadi Radiology 2018</b>	Gadopentétate (≥ 6 inj.) avant gadobutrol (multiples inj.)	ND	Tumeurs SNC	13	N	↑ signal T1 de ND après ≥ 6 inj. de gadopentétate puis ↓ signal T1 après passage au gadobutrol
<b>Bjørnerud Radiology 2017</b>	Gadobutrol (10-44 adm.)	ND	Gliome	17	?	Assoc. linéaire significative entre le nombre d'adm. de gadobutrol et l'↑ signal T1 de ND. ↑ signal T1 visible chez 2 pts avec 37 et 44 adm.
<b>Bolles AJNR 2018</b>	Gadobénate (10,1 ± 3,2 inj.)	GP, ND	Tumeurs SNC	29	N	↑ signal T1 GP et ND
<b>Cao Invest Radiol 2016</b>	Gadobénate Gadodiamide Gadopentétate (1,8 ± 1 inj.)	GP, ND, plexus choroïdes	Diverses	25 (et 25 témoins avec DFG normal)	Anormale (pts hémodyalysés)	↑ signal T1 ND et plexus choroïdes si insuffisance rénale vs. témoins
<b>Cao AJR 2016</b>	Gadobutrol Gadopentétate (≥ 6 inj.)	ND	Tumeurs SNC, vasculite, démyélinisation, infection	25 (et 25 témoins non injectés)	Variable	↑ signal T1 du ND avec gadopentétate mais pas gadobutrol
<b>Conte Eur Radiol 2017</b>	Gadoxétate (11,1 ± 5,6 inj.)	GP, ND	Mélanome	17	↓ DFG au long de l'étude mais N à la dernière adm.	Absence de prise de contraste T1 avec Gadoxétate
<b>Eisele Medicine 2016</b>	Gadotérate (≥ 6 adm., moyenne 6,8 adm.)	ND	SEP (Poussée-rémission, rémittente)	41	N	Absence de prise de contraste T1 avec gadotérate
<b>Eisele</b>	?	ND	SEP	6 pts SEP avec hypersignal T1 des	?	IRM du Na <sup>23</sup>



<i>J Neuroimaging 2017</i>				ND et 6 pts SEP témoins (ayant reçu un macrocyclique) 6 vol. sains		Absence de différence significative de conc. totale de Na dans ND de pts SEP avec hypersignal T1 vs. pts SEP sans hypersignal T1 et vol. sains
<b>Errante</b> <i>Invest Radiol 2014</i>	Gadodiamide	ND	SEP et métas SNC	38	N	↑ signal T1 du ND
<b>Forslin</b> <i>AJNR 2017</i>	Gadodiamide et Gadopentétate (tous les pts) Gadotérate (6 pts)	GP et ND	SEP	23 et 23 témoins	N	Suivi longitudinal 18 ans ↑ signal T1 du GP et du ND ↑ signal T1 du GP associée à ↓ fluidité verbale
<b>Herazo-Bustos</b> <i>Rev Chil Radiol 2017</i>	Gadobutrol Gadopentétate (≥ 2 inj.)	GP, NC, ND,	SEP	60 (tous les pts ont reçu les 2 chélates de Gd)	N	Absence de prise de contraste T1 dans toutes les structures étudiées
<b>Hitomi</b> <i>Neurology 2017</i>	Gadobénate Gadopentétate	Structures de l'œil	AVC aigu	167	N	Passage de Gd dans les structures oculaires chez 76% des pts. Prise de contraste ≤ 2 h → infarctus + grande taille et perméabilité BHE + importante
<b>Ichikawa</b> <i>Invest Radiol 2017</i>	Gadodiamide (≥ 5 inj.) Gadoxétate (≥ 5 inj. ou 1 inj.)	ND	Gadoxétate: imagerie hépatique Gadodiamide: tumeurs essentielle-ment	132 (33 pts/groupe, y compris témoins non injectés et sans insuff. hépatique)	N	↑ signal T1 du ND avec gadodiamide mais pas avec acide gadoxétique



<b>Kahn</b> <i>Radiology</i> 2017	Gadoxétate (1 – 37 inj.)	GP, ND	CHC, cholangiocarcinome, TNE, K pancréas, métas hépatiques de cancer colorectal	91 et 52 pts témoins	N	↑ signal T1 du ND corrélé au nombre d'administrations (≤ 10 adm. → pas d'hypersignal T1) Rapport signal T1 GP/thalamus → pas corrélé au nombre d'adm.
<b>Kanda</b> <i>Radiology</i> 2014	Gadodiamide Gadopentétate	GP, ND	Surtout histoire de tumeurs SNC ou hors SNC	381 consécutifs, 19 avec ≥ 6 IRM injectées et 16 témoins non injectés	N	↑ signal T1 du ND (rapport ND/P) et GP (rapport GP/thalamus)
<b>Kanda</b> <i>Radiology</i> 2015	Gadopentétate (méd. 2 adm.) Gadotéridol (méd. 2 adm.)	ND	Divers, surtout métas SNC	Gadopentétate : 23 Gadotéridol : 36 Les 2 : 14 pts	?	↑ signal T1 du ND avec gadopentétate, pas avec gadotéridol
<b>Kang</b> <i>Radiology</i> 2018	Gadobutrol (9 ± 8 adm)	GP, T, MB frontale, cortex frontal	Tumeurs malignes 1aires SNC et métas	46	N sauf 1 pt	↑ signal T1 du GP (avec séquence MDME), effet associé au nombre d'adm.
<b>Kang</b> <i>AJNR</i> 2018	Gadopentétate Gadodiamide (Entre sem. -4 et an + 1 puis entre an 1 et an 2)	GP, NC, ND, T	SEP progressive secondaire	80 pts : 9 adm. de chélates de Gd (+ 1 entre an 1 et an 2) 115 pts : 2 adm. (puis 1 entre an 1 et an 2)	?	Exposition élevée : ↑ signal T1 de toutes les structures, liée au nombre d'adm. Exposition faible : ↑ signal T1 du ND seulement Effets gadodiamide > gadopentétate
<b>Kelemen</b> <i>Sci Rep</i>	Gadobutrol	GP, DN, Pul	SEP ou syndrome clinique isolé	20 pts : 1-5 adm. 35 pts : 6-10 adm.	N	↑ signal T1 GP, DN et Pul si rapport de signal fait sur la matière blanche frontale



2018				22 pts : >10 adm.		
<b>Khant</b> <i>Magn Reson Med 2016</i>	Gadotérate (24 fois) Gadopentétate (59 fois) Gadotéridol (3 fois) (au total 86 adm. entre 2003 et 2014)	Diverses	Neurinome bilatéral de l'acoustique	1 (rapport de cas)	N	T1 élevé dans les ND et les GP déjà en 2003. Prise progressive de contraste T1 autour de la scissure calcarine du cortex et des gyri pré- et post-centraux du cortex. Hypothèse d'une colocalisation avec le fer cérébral
<b>Kim</b> <i>Eur J Radiol 2017</i>	Pt 1 : 12 adm. Gadoxétate Pt 2 : 4 adm. Gadoxétate	GP	CHC	2 (rapport de cas)	Pt 1 : IRC modérée Pt 2 : N	Pt 1 : ↑ minime du signal T1 du GP Pt 2 : ↑ importante du signal T1 du GP
<b>Kralik</b> <i>AJR 2018</i>	Gadobénate (7 adm.) Gadotéridol (19 adm.) Gadopentétate (1 adm.) Adm. non précisées : 4	GP, ND, T	Arthro-MR	31 et 34 témoins	N	Absence de prise de contraste T1 après arthroMR uniques (sauf 1 pt avec 2 procédures) avant IRM cérébrale
<b>Kromrey</b> <i>Eur Radiol 2016</i>	Gadobutrol (1 adm., 0,15 mmolGd/kg)	Diverses	Volontaires sains	Gadobutrol : 171 Témoins non inj. : 116	Tous les pts DFG ≥ 30 mL/mn	5 ans après adm. unique de 0,15 mmolGd/kg, absence de prise de contraste T1 de T, P, ND, et pallidum (GP)
<b>Kuno</b> <i>Radiology 2016</i>	Gadopentétate (1 à 8 adm.)	CE, GP, ND, P, T	Diverses (ménin-giome, convulsions, métas SNC, migraine)	Gadopentétate: 9 Témoin non inj. : 26	N	↑ signal T1 de la matière grise vs. témoins. Corrélation de T1 avec dose totale de gadopentétate pour CE, ND, GP, T mais pas P et de T2 de CE, ND et T



<b>Langner</b> <i>Eur Radiol</i> <b>2017</b>	Gadobutrol (2,2 ± 1 adm. ; [1-8])		Syndrome clinique isolé	217	? (pts avec DFG ≥ 30 mL/mn)	Analyse du CE voxel par voxel avec normalisation DART-TEL. Absence de prise de contraste de matière grise ou blanche
<b>Lee</b> <i>PLoS ONE</i> <b>2017</b>	Gadotérate (médiane 5 adm [2-52])	GP, ND	Surtout métas SNC	385	Surtout N (IR → n=28)	Absence d'↑ significative du signal T1 du ND (rapport ND/P) et du GP (rapport GP/T) même chez pts ≥ 20 adm.  ↑ signal T1 du ND (rapport ND/P) chez pts avec IR
<b>Malhotra</b> <i>AJNR</i> <b>2018</b>	Groupe A : Gadopentétate (avant 2011) puis gadobutrol (après 2011) (≥ 4 adm.)  Groupe B : Gadopentétate (avant 2011) puis IRMs non-inj.	GP, ND	SEP (Poussée-rémission, rémittente)	A : 20 B : 6	Groupe A :	Gadopentétate : ↑ significative du signal T1 du ND (rapport ND/P) et supérieur vs. gadobutrol (absence d'effet) (p < 0,001).  Effet sur T1 lié au chélate de Gd et pas à la pathologie.  ↑ du signal T1 du GP (rapport GP/T) mais NS
<b>McDonald</b> <i>Radiology</i> <b>2015</b>	Gadodiamide (4 à 29 adm.)	GP, ND, P, T	Post mortem Surtout tumeurs SNC	13 et 10 témoins	N	Corrélation significative entre la dose reçue et la prise de signal T1 ainsi qu'avec la concentration de Gd total dans les structures étudiées
<b>Marie</b> <i>Invest Radiol</i> <b>2018</b>	Gadodiamide (10 adm.)	Col sup., GP, MB, ND, NVPT, Pul, Put, SN,	Tumeurs (essentiellement malignes)	30	1 pt avec 30 < DFG < 60 mL/mn	↑ progressive et significative du signal T1 de tous les noyaux (/P). MB : NS.  Rapidité d'↑ de prise de contraste T1 : ND > GP Put, Pul, Col. sup., SN, NVPT.
<b>Moreno</b> <i>J Radiol Diagn Methods</i> <b>2018</b>	Gadobutrol (max. 8 adm.)	ND	Mélanome	44	N	Absence de relation entre le rapport ND/P et la dose reçue.  27 images sur 315 avec hypersignal T1 (36,4% des pts).



<b>Moser</b> <i>AJNR 2018</i>	Gadobénate Gadobutrol Gadodiamide Gadoversétamide  (≥ 7 adm.)	ND	Tumeurs SNC	Gadobutrol : 59 Linéaire : 60	« N » (critère : DFG > 30 mL/mn)	Absence d'↑ significative du signal T1 du ND (rapport ND/P) avec gadobutrol contrairement aux chélates de Gd linéaires
<b>Müller</b> <i>Clin Neuroradiol 2017</i>	Gadobutrol  (moyenne 8 examens [6-14]/pt)	GP, ND	Glioblastome	17	N	Relaxométrie quantitative (qT1 et qT2) vs. P et matière blanche, à 3 T → absence de relation entre dose et les qT.
<b>Öner</b> <i>Invest Radiol 2017</i>	Gadopentétate (adm. unique)	GP, ND	Adm. intrathécale (rhinorrhée cérébrospinale et kyste arachnoïdien)	6	N	↑ signal T1 du ND (rapport ND/P) et du GP (rapport GP/T) chez tous les pts
<b>Quattrochi</b> <i>Invest Radiol 2015</i>	Gadodiamide  (≥ 6 adm.)	ND	Méningiome	102	N	↑ signal T1 du ND (rapport ND/P)
<b>Radbruch</b> <i>Radiology 2015</i>	Gadotérate Gadopentétate (≥ 6 adm.)	GP, ND	Tumeurs SNC	2 x 50	N	↑ signal T1 du ND rapport ND/P) et du GP (rapport GP/T) avec le Gadopentétate, pas Gadotérate
<b>Radbruch</b> <i>Invest Radiol 2015</i>	Gadobutrol  (≥ 5 adm.)	GP, ND	Tumeurs SNC	30	N pour la majorité des pts	Absence d'↑ signal T1 du GP (GP/T) et du ND (ND/P et ND/LCR)
<b>Radbruch</b> <i>Invest Radiol 2016</i>	Gadopentétate (≥ 5 adm.) suivi par gadobutrol et (12 pts) Gadotérate (≥ 5 adm.)	ND	Surtout gliomes	36 (12 pts : Gadotérate en plus)	N	↑ signal T1 du ND rapport ND/P) avec gadopentate, pas avec les macrocycles. Au contraire, ↓ du rapport ND/P avec les macrocycles (mais NS)





<b>Radbruch</b> <i>Radiology</i> <b>2017</b>	Gadobutrol Gadotérate (≥ 20 adm.) 23,03 ± 4,20 adm.	ND	Tumeurs SNC	33	N	Absence d'↑ signal T1 du ND (rapports ND/P et ND/PCM) pour les deux macrocycles
<b>Ramalho</b> <i>Radiology</i> <b>2015</b>	Gadobénate Gadodiamide	GP, ND	Diverses indic. SNC	Gadobénate : 46 Gadodiamide : 23	N	↑ signal T1 du ND (rapport ND/PCM) et GP (rapport GP/T) avec gadodiamide, pas gadobénate Gadobénate : tendance à une ↑ signal T1 du ND (% de variation)
<b>Ramalho</b> <i>Eur Radiol</i> <b>2016</b>	Gadobénate ± Gadodiamide	ND	Diverses indic. SNC et tumeur du sein sans métas SNC	Gadobénate + Gadodiamide : 18 Gadobénate : 44	N	↑ signal T1 du ND avec gadobénate + gadodiamide vs. ceux avec gadobénate seul
<b>Ramalho</b> <i>AJNR</i> <b>2016</b>	Gadodiamide (≥ 3 adm.)	ND	Méningiomes sur- tout mais aussi tu- meurs malignes	18	N	Analyse quantitative avec séquence MPRAGE > sé- quence spin-echo T1 pour analyse quali (meilleure cor- rélation avec analyse quanti)
<b>Schlemm</b> <i>Mult Scleros J</i> <b>2016</b>	Gadobutrol Gadopentétate (2 à 5 adm.)	ND	SEP	Gadobutrol : 48 pts Gadopentétate : 49 pts	?	↑ signal T1 du ND (rapport ND/P) avec gadopentétate, pas avec gadobutrol
<b>Splendiani</b> <i>Radiol Med</i> <b>2017</b>	Gadobutrol Gadotérate (≥ 4 adm.)	ND	SEP	158 Gadobutrol : 77 Gadotérate : 81	N	Faibles et NS ↑ signal T1 du ND (rapport ND/P) pour les 2 chélates de Gd
<b>Stojanov</b>	Gadobutrol	ND, GP	SEP	58	N	↑ signal T1 du ND (rapport ND/P) et du GP (rapport GP/T)



<b>Eur Radiol 2015</b>	(4,74 ± 0,72 adm.)		(Poussée-rémision, rémittente)			
<b>Tanaka Eur Neurol 2016</b>	Gadopentétate (≥ 6 adm.)	ND	SEP, neuromyélie optique	21 SEP et 6 neuromyélie optiques	?	Pts SEP → ↑ signal T1 du ND (rapport ND/P) si ≥ 10 adm. de chélate de Gd mais cet effet est significativement plus faible ↑ signal T1 du ND (rapport ND/P) neuromyélie optique
<b>Tedeschi Eur Radiol 2016</b>	Gadobutrol Gadopentétate Gadotérate	ND	SEP (Poussée-rémision, rémittente)	74	?	Corrélation entre vitesse de relaxation R1 et nombre d'adm. de chélate de Gd. Histoire des adm. préalables de chélate de Gd inconnue.
<b>Vergauwen Hered Cancer Clin Pract 2018</b>	Gadobénate Gadopentétate Gadotérate (depuis 04/2016)	GP, ND	Maladie de Von Hippel Lindau (VHL) Sclérose tubéreuse de Bourneville (TSC)	VHL : 28 TSC : 24	8 pts en IRC stades 2 ou 3	↑ signal T1 du ND (rapport ND/P) et du GP (rapport GP/P) corrélée (ND) avec le nombre d'adm. (NS pour TSC)
<b>Weberling Invest Radiol 2015</b>	Gadobénate (≥ 5 adm.) 7.7 ± 3.2 adm.)	ND	Gliome, épendymome, mélanome	50	N chez la majorité des pts	↑ signal T1 du ND (rapports ND/P et ND/LCR)
<b>Zhang Radiology 2016</b>	Chélate de Gd linéaires (≥ 35 adm.)	Diverses	Tumeurs SNC	13	N	↑ signal T1 du ND (n=13) ; GP (n=13) ; SN (n=13) ; T postérieur (n=12) ; NR (n=10) ; colliculi (n=10) ; PCS (n=7) ; NC (n=4) ; T entier (n=3) et putamen (n=2)

adm : administration ; CE : cerveau entier ; CE-IRM : IRM injectée ; DARTEL : Diffeomorphic Anatomical Registration using Exponentiated Lie algebra ; DFG : débit de filtration glomérulaire ; GP : globus pallidus ; indic. : indication ; IR : insuffisance rénale ; IRC : insuffisance rénale chronique ; LCR : liquide céphalo-rachidien ; MB : matière blanche ; métas : métastase(s), N : normal ; ND : noyau dentelé ; NR : noyau rouge ; NS : non significatif ; NVPT : noyau ventro-postérieur inférieur du thalamus ; P : pont ; PCM : pédoncule cérébelleux moyen ; PCS : pédoncule cérébelleux supérieur ; pt : patient ; Pul : pulvinar, Put : putamen, SEP : sclérose en plaques ; SN : substance noire ; SNC : système nerveux central ; T : thalamus, TEP-CT : scanner associé à tomographie par émission de positrons.



## Annexe 2 : Tableau des études cliniques pédiatriques rétrospectives rapportant des hypersignaux cérébraux ou non

Etudes cliniques rétrospectives publiées dans des journaux à comité de lecture (au 4 septembre 2018) concernant la prise progressive de signal T1 dans des structures cérébrales dans des cas pédiatriques.

Référence	Chélate(s) de Gd	Structures SNC étudiées	Diagnostic	N patients	Âge	Délai de suivi pré-post	Principaux résultats
<b>Flood</b> <i>Radiology</i> <b>2016</b>	Gadopentétate (≥ 3 adm.) (5,9 ± 2,7 adm.)	GP, ND	Tumeurs extracrâniennes, anomalies hypophysaires surtout	30 (dont 16 pour analyse pré-post) Témoins non injectés : 57	69 j à 18 ans	8,3 ± 4,1 ans	↑ signal T1 du ND (rapport ND/P) lié à la dose reçue. GP (rapport GP/T) : NS
<b>Hu</b> <i>Pediatr Radiol</i> <b>2016</b>	Gadopentétate (≥ 3 adm.)	GP, ND	Surtout tumeurs malignes SNC	21 et 21 témoins	0,9 à 14,4 ans à la 1 <sup>ère</sup> adm.	7,1 ± 3,7 ans	↑ signal T1 du ND (rapport ND/CC) et du GP (GP/CC), non liées à la dose reçue ou au nombre d'adm.
<b>Ichikawa</b> <i>JMRI</i> <b>2019</b>	Gadodiamide Gadopentétate (1-4 adm. et ≥ 5 adm.)	GP, ND	Surtout tumeurs malignes SNC	42 / groupe (126 au total avec témoins)	16 ans en moyenne [4 -18] ans	1,2 ans pour 1-4 adm. ; 3,5 ans pour ≥ 5 adm.	↑ signal T1 du ND (rapport ND/P) lié à la dose reçue. ↑ signal T1 du GP (rapport GP/T) du groupe > 5 adm.
<b>Kasper</b> <i>Pediatr Radiol</i> <b>2018</b>	Gadobutrol Gadotérate Gadodiamide Gadopentétate (≥ 4 adm.)	ND	Tumeurs intra- ou extra-crâniennes, SEP, infection	70 (linéaires : 16 ; macrocycles : 54)	Linéaires : 7,8 ± 3,8 ans Macrocycles : 8,6 ± 5,7 ans	Linéaires : 1,9 ± 1,5 ans Macrocycles : 3,7 ± 3,0 ans	↑ signal T1 du ND (rapport ND/P) significatif (linéaires > macrocycles où : pas d'effet) si > 12 adm. Effet > 12 adm. plus élevé qu'entre 4 et 8 adm. (linéaires)
<b>Kinner</b> <i>AJNR</i> <b>2018</b>	Gadobénate (≥ 4 adm.) (8 adm., [4-20])	GP, ND	Non confondus par radio-chimio : non précisés	76 (dont 16 avec radio-chimio pour TFP)	9,3 ans		↑ signal T1 du ND (rapport ND/P) et du GP (rapport GP/T) chez 2 enfants/60 du groupe « non confondu » (16 et 20 adm.) et chez 12/16 dans le groupe radio-chimio., lié au nombre d'adm. et à la dose.
<b>Miller</b> <i>Pediatrics</i> <b>2015</b> (voir aussi <i>Robinson</i> 2018)	Gadopentétate (35 adm.)	GP, ND, T	Rhabdomyosarcome puis astrocytome anaplasique	1 (rapport de cas)	8	12 ans	Prise de contraste T1 progressive du ND (la plus précoce), du GP et du T postérieur. Résultats confirmés par analyses quanti. (/CC et muscle temporal)



<b>Radbruch Radiology 2017</b>	Gadotérate (8,6 ± 3,9 adm) [5-23]	ND	Tumeurs malignes SNC	41	9,3 ± 4,6 ans à la 1 <sup>ère</sup> adm.	132,14 ± 56,21 sem.	Absence de prise de signal T1 du ND
<b>Renz Invest Radiol 2018</b>	Gadobutrol (4,1 ± 1,3 [3-7] ans) Gadopentétate (3,9 ± 1,3 [3-7] adm.)	GP, ND	Pathologies tumo- rales, ischémiques, autoimmunes, in- fectieuses, congéni- tales, traumatiques	Gadobutrol n=25 Gadopentétate n=28	Gadobutrol 9,7 ± 5,4 [2- 17] ans  Gadopenté- tate 8,4 ± 6,8 [0-17] ans		↑ significative du signal T1 du ND (rapports ND/P et ND/PCM) et du GP (rapport GP/T) avec gadopentétate mais pas avec gadobutrol
<b>Roberts Brain Dev 2016</b>	Gadopentétate (6 adm.)	GP, ND	Chordome du clivus	1 (rapport de cas)	14 ans	4 ans	↑ progressive signal T1 de GP et ND ↑ significative du signal T1 du ND (rapport ND/P)
<b>Roberts AJNR 2016</b>	Gadopentétate (4-16 adm.)	ND	Tumeurs surtout, SEP	16	7,4 ± 4,8 ans à la 1 <sup>ère</sup> adm. (2 mo-14 ans)	?	↑ significative du signal T1 du ND (rapports ND/P et ND/MBC), corrélée à la dose reçue
<b>Robison JMRI 2018 (voir aussi Miller 2015)</b>	Gadopentétate (36 adm.) Gadotérate (5 adm.)	GP, ND	Rhabdomyosar- come puis astrocy- tome anaplasique	1 (rapport de cas)	8 à 23 ans	15 ans	↑ signal T1 du ND (rapport ND/CC) et du GP (rapport GP/CC) avec le linéaire, mais pas avec le macrocycle
<b>Rossi-Espa- gnet Pediatri Ra- diol 2017</b>	Gadotérate 10 ± 2,8 [6-18] adm	GP, ND	Tumeurs SNC	50 et 59 témoins	8 ± 4,8 ans	933,5 ± 391,6 [235-1692] ans	↑ significative du signal T1 du ND (rapport ND/P) et du GP (rapport GP/T)
<b>Schneider AJNR 2017</b>	Gadobénate (0,05 mmolGd/kg) 7,8 adm. (moy.) [5 - 15]	GP, ND	Pathologies extra- crâniennes	34 et 24 témoins	7,18 ± 5,93 [9 mo-17] ans	2,24 ± 1,97 ans	Absence d'hypersignal T1 de GP, ND, P et T et absence de modifications des rapports d'inten- sité de signal T1 ND/P GP/T
<b>Tamrazi Radiology 2018</b>	Gadopentétate	GP, ND	Tumeurs cérébrales et neuroblastomes	144, soit 55 avec tumeur 1aire + ir- rad ; 19 avec tu- meur + chimio ; 52 avec tumeur	< 18 ans	?	Rapport de signal T1 ND/P du groupe irradié > autres groupes sauf tumeur + chimio ↑ significative du rapport ND/P pour le groupe tumeurs non traitées. Rapport de signal GP/T de tumeurs > neuro- blastomes.



				sans trt ; 18 neuroblastomes			Irradiation et tumeur 1aire du SNC affectent le signal du ND et du GP indépendamment du chélate de Gd
<b>Tamrazi Radiology 2018</b>	Gadobutrol (7,11 ; 7,29 et 4,96 adm. resp.)	GP, ND	Tumeurs SNC	78 Radiothér : 37 Chimiothér : 17 Pas de trt : 24	Radiothér : 8,86 ± 5,27 ans Chimiothér : 3,63 ± 3,45 ans Pas de trt : 8,93 ± 5,55 ans	?	↑ significative du rapport ND/P du groupe radiothér. vs. les 2 autres groupes. Rapport DN/P des groupes chimio. Et tumeurs non traitées : NS Pas d'effet significatif du chélate de Gd sur les rapports de signal ND/P et GP/T quel que soit le groupe. Irradiation affecte le signal du ND indépendamment du chélate de Gd
<b>Tibussek Radiology 2017</b>	Gadotérate Gadotéridol (moy. 14,2 adm.)	GP, ND	Tumeurs SNC	24 (24 Gadotérate et 21 gadotéridol aussi)  24 témoins	8,25 ans [2-14] ans au diagnostic et 12,71 [5-18] ans à la dernière adm.	-	Absence de prise de signal T1 du ND et du GP (rapports GP/Pu et ND/P) et SN et Pu.
<b>Young AJNR 2018</b>	Gadodiamide (6 adm.) Gadotéridol (4 à 8 adm.)	ND	Tumeurs, abcès et cavernome	Gadodiamide : 9 Gadotéridol : 10	7,5 [0,5–16,5] ans à la 1 <sup>ère</sup> adm.	0,92 [0,05–1,58] ans	↑ signal T1 du ND (rapport ND/P) pour gadodiamide mais pas gadotéridol
<b>Young Eur Radiol 2018</b>	Gadobutrol Gadopentétate	ND	Tumeurs (93%, maladie démyélinisante, hémorr. intraventr. (7%))	Gadobutrol : 8 Gadopentétate : 19	8,5 [0,1-18,1] ans à la 1 <sup>ère</sup> adm.	2,8 [0,1-7,0] ans	↑ signal T1 du ND (rapport ND/P) pour l'acide gadopentétate mais pas le gadobutrol
<b>Young Clin Radiol 2018</b>	Gadobénate Gadobutrol Gadodiamide Gadopentétate  9,27 ± 4,23 adm. /pt	ND	Tumeurs SNC et pathologies non tumorales (malformations vasc., maladies autoimmunes, dysplasies corticales focales, etc.)	41	7,75 ± 4,88 ans à la 1 <sup>ère</sup> adm.		↑ signal T1 du ND (rapport ND/P) lié à la dose reçue. De nombreux pts ont reçu à la fois des chélates de Gd linéaires et macrocycliques

adm. : administration, CC : corps calleux ; GP : globus pallidus ; hémorr. intraventr. : hémorragie intraventriculaire ; MBC : matière blanche cérébelleuse ; ND : noyau dentelé ; NS : non significatif ; P : pont ; PCM : pédoncule cérébelleux moyen ; pt : patient ; Pu : pulvinar ; resp. : respectivement ; SN : substance noire ; SNC : système nerveux central ; T : thalamus ; TFP : tumeurs de la fosse postérieure ; trt : traitement ; vasc. : vasculaire.



## Annexe 3 : Mode de préparation des échantillons pour leur inclusion en résine

- Contraste à l'osmium et déshydratation

Les échantillons ont ensuite été plongés pendant 30 minutes dans une solution de cacodylate de sodium contenant 2% de tétraoxyde d'osmium ( $\text{OsO}_4$ ), afin de contraster les tissus pour la microscopie électronique. Ils ont ensuite été rincés au tampon cacodylate, puis une série de bains de déshydratation a été réalisée (70%, 80%, 95%, puis 100%). Un bain d'éther de 20 minutes assure enfin une bonne déshydratation des échantillons.

- Infiltration de résine

La résine utilisée est la suivante: 46% de résine EMBED 812 (substitut d'épon), 36% DDSA (anhydride dodécényl succinique), 18% NMA (anhydride méthylmadique).

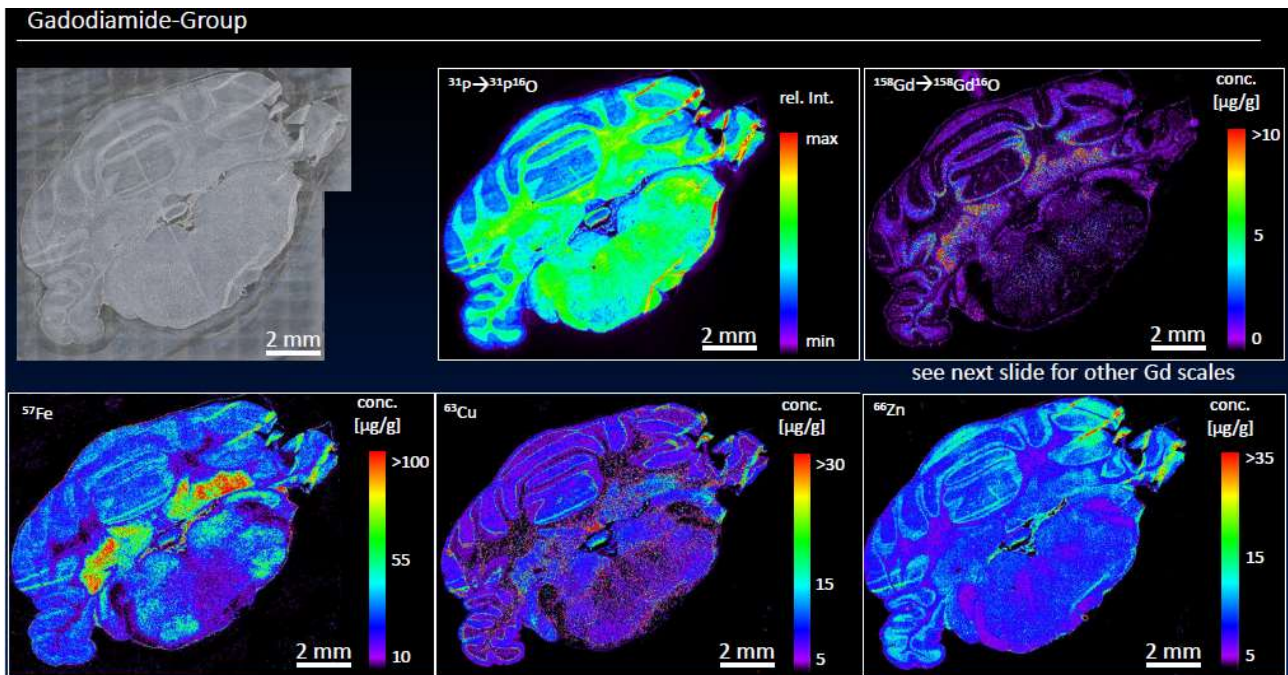
Après une première infiltration à température ambiante pendant la nuit, une résine contenant 2,5% d'accélérateur, la benzyldiméthylamine (BDMA), a remplacé la première, pour une nouvelle infiltration de 2-3 h à température ambiante.

Les échantillons infiltrés ont ensuite été coupés de nouveau, afin de ne conserver que les DCN principalement, puis placés dans un moule contenant le mélange résine-accélérateur. Après quelques heures à température ambiante, puis à l'étuve à 65°C sur la nuit, la résine contenant l'accélérateur polymérise avec l'échantillon qu'elle a infiltré.





## Annexe 4 : Distribution élémentaire sur coupe de cervelet de Rat, par LA-ICP-MS



Distribution des éléments P, Gd, Fe, Cu et Zn, sur une coupe cérébelleuse de Rat ayant reçu au préalable 20 injections de gadodiamide (technique LA-ICP-MS).

## Annexe 5 : Sélection non-exhaustive de marqueurs de toxicité pouvant être évalués

Catégorie de marqueur	Marqueur	Intérêt	Source
Neurones	NeuN (Fox-3, Rbfox3, ou Hexa-ribonucleotide Binding Protein-3)	Coloration spécifique des neurones sur coupe histologique	
	Fluoro-Jade® fluorochrome dérivé de la fluorescéine	Mise en évidence des neurones en dégénérescence	Bolon, 2016; Switzer, 2011; Garman, 2011
	Crésyl Violet	Colorant des tissus cérébraux, notamment des corps de Nissl (amas de réticulum endoplasmique rugueux des neurones), du neuropile et autres populations cellulaires	
	NSE (Neuron Specific Enolase)	Marqueur enzymatique surexprimé en cas de destruction neuronale	Kochanek, 2013; Havnes, 2015; Kozler, 2015
	NTE (Neuropathy Target Esterase)	Intervient dans la croissance des neurites et la différenciation neuronale ; impliqué dans un type de paraplégie spastique	Manzo, 2001
	NFH / NFL (Neurofilament Heavy/Light chain)	Marqueur du dommage axonal. Rapporté comme étant pertinent dans les pathologies non-traumatiques du SNC	Brettschneider, 2006; Petzold, 2009; Rostami, 2012
	MAP2 (Microtubule-associated protein 2)	Marqueur du dommage dendritique	Roberts, 2015
	β-APP (β amyloid precursor protein)	Marqueur du dommage axonal	Rostami, 2012
	Sox14	Facteur de transcription. Marqueur spécifique des neurones des DCN	Prekop, 2016
	UCHL-1 (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isoenzyme L1)	Biomarqueur indiquant un dommage du corps cellulaire des neurones (nécrose). Impliqué dans l'apprentissage et la mémoire	Roberts, 2015; Glushakova, 2012; Kochanek, 2013
Astrocytes	GFAP (Glial fibrillary acidic protein)	Marqueur d'astrogliose et d'autres dommages gliaux et neurologiques. Pertinent pour les pathologies non-traumatiques du SNC	Peres, 2015; Glushakova, 2012; O'Collaghan, 1991
	S100β (S100 calcium-binding protein B)	Reflet de l'état des astrocytes. Exprimé par les astrocytes matures et présent dans l'espace extracellulaire. Participe à la régulation des influx/efflux du calcium cellulaire	Wang, 2013; Sajja, 2016; Havnes, 2015
	TSPO (Translocator Protein)	Marqueur de l'activation gliale. Augmente aussi lors de lésion gliales ou microgliales. Impliqué dans la synthèse des neurostéroïdes qui modulent positivement les récepteurs au GABA.	Chen, 2008; Roberts, 2015



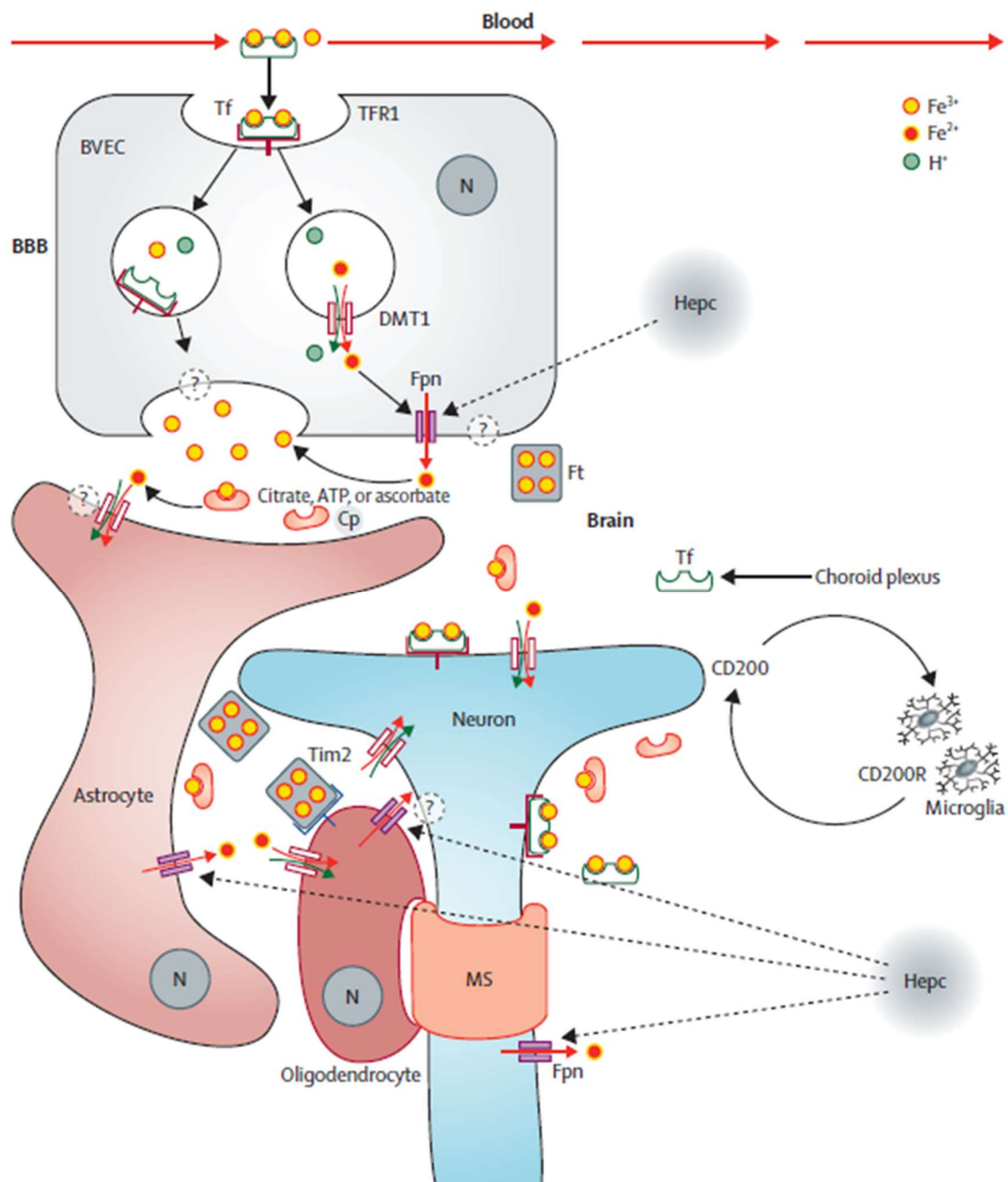
Microglie	CD68 / ED1	Marqueur de la microglie activée (glycoprotéine exprimée par les monocytes et macrophages)	Garman, 2011; Jeong, 2013; Switzer, 2011; López-Pedrajas, 2015
	Iba1 (Ionized calcium-binding adaptor molecule 1)	Marqueur microglial	
	CD11 / Ox42	Protéine d'adhésion exprimée par les cellules immunitaires (marque aussi les macrophages)	
	TMEM-119 (Transmembrane protein 119)	Protéine transmembranaire spécifique de la microglie résidente, distincte des macrophages	Bennett, 2016
Cellules de Purkinje	Calbindine	Protéine de transport liant le calcium, bon marqueur des cellules de Purkinje. Impliquée dans la coordination motrice	Barski, 2003; Kim, 2009
	SBDP-145 (ou -120 ou -150) (spectrin breakdown product)	Protéine du cytosquelette ; Indicateur de lésions des cellules de Purkinje, des atteintes et dégénérescence des granules cérébelleux	Glushakova, 2012; Pritt, 2014; Roberts, 2015
Cellules granulaires	SBDP-145 (ou -120 ou -150) (Spectrin breakdown product)		
Fibres grimpantes	VGLUT2 (Vesicular Glutamate Transporter 2)	Protéine des voies glutamatergiques particulièrement exprimée sur les fibres grimpantes du cervelet	Teigler, 2009
Fibres parallèles	VGLUT1 (Vesicular Glutamate Transporter 1)	Protéine des voies glutamatergiques particulièrement exprimée sur les fibres parallèles	Teigler, 2009
Oligodendrocytes et Myéline	MBP (Myelin Basic Protein), MAG (Myelin-associated glycoprotein)	Marqueur de l'altération de la myéline, de l'intégrité de la substance blanche	Ohta, 2002; Garman, 2011; Kozler, 2015; Sajja, 2016
	Sphingolipides	Lipides des feuillettes de myéline	
	Luxol FastBlue	Colorant de la myéline et des corps de Nissl (cytoplasme des neurones)	Bolon, 2016
Endothélium vasculaire	CD31 (cluster of differentiation 31)	Molécule d'adhésion exprimée sur les cellules endothéliales notamment, et donc utilisé comme marqueur de ces cellules	
	CD146 (cluster of differentiation 146)	Molécule d'adhésion cellulaire exprimée au niveau des jonctions entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses	
	Facteur de Von Willebrand	Glycoprotéine exprimée sur les cellules endothéliales	Zanetta, 2000
Stress oxydatif	GSH/GSSG, (Glutathione reduced/oxydized) + GPx (Glutathione Peroxidase)	Le niveau d'oxydation du glutathione est un bon indicateur du stress oxydatif	Manzo, 2001; López-Pedrajas, 2015
	F2-isoprostanes	Mesure indirecte du stress oxydatif (utilisé en clinique comme biomarqueur de l'exposition à	Manzo, 2001



		certains agents, mais pas spécifique d'une neurotoxicité)	
Inflammation	TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6	Marqueurs de l'inflammation du SNC ; Facteurs de nécrose neuronale	
	ICAM-1, VCAM-1 (Intracellular / Vascular Cell Molecule-1)	Molécules d'adhésion et de migration des leucocytes à l'endothélium	Mrozek, 2012
	NF $\kappa$ B	Marqueur du stress oxydatif et de l'inflammation	López-Pedrajas, 2015
	NMDA-R (N-methyl-D-aspartate Receptor, (sous-unités : NR1, NR2A/B à NR2D)	Rôle important dans l'apprentissage et la mémoire (surtout spatiale)	Zhong, 1995; Zhong, 2002; Kumar, 2015
	GABA (acide gamma-aminobutyrique)	Neurotransmetteur inhibiteur des voies cérébelleuses	Li, 2015
	GAD-65, GAD-67	Isoformes de l'enzyme de synthèse du GABA, la glutamate décarboxylase	
Neurotransmission	DBH (Dopamine Beta-Hydrolase)	Enzyme de dégradation de la dopamine (sa concentration augmente avec l'âge, dans la maladie de Alzheimer, la maladie de Parkinson ou encore la production de dérivés réactifs de l'oxygène)	Manzo, 2001
	Tyrosine hydroxylase	Enzyme impliquée dans la synthèse de la dopamine	Switzer, 2011
	ChAT/AChE (acetylcholine transférase / estérase)	Enzymes des voies cholinergiques (ChAT : synthèse ; AChE : clivage)	
	5-HT (5-hydroxytryptamine, sérotonine)	Neuromédiateur. Marqueur des voies sérotonergiques	
	Noradrénaline	Neuromédiateur. Marqueur des voies noradrénergiques	



Annexe 6 : Transports du fer à travers les différents composants de l'unité neurovasculaire.



BVEC : cellule endothéliale des vaisseaux ; CD200= glycoprotéine membranaire OX-2 ; CD200R : récepteur de Cd200 ; Cp : céruléoplasmine ; DMT1 : transporteur de métaux divalents ; Fpn : ferroportine ; Ft : ferritine ; Hepc : hepcidine ; IRP : iron-regulatory protein ; MS : feuillet de myéline ; N : noyau ; Tf : transferrine ; Tfr1 : récepteur de la transferrine-1 ; Tim2 : récepteur de la ferritine (Ward, 2014).

Annexe 7 : Apport des résultats de cette thèse, mis en perspective des connaissances de la thématique

Thème de recherche	Connaissance de la littérature	Apports personnels
<b>Voie de passage des chélates de Gd</b>	Passage dans le LCR désormais admis. Non traversée de la BHE : légèrement remise en question Voie glymphatique : admise mais mal décrite	Proposition d'un passage par 2 voies d'accès différentes : - Périvasculaire - Diffusion transépendymaire
<b>Population à risque pour l'accumulation cérébrale</b>	Capture plus importante chez la population en insuffisance rénale Hypersignaux T1 observés dans des cas pédiatriques, comparaison à l'adulte difficile	Capture de Gd dans les zones d'intérêt d'autant plus élevées que la fonction rénale est faible (démonstré pour la première fois en prospectif) Contribution à l'étude comparative chez le Rat juvénile (Fretellier 2019)
<b>Comportement en IRM des différents produits</b>	Démonstration que l'hypersignal survient à la suite d'injections de chélates linéaires et pas de chélates de macrocycliques chez l'Homme	Confirmation des travaux déjà publiés (absence d'effets pour le chélate de Gd macrocyclique, contrairement au linéaire). Potentialisation de l'effet T1 des chélates linéaires en cas d'insuffisance rénale. Documentation d'un effet T2 et T2* dans les DCN et le cortex cérébelleux
<b>Lieux d'accumulation du Gd et mise en lien avec les caractéristiques des structures</b>	Concentrations de Gd stockées chez l'Homme peu discutées. Lien avec les métaux rarement discuté ou approfondi	Renseignement du stockage de Gd par dissection des DCN (pour la première fois) Mise en évidence d'une corrélation Gd-Fe dans les structures cérébrales Observation de dépôts insolubles en TEM, localisation subcellulaire dans la lame basale et les pigments de lipofuscine
<b>Devenir à long terme du Gd accumulé</b>	Peu de données cliniques, mais les concentrations de Gd dosés post-mortem sont élevées. Une légère élimination au cours du temps est admise, ainsi que l'association du Gd issu de chélates linéaires à d'autres entités inconnues.	Contribution à l'étude long-terme (1 an) documentant la spéciation (Robert, 2018a)
<b>Conséquences neurologiques de l'accumulation de Gd</b>	Pas d'observation d'effet clinique avéré. Très peu d'études précliniques publiées	Etudes approfondies sur de nombreux paramètres neurologiques, moteurs et cognitifs. Peu d'effets spécifiques à des doses élevées. Observation d'une hypoactivité





# TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 : SCHEMA D'UN SPIN PLACE SOUS L'EFFET DE L'APPLICATION D'UN CHAMP MAGNETIQUE $B_0$ . (SITE INTERNET 1).	17
FIGURE 2 : SCHEMA DE L'ORIENTATION DES SPINS : ORIENTATION PARALLELE OU ANTIPARALLELE DES SPINS, SOUS L'EFFET D'UN CHAMP MAGNETIQUE $B_0$ (SITE INTERNET 2).	17
FIGURE 3 : SCHEMA DE L'ORIENTATION DES SPINS, PROJETEE SUR LE PLAN XY, LORS DE L'ETAT D'EQUILIBRE, L'EXCITATION ET LA RELAXATION (ADAPTE DU SITE INTERNET 3).	18
FIGURE 4 : RELAXATION DES SPINS NUCLEAIRES. A : ORIENTATION MOYENNE DES SPINS AU COURT DE LA RELAXATION (ORANGE), ET PROJECTIONS ASSOCIEES SUR LE PLAN Z (ROUGE) ET SUR LE PLAN XY (VERT), CORRESPONDANT RESPECTIVEMENT AUX RELAXATIONS LONGITUDINALE ET TRANSVERSALE. B : COURBES DE REPOUSSE LONGITUDINALE ET TRANSVERSALE ASSOCIEES. (ADAPTE DE CURRIE, 2013 ; ET DU SITE INTERNET 4).	19
FIGURE 5 : A : IMPACT D'UNE ONDE D'INVERSION DE $180^\circ$ SUR L'ORIENTATION DES SPINS, PROJETES SUR LE PLAN XY. L'INVERSION, ENTRE C ET D, PERMET AUX SPINS LES PLUS LENTS DE RATTRAPER LES PLUS RAPIDES, GRACE AU « DEMI-TOUR » ENGENDRE. B : COURBES $T_1$ , $T_2$ ET $T_2^*$ AVEC INVERSIONS A $180^\circ$ ET TEMPS D'ECHOS $T_E$ PERMETTANT L'ENREGISTREMENT DU SIGNAL $T_2$ ET $T_2^*$ . LE $T_2^*$ , AFFECTE PAR LES INHOMOGENEITES DE CHAMP, EST PLUS COURT QUE LE $T_2$ REEL (CURRIE, 2013).	20
FIGURE 6 : CHOIX DU TEMPS D'ECHO $T_E$ ET DU TEMPS DE REPETITION $T_R$ SELON LA PONDERATION DE LA SEQUENCE D'ACQUISITION, AFIN D'OBTENIR LE CONTRASTE $T_1$ OU $T_2$ IDEAL ENTRE LES STRUCTURES, ET IMAGES IRM ASSOCIEES (SITES INTERNET 5 ET 6).	21
FIGURE 7 : CONFIGURATION ELECTRONIQUE DES ELEMENTS DE TRANSITION ET DES LANTHANIDES, AINSI QUE LE MOMENT MAGNETIQUE QUE LEURS SPINS ELECTRONIQUES LEUR CONFERENT (D'APRES MOTOVILOVA, ET SHAOYING, 2017)	23
FIGURE 8 : REPRESENTATION DES FACTEURS DES SPHERES INTERNE (« INNER SPHERE ») ET EXTERNES D'UN CHELATE DE GD, AFFECTANT LA RELAXATION DES PROTONS DU MILIEU ENVIRONNANT. L'OXYGENE DES MOLECULES D'EAU EST SCHEMATISE DE COULEURS DIFFERENTES : GRIS : MOLECULE D'EAU INTERAGISSANT AVEC LE $Gd^{3+}$ , DANS LA SPHERE INTERNE ; BLEU : MOLECULES D'EAU ENVIRONNANTES INTERAGISSANT DANS LA SPHERE EXTERNE AVEC LE LIGAND ; ROUGE : MOLECULES D'EAU POUVANT REMPLACER CELLE DE LA SPHERE INTERNE, VIA UN ECHANGE MODULE PAR LE TEMPS DE RESIDENCE $T_M$ ET LE TEMPS DE CORRELATION ROTATIONNEL $T_R$ DU CHELATE (DE LEON-RODRIGUEZ 2015).	26
FIGURE 9 : EFFET DES AGENTS DE CONTRASTE SUR LES COURBES DE RELAXIVITES LONGITUDINALE ET TRANSVERSALE, MENANT A DES $T_1$ ET $T_2$ DIMINUES (SOURCE GUERBET).	27
FIGURE 10 : PROFIL NMRD DU PROTON POUR DIFFERENTS COMPLEXES DE GD DANS L'EAU, A $37^\circ C$ (LAURENT, 2006). LA ZONE COLOREE CORRESPOND AUX CHAMPS D'APPLICATION CLINIQUE.	29
FIGURE 11 : CONSTANTES DE STABILITE THERMODYNAMIQUE DES DIFFERENTS CHELATES DE GD, REPRESENTEES PAR $K_{COND}$ (ECHELLE LOGARITHMIQUE) OU $LOGK_{COND}$ (ETIQUETTE AU-DESSUS DU GRAPHE) (D'APRES PORT, 2008).	34
FIGURE 12 : DEMI-VIES DE DISSOCIATION DES CHELATES DE GD, DANS DES CONDITIONS ACIDES (PH 1) ET A $25^\circ C$ . LES CHELATES MACROCYCLIQUES SE DISTINGUENT PAR UNE DEMI-VIE DE RETOUR A L'ETAT D'EQUILIBRE TRES NETTEMENT SUPERIEURE A CELLES DES AGENTS LINEAIRES : MEME A PH 1 (ET A $25^\circ C$ ), ILS NE SE DECHELATENT IN VITRO QU'AU BOUT DE PLUSIEURS HEURES, CONTRE QUELQUES SECONDES POUR LES LINEAIRES (D'APRES PORT, 2008).	35
FIGURE 13 : (A) EVOLUTION TEMPORELLE DE LA CONCENTRATION DE GD DISSOCIE RAPPORTEE A LA CONCENTRATION TOTALE POUR TOUS LES CHELATES DE GD COMMERCIALISES INCUBES DANS DU SERUM HUMAIN A $37^\circ C$ . (B) CHANGEMENT D'ECHELLE POUR L'OBSERVATION DU COMPORTEMENT DES CHELATES MACROCYCLIQUES ET LINEAIRES IONIQUES (FRENZEL, 2008).	36



FIGURE 14 : APPORT DU GROUPE CARBOXYLIQUE DES CHELATES IONIQUES DANS LE MAINTIEN DE L'ION $Gd^{3+}$ EN SON SEIN.	38
FIGURE 15 : REPRESENTATION DES 8 CYCLES A 5 CHAINONS DU GADOTERATE, CHELATE DE GD IONIQUE ET MACROCYCLIQUE.	38
FIGURE 16 : REACTIONS ENGLOBEES SOUS LE TERME D'HYPERSENSIBILITE (JOHANSSON, 2001).	44
FIGURE 17 : MANIFESTATIONS CLINIQUES DE LA FSN (D'APRES COWPER, 2008 ET GIRARDI, 2011)	47
FIGURE 18 : PRINCIPALES CARACTERISTIQUES HISTOPATHOLOGIQUES DE LA FSN (D'APRES GIRARDI, 2011).	47
FIGURE 19 : MECANISME SCHEMATIQUE DE LA FIBROSE SYSTEMIQUE NEPHROGENIQUE SUR LA BASE DES DONNEES AVEREES (FRETILLIER, 2013).	49
FIGURE 20 : AUGMENTATION PROGRESSIVE DE L'HYPERSIGNAL T1 AU NIVEAU DU NOYAU DENTELE (L'UN DES NPC) CHEZ UN PATIENT PRESENTANT DES METASTASES CEREBRALES (A-D) ET UN PATIENT PRESENTANT UNE SCLEROSE EN PLAQUES (E-H) (ERRANTE, 2014).	53
FIGURE 21 : LIEN ETABLI ENTRE LE NOMBRE DE PROCEDURES IRM INJECTEES, ET L'APPARITION D'UN HYPERSIGNAL AU NIVEAU DU NOYAU DENTELE (CEMRI : « CONTRAST-ENHANCED MAGNETIC RESONANCE IMAGING » ; HDN : HYPERSIGNAL APPARENT DU NOYAU DENTELE ; NDN : NOYAU DENTELE NORMAL) (ADIN, 2015).	53
FIGURE 22 : RAPPORT DU SIGNAL T1 NOYAU DENTELE / PONT DE PATIENTS AYANT REÇU PLUS DE 6 INJECTIONS DE GADOPENTETATE (MAGNEVIST®, LINEAIRE), OU DE GADOTERATE (DOTAREM®, MACROCYCLE) (50 PATIENTS PAR GROUPE). DANS LE CAS DU CHELATE DE GD LINEAIRE, UN REHAUSSEMENT DU SIGNAL T1 DU NOYAU DENTELE EST OBSERVE PAR RAPPORT A CELUI DU PONT, MAIS PAS DANS LE CAS DU CHELATE MACROCYCLIQUE (RADBRUCH, 2015A).	54
FIGURE 23 : CONCENTRATION DE GD TOTAL MESUREE PAR ICP-MS SUR DES PIECES D'AUTOPSIE DE 13 PATIENTS ET QUANTIFICATION DES CHANGEMENTS DU SIGNAL T1. A-D : MODIFICATIONS DE L'INTENSITE DU SIGNAL T1 DANS LE GLOBUS PALLIDUS, LE THALAMUS, LE NOYAU DENTELE ET LE PONT VS. LA DOSE CUMULEE DE GADODIAMIDE (ML). E-H : MODIFICATIONS DE LA CONCENTRATION DE GD (ICP-MS) VS. LA DOSE CUMULEE DE GADODIAMIDE (ML) (MCDONALD, 2015).	54
FIGURE 24 : LES DIFFERENTES QUESTIONS SE POSANT AUTOUR DU PHENOMENE DE L'ACCUMULATION CEREBRALE DES CHELATES DE GD, AUXQUELLES NOUS NOUS EFFORCERONS DE REpondRE DANS CE TRAVAIL.	55
FIGURE 25: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES STRUCTURES COMPOSANT LES NOYAUX GRIS CENTRAUX (SITE INTERNET 8).	57
FIGURE 26 : DECOMPOSITION SCHEMATIQUE DU CERVELET EN LOBULES, EN COUPE AXIALE AVEC LOCALISATION DES NOYAUX CEREBELLEUX PROFONDS (A), ET SAGITTALE SUR IMAGE ANATOMIQUE (B). LOBULES DU VERMIS, L : LINGULA ; CE : LOBULE CENTRAL ; CU : CULMEN ; D : DECLIVE ; FO : FOLIUM ; TU : TUBER ; PY : PYRAMIDE ; U : UVULA (COURS M BRAUN, FACULTE DE MEDECINE DE NANCY UNIVERSITE DE LORRAINE).	58
FIGURE 27 : (A) SCHEMA EN COUPE AXIALE DU CERVELET ET DE SES NOYAUX PROFONDS CHEZ L'HOMME (SOBOTTA, 1909). (B) PREMIERE IRM D'UN PATIENT, ET (C) HYPERSIGNAL T1 DU NOYAU DENTELE OBSERVE LORS DE LA 12 <sup>E</sup> IRM (ERRANTE, 2014) ; (ROBERT, 2018B). SUR DE TELLES IMAGES, IL EST, EN FAIT, SOUVENT ASSEZ DIFFICILE DE STATUER SUR LE REHAUSSEMENT DU SIGNAL DU NOYAU EMBOLIFORME, BIEN PLUS PETIT ET ACCOLE AU NOYAU DENTELE.	58
FIGURE 28 : (D) COUPE ANATOMIQUE DU CERVELET ET DU TRONC CEREBRAL DE RAT (PAXINOS, 2007), MONTRANT LES NOYAUX CEREBELLEUX PROFONDS : EN BLEU LE NOYAU LATERAL (CORRESPONDANT AU DENTELE), EN JAUNE LE NOYAU INTERPOSE ANTERIEUR, EN VERT, NOYAU INTERPOSE POSTERIEUR, EN VIOLET LE NOYAU MEDIAN. (E) APPARITION D'UN REHAUSSEMENT T1 DANS LES NOYAUX CEREBELLEUX PROFONDS CHEZ LE RAT, APRES INJECTIONS REPETEES DE GADODIAMIDE (ROBERT, 2016), (ROBERT, 2018B).	59



- FIGURE 29 : CARTOGRAPHIE ANATOMIQUE RELATIVE DES METAUX FE (A), CU (B) ET ZN (C) ET SUPERPOSITION (D) SUR UNE COUPE SAGITTALE DU CERVELET HUMAIN, PAR FLUORESCENCE X (ECHELLE : LA BARRE REPRESENTE 5 MM) (DN : NOYAU DENTELE, GM : MATIERE GRISE ; WM : MATIERE BLANCHE) (POPESCU, 2009). 60
- FIGURE 30 : CARTOGRAPHIE PAR FLUORESCENCE X DU FER (A), CUIVRE (B), ET DU ZINC (C), DANS LE NOYAU DENTELE CHEZ L'HOMME. LE BLANC CORRESPOND A LA PLUS GRANDE CONCENTRATION, LE BLEU FONCE LA PLUS FAIBLE (ECHELLE : LA BARRE REPRESENTE 5 MM) (KOEPPEN, 2012). 60
- FIGURE 31 : DISTRIBUTION DES METAUX ENDOGENES DANS LES NOYAUX GRIS CENTRAUX : FER (A), CUIVRE (C), ZINC (E), ET SUPERPOSITION (G). ON NOTE UNE ACCUMULATION DE FER ET DE CUIVRE DANS LE GLOBUS PALLIDUS (GPI ET GPE) ET DE ZINC EN MOINDRE PROPORTION (D'APRES POPESCU ET NICHOL, 2011) (ECHELLE : LA BARRE REPRESENTE 10 MM). 61
- FIGURE 32 : RESUME DES DIFFERENTES ETAPES PRECEDANT GENERALEMENT LA SPECTROMETRIE DE MASSE, ET LEURS DIFFERENTS MODES. 66
- FIGURE 33 : DIFFUSIONS ELASTIQUE ET INELASTIQUE DES INTERACTIONS ELECTRONS – ATOME (SITE INTERNET 9). 67
- FIGURE 34 : LES DIFFERENTS TYPES D'INTERACTIONS ENTRE LE FAISCEAU D'ELECTRONS ET L'ECHANTILLON. LES ELECTRONS DE DIFFUSION ELASTIQUE SONT UTILISES POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION, TANDIS QUE LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (SEM) UTILISE LES ELECTRONS RETRODIFFUSES. L'ANALYSE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE PAR SPECTROSCOPIE DE PERTE D'ENERGIE D'ELECTRONS (EELS) ET LA TEM PAR FILTRATION D'ENERGIE (EFTM) REPOSE SUR L'ANALYSE DES ELECTRONS DE DIFFUSION INELASTIQUE. ENFIN, LA SPECTROSCOPIE DE DISPERSION D'ENERGIE (EDS) ANALYSE LES PHOTONS X EMIS (SITE INTERNET 10). 68
- FIGURE 35 : PRINCIPE DE L'ICP-MS COUPLEE A L'HPLC (CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE) (DELAFIORI, 2016). 72
- FIGURE 36 : (A) COTATION QUALITATIVE DES IRM. LA COTATION A ETE FAITE SUR UN SCORE DE 0 A 2 (0 : AUCUN REHAUSSEMENT DES DCN, 1 : REHAUSSEMENT PROBABLE, 2 : REHAUSSEMENT NOTABLE) ; (B) RAPPORT DE L'INTENSITE DE SIGNAL MESURE DANS LES DCN RAMENE A CELLE DU TRONC CEREBRAL ; (C) R1 CALCULE DANS LES DCN D'APRES LA CARTOGRAPHIE T1. LES IRM DE TOUS LES RATS (N=6 RATS/GROUPE) ET DES DIFFERENTS DELAIS ONT ETE ANONYMISEES ET RANDOMISEES POUR UNE LECTURE EN AVEUGLE. 100
- FIGURE 37 : TEMPS DE RELAXATION INDIVIDUELS (T2 ET T2\*) MESURES DANS LE DCN DROIT, LE CORTEX CEREBELLEUX ET LE TRONC CEREBRAL POUR LES DEUX GROUPES A HAUT CHAMP (11,7 T) ET AU DELAI M3 CHEZ DES RATS TRAITES PAR LE GADODIAMIDE OU DU SERUM PHYSIOLOGIQUE (N=10 RATS/GROUPE). 101
- FIGURE 38 : EXEMPLE DE CARTES T2 ET T2\* OBTENUES POUR UN RAT DE CHAQUE GROUPE (A UN CHAMP MAGNETIQUE DE 11,7 T). LE GROUPE GADODIAMIDE PRESENTE UNE DIMINUTION DES TEMPS DE RELAXATION T2 ET T2\* DES DCN QUI SE TRADUIT PAR UN HYPOSIGNAL. 102
- FIGURE 39 : DETERMINATION DU GD TOTAL PAR ICP-MS, DANS LES DIFFERENTES STRUCTURES DISSEQUEES. CERVELET\* INDIQUE LA TOTALITE DU PARENCHYME CEREBELLEUX SAUF LES DCN. 103
- FIGURE 40 : COTATION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE (RAPPORT DE SIGNAL DCN/TRONC CEREBRAL) DU REHAUSSEMENT T1 AU NIVEAU DES DCN ET DU 4<sup>E</sup> VENTRICULE (4V). PRE : IRM PRECEDANT LA PERIODE D'INJECTION ; M0 : IRM SUIVANT LA PERIODE D'INJECTION ; M1 ET M3 : RESPECTIVEMENT 1 MOIS ET 3 MOIS APRES LA FIN DE LA PERIODE D'ADMINISTRATIONS. 104
- FIGURE 41: CONCENTRATIONS DE GD TOTAL DETERMINEES (ICP-MS) DANS DIFFERENTES MATRICES D'INTERET, 4 MOIS APRES LA FIN DES INJECTIONS. 105
- FIGURE 42 : ORGANISATION DES VENTRICULES CEREBRAUX, DES PLEXUS CHOROÏDES ET DU LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN (LCR, CSF EN ANGLAIS SUR LE SCHEMA) DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL, AINSI QUE LES DIFFERENTES BARRIERES SANG-PARENCHYME. LES PLEXUS CHOROÏDES, PRODUISANT LE LCR, SONT SITUES DANS LE 4<sup>E</sup> VENTRICULE SOUS LE CERVELET, AINSI QUE DANS LE 3<sup>E</sup> VENTRICULE ET LES



VENTRICULES LATÉRAUX. LE LCR IMMÈGE ENSUITE TOUT LE CERVEAU (SEULEMENT 25% DU LCR SE TROUVENT DANS LES VENTRICULES), PASSANT DES VENTRICULES À LA CISTERNA MAGNA (DERRIÈRE LE CERVELET), PUIS DANS L'ESPACE SOUS-ARACHNOÏDIEN CÉRÉBRAL ET MÉDULLAIRE. LES BARRIÈRES REPRÉSENTÉES ICI SONT (A) LA BARRIÈRE HÉMATOENCÉPHALIQUE SANG-PARENCHYME (OU FLUIDE EXTRACELLULAIRE, « ECF ») ; (B) LA BARRIÈRE SANG-LCR (PRODUCTION DU LCR); ET (C) LA BARRIÈRE LCR-SANG (REABSORPTION DU LCR) (ABBOTT, 2010). 107

FIGURE 43 : ZOOM SUR LES BARRIÈRES À TRAVERSER AVANT D'ATTEINDRE LE PARENCHYME CÉRÉBRAL. (A) : PASSAGE DU SANG AU FLUIDE EXTRACELLULAIRE (ECF) À TRAVERS LA BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE ; OU (B) : TRAVERSÉE DES PLEXUS CHOROÏDES POUR ATTEINDRE LE LIQUIDE CÉPHALORACHIDIEN (CSF), PUIS ACCÈS AU FLUIDE EXTRACELLULAIRE PAR L'ÉPENDYME (C). UNE FOIS DANS LE FLUIDE EXTRACELLULAIRE, LA MEMBRANE PLASMIQUE PRÉSENTE UNE BARRIÈRE SUPPLÉMENTAIRE AU PASSAGE INTRACELLULAIRE (E)(F). EN CE QUI CONCERNE L'ÉLIMINATION, LE RETOUR DANS LE LIQUIDE CÉPHALORACHIDIEN S'EFFECTUE À TRAVERS LA PIÈRE (D), PUIS LE SANG REGAGNE LES SINUS VEINEUX (NAU, 2010). 108

FIGURE 44 : ANATOMIE SCHEMATIQUE DE L'ARBORISATION CÉRÉBROVASCULAIRE. ICA : ARTERE CAROTIDE MOYENNE ; MCA : ARTERE CÉRÉBRALE MOYENNE (ARTÈRE SYLVIEENNE). LES POURCENTAGES INDIQUENT LA RÉSISTANCE VASCULAIRE AU NIVEAU DES DIFFÉRENTES SECTIONS, PERMETTANT LA RÉGULATION DU DÉBIT SANGUIN (IADECOLA, 2017). 109

FIGURE 45 : REPRÉSENTATION DES MODIFICATIONS STRUCTURALES DES VAISSEAUX CÉRÉBRAUX ET DE LEURS CELLULES DE SOUTIEN, SELON QU'IL S'AGIT D'ARTÈRES, D'ARTÉRIOLES, DE CAPILLAIRES OU DE VEINULES. LES COUPES TRANSVERSALES DES VAISSEAUX INDIQUENT LA COMPOSITION DES LAMES BASALES PARENCHYMATEUSE (BLEU CLAIR) ET ENDOTHELIALE (BLEU FONCE). A : ASTROCYTE ; P : PERICYTE ; E : CELLULE ENDOTHELIALE ; PVS : ESPACE PERIVASCULAIRE (ESPACE DE VIRCHOW-ROBIN) (THOMSEN, 2017). L'ESPACE PERIVASCULAIRE EST ÉGALEMENT PRÉSENT AU NIVEAU DES ARTÉRIOLES (NON REPRÉSENTÉ ICI). 110

FIGURE 46 : ORGANISATION DE L'UNITÉ NEUROVASCULAIRE, CONSTITUANT LA BARRIÈRE HÉMATOENCÉPHALIQUE, EN COUPES TRANSVERSALE (A) ET LONGITUDINALE (B) (SITE INTERNET 11). 111

FIGURE 47 : REPRÉSENTATION DES DIFFÉRENTS MODES DE TRANSPORT À TRAVERS LES CELLULES ENDOTHELIALES CAPILLAIRES. AZT : AZATHIOPRINE (SITE INTERNET 11). 112

FIGURE 48: LES PLEXUS CHOROÏDES, BARRIÈRE PHYSIQUE ENTRE CIRCULATION SANGUINE ET LIQUIDE CÉPHALORACHIDIEN. CP : PLEXUS CHOROÏDES ; LV : VENTRICULE LATÉRAL ; 3V : 3<sup>E</sup> VENTRICULE ; CPEC : CELLULE ÉPITHÉLIALE DU PLEXUS CHOROÏDE ; BV : VAISSEAU SANGUIN ; ST : STROMA / MEMBRANE BASALE ; TJ : JONCTION SERRÉE ; CSF : LIQUIDE CÉPHALORACHIDIEN (LIDDELOW, 2015). 113

FIGURE 49 : REPRÉSENTATION DE LA MONOCOUCHE DE CELLULES ÉPENDYMAIRES DES PLEXUS CHOROÏDES, REPOSANT SUR UNE LAME BASALE ET UN STROMA, ORGANISÉES AUTOUR D'UN CAPILLAIRE SANGUIN. LE STROMA CONTIENT ICI DES MACROPHAGES ET DES CELLULES DENDRITIQUES (KAUR, 2016). 114

FIGURE 50 : MODES DE TRANSPORTS À TRAVERS LES PLEXUS CHOROÏDES (LIDDELOW, 2015). 115

FIGURE 51 : BARRIÈRE LCR – SANG (LOUVEAU, 2016). 116

FIGURE 52 : LOCALISATION DES ORGANES CIRCUMVENTRICULAIRES, SELON UNE REPRÉSENTATION DANS LE PLAN SAGITTAL (SITE INTERNET 12) 117

FIGURE 53: HISTOLOGIE DU CORTEX CÉRÉBELLEUX. (A) : COLORATION AU BLEU DE TOLUIDINE ET FUCHSINE ACIDE (FAIBLE GROSSISSEMENT). (B) COLORATION DE DOMINICI (FORT GROSSISSEMENT). ON DISTINGUE PARFAITEMENT LA COUCHE MOLÉCULAIRE EN PÉRIPHÉRIE DES LOBULES (MOL ; 1), LA COUCHE GRANULAIRE ET SES PETITES CELLULES EN GRAIN (G ; 2), AINSI QUE LA COUCHE DES CELLULES DE PURKINJE LES SÉPARANT (P ; 4). EN PROFONDEUR, LES PROLONGATIONS DES NEURONES EN AXONES FORME LA SUBSTANCE BLANCHE (M ; 3) (SITE INTERNET 13 ET 14). 118

FIGURE 54: PRINCIPE SIMPLIFIÉ DE L'ACQUISITION DU SPECTRE ET DE LA FORMATION DE L'IMAGE EN MODES EELS ET ETEM. L'IMAGE DE GAUCHE PRÉSENTE LE SPECTRE D'ÉNERGIE ISSU DU FILTRE EN



ENERGIE. L'IMAGE DE DROITE PRESENTE L'UTILISATION D'UNE FENTE MOBILE (EN ROSE) QUI PERMET LA SELECTION D'ELECTRONS DE DIFFERENTES VALEURS D'ENERGIE ( $E_0$  ET  $\Delta E$ ), QUI, A LEUR ARRIVEE SUR LE DETECTEUR, GENERENT DIFFERENTES IMAGES EFTEM. COMME LES ELECTRONS SUBISSANT DE MULTIPLES DIFFUSIONS PEUVENT PERDRE UNE ENERGIE TOTALE EQUIVALENTE A CELLE D'UN ELEMENT CARACTERISTIQUE, IL CONVIENT DE LES SOUSTRAIRE DE L'IMAGE FORMEE CORRESPONDANT A L'ENERGIE CARACTERISTIQUE DE L'ELEMENT ETUDIE. CETTE APPROCHE NECESSITE L'INTERPOLATION ET LA SOUSTRACTION DU NOMBRE DE COUPS CORRESPONDANT A CES ELECTRONS DIFFUSES (BRUIT DE FOND). LA FIGURE (EN BAS A DROITE) SCHEMATISE CETTE SOUSTRACTION DU BRUIT DE FOND (DA CUNHA, 2016). 123

FIGURE 55: SCHEMA SIMPLIFIE DU PRINCIPE DE L'IMAGERIE CHIMIQUE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE D'IONS SECONDAIRE. UN FAISCEAU D'IONS PRIMAIRES (REPRESENTE EN BLEU FONCE) EST DIRIGE VERS L'ECHANTILLON POUR L'IONISER, TANDIS QUE LE FLUX D'IONS SECONDAIRES GENERE (EN VERT) EST COLLECTE ET AHEMINE GRACE A UN SYSTEME DE LENTILLES, VERS UN SPECTROMETRE DE MASSE. CELUI-CI PERMET L'ANALYSE D'UN NOMBRE LIMITE DE MASSES DIFFERENTES EN SIMULTANE (DA CUNHA, 2016). 125

FIGURE 56 : IRM PRESENTANT LA COUPE CONTENANT LES NOYAUX CEREBELLEUX PROFONDS DES DEUX RATS, LE LENDEMAIN DE LA FIN DES INJECTIONS DE GADODIAMIDE, ET 7 SEMAINES PLUS TARD, JUSTE AVANT L'EUTHANASIE. LE CHIFFRE EN BLANC INDIQUE LE RAPPORT DE SIGNAL T1 DCN/TRONC CEREBRAL. CELUI-CI EST COHERENT AVEC CE QUI APPARAIT VISUELLEMENT : UN REHAUSSEMENT DU SIGNAL T1 EST PLUS NET APRES LES 7 SEMAINES NON-INJECTEES. 142

FIGURE 57 : REPERAGE DES DCN AFIN DE CENTRER LES COUPES TEM ET XRF NANOSCOPIUM (PLUS PETITES, DANS LA ZONE DELIMITEE EN ROUGE), COLORATION AU BLEU DE TOLUIDINE ET MISE EN RELATION AVEC LES DONNEES ANATOMIQUES DE L'ATLAS DE PAXINOS ET WATSON (2007). AU SEIN DE LA ZONE D'INTERET, DEUX STRUCTURES TISSULAIRES SONT BIEN IDENTIFIABLES, L'UNE CONTENANT DES CELLULES PLUS CLAIRES CORRESPONDANT AUX DCN (BAS), L'AUTRE A DE LA SUBSTANCE BLANCHE NE CONTENANT QUE DE LA SUBSTANCE BLANCHE (HAUT). 143

FIGURE 58: FIXATION, A L'AIDE DE VERNIS A ONGLES, DE L'ECHANTILLON (900 X 1500 X 500  $\mu\text{M}$ ) SUR LE SUPPORT METALLIQUE POUR L'EXAMEN EN XRF. 143

FIGURE 59: STATION DE LA NANOSONDE PERMETTANT L'ANALYSE XRF, ET ZOOM SUR L'ECHANTILLON INSTALLE ENTRE LES DEUX DETECTEURS DE FLUORESCENCE (SONDE NANOSCOPIUM, SYNCHROTRON SOLEIL). 144

FIGURE 60: ENERGIE D'ACTIVATION DES ÉLECTRONS DU GD (X-RAY DATA BOOKLET, CENTER FOR X-RAY OPTICS AND ADVANCED LIGHT SOURCE, LAWRENCE BERKELEY NATIONAL LABORATORY, 2001. DISPONIBLE SUR : [HTTP://XDB.LBL.GOV/](http://XDB.LBL.GOV/)). 144

FIGURE 61: ENERGIES CARACTERISTIQUES D'EMISSION SECONDAIRE DE RAYONS X (OU FLUORESCENCE X) DES DIFFERENTES COUCHES DE L'ELEMENT GD ([HTTP://XDB.LBL.GOV/](http://XDB.LBL.GOV/)). 144

FIGURE 62 : CARTOGRAPHIE DU GADOLINIUM, CUIVRE, FER ET SOUFRE (RECONSTRUCTION PAR UN CODE MATLAB DEVELOPPE PAR L'EQUIPE DE LA LIGNE NANOSCOPIUM). LES ECHELLES D'INTENSITE ONT ETE CHOISIES AFIN D'OBTENIR UNE IMAGE PERMETTANT DE CONCLURE SUR LA PRESENCE DE CES ELEMENTS AU NIVEAU DE LA ZONE CONTENANT DU GD. LA « PEPITE » OBSERVEE EN HAUT A DROITE DANS LA CARTOGRAPHIE DU GD (FLECHE) CORRESPOND A LA COPRESENCE DE FE ET DE MN SI L'ON ANALYSE PLUS PRECISEMENT LES SPECTRES (TRES PROCHES) A CE NIVEAU. LE CHLORE, L'ALUMINIUM, LE PHOSPHORE ET LE CALCIUM ONT EGALEMENT ETE CARTOGRAPHIES, MAIS LES RESULTATS NE PRESENTANT PAS D'INTERET MAJEUR, ILS NE SONT PAS PRESENTES. SCAN DE 400 X 400  $\mu\text{M}$ , RESOLUTION DE 1  $\mu\text{M}$ /PIXEL, DUREE D'EXPOSITION 10 MS. 145

FIGURE 63 : DIFFERENTS SPECTRES IDENTIFIES : SPECTRE TOTAL (BLEU), GD (NOIR), MN (VERT) ET FE (ROSE). LES 3 PICS CARACTERISTIQUES DU GD SONT RESPECTIVEMENT RECOUPES PAR CEUX DU MN, DU CO (NON REPRESENTE) ET DU FE. IL VAUT MIEUX TENIR COMPTE DU 2E PIC DU GD POUR LA REPRESENTATION DES CARTOGRAPHIES, PUISQU'AU CONTRAIRE DU MN ET DU FE CONTENUS DE FAÇON ENDOGENES DANS NOS TISSUS, ON NE DETECTE PAS DE CO. 145

FIGURE 64 : SPECTRE MOYEN DE LA ZONE DELIMITEE PAR LE CADRE ROUGE. LES PICS A 6,047 KEV ET 6,715 KEV CORRESPONDENT A DU GD. 146



- FIGURE 65 : CARTOGRAPHIE DES DIFFERENTS ELEMENTS OBSERVES SUR LA ZONE SCANNEE (120 X150  $\mu\text{M}$ ) (RESOLUTION DE 500 NM, TEMPS D'EXPOSITION 100 MS). 147
- FIGURE 66 : COMPOSITION DE L'ECHANTILLON SUR UNE COUPE SITUEE A 5,5  $\mu\text{M}$  DU POINT DE DEPART. ON OBSERVE PRINCIPALEMENT DES AXONES ENTOURES DE MYELINE (CLAIRE), AINSI QUE LE CYTOPLASME D'UNE CELLULE, CONTENANT DE NOMBREUSES MITOCHONDRIES ET CE QUE L'ON IDENTIFIE COMME DES DEPOTS DE LIPOFUSCINE (DEPOTS ARRONDIS PLUS CLAIRS). UN VAISSEAU EN COUPE LONGITUDINALE APPARAÎT EN BAS A DROITE. DES DEPOTS OPAQUES AUX ELECTRONS (EN BLANC, ENCERCLES EN ORANGE) SITUES EN PERIPHERIE DU VAISSEAU POURRAIENT CORRESPONDRE A DU GD SOUS FORME D'«OURSINS », DANS LA LAME BASALE, COMME CELA AVAIT ETE RETROUVE DANS L'ETUDE DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE TRANSMISSION (RASSCHAERT 2018). LES TRACES BLANCHES VERTICALES SONT ARTEFACTUELLES. 148
- FIGURE 67 : COMPOSITION DE L'ECHANTILLON SUR UNE COUPE SITUEE A 8,15  $\mu\text{M}$  DU POINT DE DEPART. DES SUPPOSES OURSINS DE GD (ENCERCLE EN ORANGE) SONT TOUJOURS APPARENTS A LA PERIPHERIE DU VAISSEAU. LES STRIES BLANCHES VERTICALES SONT ARTEFACTUELLES. 149
- FIGURE 68 : COMPOSITION DE L'ECHANTILLON SUR UNE COUPE SITUEE A 23,7  $\mu\text{M}$  DU POINT DE DEPART. ON REPERE UNE AUTRE CELLULE, AVEC UN NOYAU BIEN APPARENT, DES MITOCHONDRIES ET CE QUE L'ON IDENTIFIE ETRE DES DEPOTS DE LIPOFUSCINE (DEPOTS ARRONDIS PLUS CLAIRS) AINSI QUE DE NOMBREUX AXONES ENTOURES DE MYELINE (CLAIRE). 149
- FIGURE 69 : SUPPORT EN PEEK OBTENU PAR IMPRESSION 3D, RECOUVERT D'UN FILM DE KAPTON (POLYIMIDE) (JAUNE). LES DIMENSIONS DE LA FENETRE AINSI OBTENUES SONT DE 3  $\mu\text{M}$  X 3  $\mu\text{M}$ , POUR UNE EPAISSEUR D'ENVIRON 300 $\mu\text{M}$ . 152
- FIGURE 70 : CARTOGRAPHIE ELEMENTAIRE DU GD (A), DU CA (B), ET DE LEUR SUPERPOSITION (C) (JAUNE-ORANGE QUAND FUSIONNE AVEC LE LOGICIEL IMAGEJ) DE L'ECHANTILLON G (300  $\mu\text{M}$  D'EPAISSEUR) (ZONE DE 150X100  $\mu\text{M}$ ). 154
- FIGURE 71 : CARTOGRAPHIE ELEMENTAIRE DU GD (A), DU CA (B), ET DE LEUR SUPERPOSITION (C) (JAUNE-ORANGE QUAND FUSIONNEES AVEC LE LOGICIEL IMAGEJ) DE L'ECHANTILLON C (150  $\mu\text{M}$  D'EPAISSEUR) (ZONE DE 100X150  $\mu\text{M}$ ). 154
- FIGURE 72: IMAGE DE L'ECHANTILLON G OBTENUE GRACE A LA CAMERA UTILISEE POUR CENTRER LE FAISCEAU SUR UNE ZONE D'INTERET. LE SCAN SUR LEQUEL DU GD A ETE IDENTIFIE APPARAÎT EN ROUGE. DEUX SCANS REALISES AU PREALABLE (EN VERT ET BLEU) ONT PERMIS DE DELIMITER CETTE ZONE D'INTERET. 155
- FIGURE 73 : SPECTRE D'ABSORPTION (B) ET CONTRASTE DE PHASE HORIZONTAL (C) ET VERTICAL (D) OBTENUS SUR LA PARTIE HAUTE DE LA ZONE DE L'ECHANTILLON C (SCAN STOPPE A 67%) (A). ON CROIT PEUT-ETRE REPERER LA STRUCTURE EN FORME DE Y DANS LE CADRE B, SANS PLUS D'INFORMATIONS. 156
- FIGURE 74 : (A) COUPE DE 7  $\mu\text{M}$  DE L'ECHANTILLON G (150 X 100  $\mu\text{M}$ ), EN COLORATION HE, AU MICROSCOPE OPTIQUE EN GROSSISSEMENT X 63, LAISSANT APPARAÎTRE QUELQUES NOYAUX CELLULAIRES AUTOUR D'UNE STRUCTURE PARAÎSSANT ALLONGEE; (B) VAISSEAU SANGUIN SUPPOSE ACCUMULANT DU GD DANS CETTE ZONE ; (C) COUPE HISTOLOGIQUE EN NOIR ET BLANC INDIQUANT DES REPERES COHERENTS AVEC LA CARTOGRAPHIE DE GD (FLECHES). 156
- FIGURE 75 : STRUCTURES DES NOYAUX GRIS PROFONDS ET LEURS CONNEXIONS VIA TROIS GRANDES VOIES (DIRECTE, INDIRECTE ET HYPERDIRECTE). COUPE CORONALE A DROITE, SAGITTALE A GAUCHE, SCHEMATISANT RESPECTIVEMENT L'ORGANISATION STRUCTURELLE DU PRIMATE ET DU RONGEUR (NELSON ET KREITZER, 2014). LES ABREVIATIONS SONT EXPLICITEES UN PEU PLUS HAUT DANS LE TEXTE. 176
- FIGURE 76 : CONNECTIVITES DES NOYAUX GRIS CENTRAUX AU SEIN DE LA BOUCLE CORTICO – NOYAUX GRIS CENTRAUX – THALAMO – CORTICALES, **AVEC LE GLOBUS PALLIDUS EN SON CENTRE**. LE CONTROLE DES VOIES PRINCIPALES SERAIT INITIALEMENT DOPAMINERGIQUE, PUIS GABAERGIQUE (SCHROLL, 2013). LES ABREVIATIONS APPARAÎSSENT PLUS HAUT DANS LE TEXTE. 176
- FIGURE 77 : LE CERVELET INTEGRE DES PROJECTIONS DE MULTIPLES SYSTEMES SENSITIFS (EN VERT). LES





NEURONES SORTANT DU CERVELET PAR LES NOYAUX CEREBELLEUX PROFONDS (DCN), PROJETENT VERS LE THALAMUS, L'HIPPOCAMPE, LE COLLICULUS SUPERIEUR, EUX MEME CONNECTES AUX REGIONS CORTICALES MOTRICES DU CERVEAU (EN ROUGE) (BAUMANN, 2015) 177

FIGURE 78 : CYTOARCHITECTURE DU CERVELET : ORGANISATION EN MICROZONES (UBC : « UNIPOLAR BRUSH CELL », OU CELLULE UNIPOLAIRE EN BROsse). LES FIBRES GRIMPANTES (EN ROUGE), PROVIENNENT DE L'OLIVE BULBAIRE DU TRONC CEREBRAL, ET LES FIBRES MOUSSUES DES AUTRES NOYAUX DU TRONC ET DE LA MOELLE EPINIERE (CERMINARA, 2015). 178

FIGURE 79 : (A ET B) PRINCIPALES FIBRES AFFERENTES ET EFFERENTES DES NOYAUX CEREBELLEUX PROFONDS CHEZ L'HOMME ET LEURS VOIES D'ACCES. ELLES FORMENT DEUX BOUCLES AUX FONCTIONS RETROACTIVES, AVEC LE THALAMUS ET LE CORTEX MOTEUR D'UNE PART ; LE NOYAU ROUGE ET L'OLIVE BULBAIRE D'AUTRE PART (SITE INTERNET 15). 179

FIGURE 80 : SYNTHESE SUR L'INTERPRETATION DES MARQUEURS NEUROCHIMIQUES CEREBRAUX (DIDELOT ET SIWIEC) 186

FIGURE 81 : PRINCIPE DE LA MICRODIALYSE : CIRCULATION D'UN PERFUSAT, ECHANGES A TRAVERS LA MEMBRANE SEMI-PERMEABLE ET RECUPERATION DU DIALYSAT (CHARASIA, 2007). 187

FIGURE 82 : TESTS DE L'EVALUATION COMPORTEMENTALE GENERALE : (A) BARRE HORIZONTALE, (B) OPENFIELD, (C) CAGE D'ACTIMETRIE. 194

FIGURE 83 : TESTS PERMETTANT L'EVALUATION DE L'ANXIETE : (A) OPENFIELD (1 X 1 M), AVEC DES REPERES DE COULEUR INDIQUANT LA ZONE ANXIogene (ROUGE) ET LA ZONE PERIPHERIQUE (VERTE), (B) LABYRINTHE EN CROIX SURELEVEE, AVEC LES DEUX BRAS OUVERTS ET LES DEUX BRAS FERMES. 194

FIGURE 84 : TESTS DE MEMOIRE : (A) PISCINE DE MORRIS, (B) LABYRINTHE EN Y, (C) RECONNAISSANCE D'OBJET NOUVEAU. 196

FIGURE 85 : TESTS PERMETTANT D'EVALUER LA COORDINATION MORTICE DU RAT. (A) ROTAROD, (B) STAIRCASE, (C) CATWALK, (D) BALANCE BEAM (SITE INTERNET 16). 196

FIGURE 86 : LE TEST DE VON FREY, CONSISTANT EN L'APPLICATION DE FILAMENTS SOUS LA PATTE DU RAT PLACE SUR UNE GRILLE, AFIN D'EVALUER SON SEUIL DE SENSIBILITE (D'APRES FERRIER, 2016). 198

FIGURE 87 : CHRONOLOGIE GENERALE DE L'ETUDE (INJ : INJECTION ; OF : OPENFIELD, EPM : « ELEVATED PLUS MAZE » OU LABYRINTHE EN CROIX SURELEVEE). LE GROUPE CONCERNE EST INDIQUE PAR LA COULEUR DE L'ECRITURE (VOIR LEGENDE). 202

FIGURE 88 : DISTANCE TOTALE PARCOURUE EN 46H DANS LA CAGE D'ACTIVITE (PHENOTYPER® DE NOLDUS). LES RATS ONT EU LIBRE ACCES A L'EAU ET A LA NOURRITURE PENDANT 46 H ET ONT ETE SEPARES DE LEURS CONGENERES. LA DISTANCE TOTALE PARCOURUE EST MESUREE PAR LE LOGICIEL ETHOVISION® (NOLDUS). 206

FIGURE 89 : DISTANCE PARCOURUE CHAQUE HEURE PENDANT LES 46H D'ACTIMETRIE. LES DISTANCES SONT MESUREES PAR LE LOGICIEL ETHOVISION® (NOLDUS). POUR CHAQUE GROUPE, L'EFFECTIF EST DE N=10 RATS/GROUPE. 207

FIGURE 90 : REPRESENTATION DE L'ACTIVITE DES RATS PLACES EN OPENFIELD SELON LES GROUPES ET LES SESSIONS (OPENFIELD 1 : SEMAINE 7 ; OPENFIELD 2 : SEMAINE 14), A TRAVERS LE NOMBRE DE VISITES DES ZONES (TRANSITIONS CENTRE/PERIPHERIE) (A, D), LA DISTANCE TOTALE PARCOURUE (B, E), ET LA DUREE D'IMMOBILITE TOTALE (C, F), PENDANT LES 10 MINUTES D'EXPLORATION. 208

FIGURE 91 : REPRESENTATION (LOGICIEL ACTUALTRACK®) DES TRACES DES DEPLACEMENTS DES ANIMAUX DANS L'OPENFIELD LORS DE LA SESSION 2 (SEMAINE 14). LES RATS DU GROUPE GADODIAMIDE SEMBLENT MOINS SE DEPLACER, ET RESTER PLUS EN PERIPHERIE (ZONE NON ANXIogene, EN OPPOSITION A LA ZONE CENTRALE). L'UNE DES VIDEOS DU GROUPE NA CL 0,9% N'A PAS ETE ENREGISTREE CORRECTEMENT, CE QUI EXPLIQUE UN EFFECTIF DE 9 ANIMAUX. 209



FIGURE 92 : ETUDE DU CARACTERE ANXIEUX DES RATS, A TRAVERS LE POURCENTAGE D'ACTIVITE AU CENTRE (A, C), ET LE RATIO DE DISTANCE AU CENTRE (B, D).	210
FIGURE 93 : NOMBRE DE TRANSITIONS ENTRE LES DIFFERENTES ZONES, REFLETANT L'EXPLORATION ET DONC L'ACTIVITE DES RATS. POUR LA SESSION EPM1, DEUX VIDEOS ONT MAL ETE ENREGISTREES, D'OU N=10 POUR LE GROUPE GADODIAMIDE MAIS N=8 POUR LE GROUPE TEMOIN.	211
FIGURE 94 : PARAMETRES MESURES POUR LES BRAS OUVERTS (ANXIODES) LORS DES 2 SESSIONS EPM1 ET EPM 2 DU TEST DU LABYRINTHE EN CROIX SURELEVEE.	212
FIGURE 95: TEMPS PASSE DANS LE QUADRANT OU SE SITUAIT LA PLATEFORME POUR LES DEUX SESSIONS.	213
FIGURE 96: PARAMETRES MESURES POUR LES SESSIONS DU TEST DU BALANCE BEAM. LES RATS PARCOURENT UNE TIGE DE PLUS EN PLUS ETROITE. LES FAUTES, LES DISTANCES PARCOURUES SUR LA TIGE ET LE TEMPS MIS POUR PARCOURIR LA TIGE SONT COMPTABILISES. SEULES LES TRAVERSEES EFFECTUEES SANS PAUSE ETANT COMPTABILISEES, 10 RATS DU GROUPE TEMOIN SONT AINSI COMPARES A 8 OU 5 RATS DU GROUPE GADODIAMIDE (LES AUTRES RATS AYANT EFFECTUE DE TRAVERSEES INCORRECTES).	214
FIGURE 97 : SCORE DE TRAVERSEE DE LA TIGE SURELEVEE DU BALANCE BEAM. LES VALEURS REPRESENTENT LA MOYENNE DU SCORE DES DEUX ESSAIS PAR SESSION.	215
FIGURE 98 : MARCHE MAXIMALE ATTEINTE PAR LES RATS AU COURS DU TEST DU STAIRCASE. LES RATS ONT 5 MINUTES POUR ATTRAPER DES RECOMPENSES DISPOSEES SUR L'ESCALIER DE GAUCHE, PUIS 5 MINUTES POUR CELLES PLACEES SUR L'ESCALIER DE DROITE. LA MARCHE 1 CORRESPOND A CELLE LA PLUS HAUTE, DONC LA PLUS PROCHE DU RAT. LA MARCHE 7 CORRESPOND A LA MARCHE LA PLUS BASSE DONC LA PLUS DIFFICILE A ATTEINDRE.	215
FIGURE 99: VITESSE MOYENNE DES TRAVERSEES PENDANT LE TEST DU CATWALK. DURANT LES 3 JOURS (2 JOURS D'ENTRAINEMENT ET TEST A J3), LA VITESSE EST CALCULEE PAR LE LOGICIEL CATWALK® (NOLDUS).	216
FIGURE 100 : PARAMETRES MESURES A VITESSE HOMOGENE POUR LE TEST DU CATWALK. DURANT LES 3 JOURS (2 JOURS D'ENTRAINEMENT ET TEST A J3), LE TEMPS DE CONTACT (APPUI) OU DE NON CONTACT (LEVEE) DES PATTES AVANT DROITES AVEC LA VITRE D'ENREGISTREMENT EST CALCULE AU MOYEN DU LOGICIEL CATWALK® (NOLDUS).	217
FIGURE 101 : PROPORTION DES DIFFERENTES CONFIGURATIONS (« PATTERNS », ENCHAINEMENT DES PATTES) DE MARCHES UTILISEES PAR LES RATS. DURANT LES 3 JOURS (2 JOURS D'ENTRAINEMENT ET TEST A J3), LES CONFIGURATIONS DE MARCHES ONT ETE IDENTIFIEES ET LEUR FREQUENCE D'APPARITION CALCULEE.	217
FIGURE 102 : PARAMETRES MESURES A CONFIGURATION IDENTIQUES DANS LE TEST DU CATWALK, POUR LA PATTE AVANT DROITE. DURANT LES 3 JOURS (2 JOURS D'ENTRAINEMENT ET TEST A J3), LA LONGUEUR OU LA LARGEUR DES EMPREINTES DE PATTES ONT ETE CALCULEES AU MOYEN DU LOGICIEL CATWALK® (NOLDUS).	218
FIGURE 103 : SPECTRES MOYENS (SOMMES SUR LES 10 ANIMAUX DE CHAQUE GROUPE) OBTENUS POUR CHAQUE GROUPE. LES PRINCIPAUX METABOLITES QUANTIFIABLES SONT INDICUES (NAA : N-ACETYLASPARTATE ; GLU : GLUTAMATE ; TCR : CREATINE TOTALE ; TCHO : COMPOSES CHOLINE ; TAU = TAURINE ; INS = MYO-INOSITOL ; MM = MACROMOLECULES). AUCUNE VARIATION FRANCHE DU SIGNAL, DEPENDANTE DU TRAITEMENT, N'A ETE OBSERVEE.	218
FIGURE 104 : SIGNAUX DES SPECTRES MOYENS OBTENUS PAR SPECTROSCOPIE RMN AU NIVEAU DES DCN (NACL 0,9% EN ROUGE, GADODIAMIDE EN BLEU).	219
FIGURE 105 : MOYENNE DES DOSAGES REALISES DANS LES 3 DERNIERS DIALYSAT DE MICRODIALYSE. LID : LIMITE INFERIEURE DE DETECTION ; LES VALEURS DANS LA ZONE POINTILLEE SONT DONC EXTRAPOLEES. LES VALEURS SONT EN MMOL/L (GLUCOSE, LACTATE) OU EN μMOL/L. LACTATE/PYRUVATE ; SONT ENTOUREES LES POINTS DONT AU MOINS L'UNE DES DEUX VALEURS ETAIENT < LID. L'ANALYSE STATISTIQUE A INCLUS TOUTES LES VALEURS, Y COMPRIS CELLES INFERIEURES A LA LID ET DONC EXTRAPOLEES.	220



FIGURE 106 : DETECTION EN FLUORESCENCE DES PIGMENTS DE LIPOFUSCINE COLORES PAR LE TRITC (ROSE) DANS LES NOYAUX CEREBELLEUX PROFONDS. LES NOYAUX CELLULAIRES APPARAISSENT EN BLEU (DAPI).	221
FIGURE 107 : CHRONOLOGIE DE L'ETUDE IN VIVO	224
FIGURE 108 : COTATION ET RESULTATS DE LA SESSION 2 DU TEST DES BARRES INCLUS DANS LE TEST D'IRWIN MODIFIE.	227
FIGURE 109 : TEST DE L'OPENFIELD. REPRESENTATION DE L'ACTIVITE DES RATS SELON LES GROUPES ET LES SESSIONS (OPENFIELD 1 : SEMAINE 7 ; OPENFIELD 2 : SEMAINE 16), A TRAVERS LE NOMBRE DE VISITES DES ZONES (TRANSITIONS CENTRE/PERIPHERIE) (A, D), LA DISTANCE TOTALE PARCOURUE (B, E), ET LA DUREE D'IMMOBILITE TOTALE (C, F), SUR LES 10 MINUTES D'EXPLORATION. DU FAIT D'UN ENREGISTREMENT VIDEO DEFECTUEUX, L'EFFECTIF DU GROUPE NACL 0,9% LORS DE LA SESSION 1 EST DE N=9 RATS.	228
FIGURE 110 : TEST DE L'OPENFIELD. ETUDE DU CARACTERE ANXIEUX DES RATS AUX DEUX SESSIONS (SEMAINE 7 ET SEMAINE 16), A TRAVERS LE POURCENTAGE D'ACTIVITE AU CENTRE (A, C), ET LE RAPPORT DE DISTANCE PARCOURUE AU CENTRE SUR LA DISTANCE TOTALE PARCOURUE (B, D).	229
FIGURE 111 : TEST DU LABYRINTHE EN CROIS SURELEVEE. NOMBRE DE VISITES AU TOTAL, DISTANCE PARCOURUE ET DUREE TOTALE D'IMMOBILITE, REFLETANT L'EXPLORATION ET DONC L'ACTIVITE DES RATS SUR LES SESSIONS EPM1 ET EPM2 (SEMAINES 8 ET 17).	230
FIGURE 112 : TEST DU LABYRINTHE EN CROIX SURELEVEE. POURCENTAGE DE VISITES ET D'ACTIVITE DANS LA ZONE ANXIOGENE, AU SEIN DES DEUX SESSIONS.	231
FIGURE 113 : TEST DU BALANCE BEAM. NOMBRE MOYEN D'ERREURS ET LEUR DISTANCE. LES EFFECTIFS SE REDUISENT SUR LE GRAPHIQUE DES DISTANCES DE L'ERREUR CAR CERTAINS RATS N'ONT PAS FAIT D'ERREURS.	232
FIGURE 114 : TEST DU STAIRCASE. MARCHE MAXIMALE ATTEINTE A GAUCHE ET DROITE	232
FIGURE 115 : COOPERATION DES RATS SUR LE TEST DU ROTAROD A VITESSE DE ROTATION CROISSANTE. L'ENTRAINEMENT AMELIORE LA COOPERATION AU FIL DE LA SEMAINE, PUISQU'ELLE AUGMENTE PROGRESSIVEMENT, AVANT DE DIMINUER LE 5 <sup>E</sup> JOUR POUR LES GROUPES GADOTERATE ET GADODIAMIDE (B ET C).	233
FIGURE 116 : TEST DU ROTAROD. VITESSE MOYENNE ATTEINTE SUR LES 3 ESSAIS LORS DU PROTOCOLE D'ACCELERATION, AU JOUR 4 (MAXIMUM 40 RPM).	234
FIGURE 117 : TEMPS DE COURSE AVANT LA CHUTE, SUR LE ROTAROD TOURNANT A VITESSE CONSTANTE. LES ANIMAUX CHUTANT PLUS RAPIDEMENT EN B ET C SONT LES MEMES POUR TOUTES LES VITESSES DE ROTATION.	234
FIGURE 118 : TEST DU LABYRINTHE EN Y. EVOLUTION DE L'APPRENTISSAGE DE LA TACHE « VISITER LE BRAS DROIT » AU COURS DU TEMPS.	235
FIGURE 119 : TEMPS D'EXPLORATION D'UN OBJET INCONNU PLACE A COTE D'UN OBJET CONNU, SUR UNE DUREE D'EXPLORATION TOTALE DE 20 SECONDES.	236
FIGURE 120 : SEUIL DE RETRAIT DE LA PATTE (DROITE) SELON LES MANIPULATEURS ET LES GROUPES. LES BARRES CORRESPONDENT AU NOMBRE DE RATS AYANT EFFECTUE UN MOUVEMENT DE RETRAIT DE LA PATTE POUR CHAQUE DIAMETRE DE FILAMENT APPLIQUE.	236
FIGURE 121 : NOMBRE DE FRIANDISES TROUVEES LORS DU TEST	237
FIGURE 122 : CONCENTRATIONS DES DIFFERENTS MARQUEURS D'INFLAMMATION OU DE STRESS, DETERMINEES DANS DU SERUM PRELEVE LORS DE L'EUTHANASIE DES ANIMAUX.	238
FIGURE 123 : EXEMPLE DE MARQUAGES OBTENUS DE GAD65 (A) ET GAD67 (B) SUR DES COUPES CEREBELLEUSES CONTENANT LES DCN. (C) : MARQUAGE DE GAD67 DANS LES DIFFERENTES	



POPULATIONS CELLULAIRES DU CORTEX CEREBELLEUX.	238
FIGURE 124 : DENSITES OPTIQUES DES MARQUAGES GAD65 ET GAD67 (MOYENNE DES DCN, N=4 RATS). LES DIFFERENCES NE SONT PAS SIGNIFICATIVES (P = 0,793 POUR GAD65, ET P = 0,364 POUR GAD67).	239
FIGURE 126 : HYPOTHESE MECANISTIQUE DE DISTRIBUTION ET D'ACCUMULATION DES CHELATES DE GD MACROCYCLIQUES ET LINEAIRES – PARTIE 1 : <b>PASSAGE TRANS-EPENDYMAIRE</b> (VOIR LEGENDE DANS LA FIGURE 126) (ILLUSTRATION : MIGUEL SOARES).	265
FIGURE 127 : HYPOTHESE MECANISTIQUE DE DISTRIBUTION ET D'ACCUMULATION DES CHELATES DE GD MACROCYCLIQUES ET LINEAIRES – PARTIE 2, VOIE PERI-VASCULAIRE (ILLUSTRATION : MIGUEL SOARES).	267



# LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : TYPE DE SIGNAL IRM SELON LA COMPOSITION TISSULAIRE PREPONDERANTE ET LA PONDERATION SELECTIONNEE	22
TABLEAU 2 : ASPECT IRM DES TROIS TISSUS DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL SELON LA PONDERATION (KASTLER, 2003)	22
TABLEAU 3 : CONSTANTES DE RELAXIVITE LONGITUDINALE $R_1$ ET TRANSVERSALE $R_2$ DES DIFFERENTS CHELATES DE GD, DANS DU PLASMA BOVIN A 37°C (ROHRER, 2005).	28
TABLEAU 4 : STRUCTURE MOLECULAIRE DE COMPLEXES DE GADOLINIUM COMMERCIALISES A CE JOUR OU L'AYANT ETE (PORT, 2008).	31
TABLEAU 5 : CONCENTRATION, DOSE ET INDICATIONS DES DIFFERENTS CHELATES DE GD	32
TABLEAU 6 : CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES CHELATES DE GD (D'APRES PORT, 2008).	36
TABLEAU 7 : NATURE ET CONCENTRATION DES LIGANDS « LIBRES » AJOUTES DANS LES SOLUTIONS PHARMACEUTIQUES DE CERTAINS CHELATES DE GD (PORT, 2008).	37
TABLEAU 8 : CONSTANTES DE STABILITES DE DIFFERENTS LIGANDS AVEC LES METAUX $Cu^{2+}$ , $Zn^{2+}$ , $Fe^{3+}$ , $Ca^{2+}$ (PORT, 2008).	39
TABLEAU 9 : PRINCIPAUX PARAMETRES PHARMACOCINETIQUES DES CHELATES DE GD CHEZ LE PATIENT ADULTE AVEC FONCTION RENALE NORMALE, APRES ADMINISTRATION INTRAVEINEUSE (IDEE, 2009A).	40
TABLEAU 10 : SYNTHESE DES RESULTATS PRESENTES PAR KANDA ET AL. (KANDA, 2014).	52
TABLEAU 11 : CARACTERISTIQUES ET SIGNIFICATION DES METABOLITES CEREBRAUX LES PLUS COMMUNEMENT OBSERVEES EN SPECTROSCOPIE RMN (D'APRES LEITE, 2010 ET SALVAN, 1997).	186
TABLEAU 12: ELEMENTS POUVANT ETRE DOSES DANS LES DIALYSATS A L'ISSUE DE LA MICRODIALYSE, ET SIGNIFICATION BIOLOGIQUE.	187
TABLEAU 13 : RESUME DES TESTS COMPORTEMENTAUX CHOISIS (DEUX ETUDES CONFONDUES)	193
TABLEAU 14 : CHOIX DES TESTS STATISTIQUES	199
TABLEAU 15 : PARAMETRES ETUDIES SELON LES GROUPES (* : CES PARAMETRES ONT ETE PRESENTES EN PARTIE II).	201
TABLEAU 16 : RESUME DES TESTS COMPORTEMENTAUX CHOISIS	202
TABLEAU 17 : RESUME DES PARAMETRES DE L'ANALYSE HISTOLOGIQUE	205
TABLEAU 18 : TESTS COMPORTEMENTAUX REALISES	225
TABLEAU 19 : RECAPITULATIF DES DIFFERENTS MARQUEURS RECHERCHES A L'ISSUE DE L'ETUDE	225
TABLEAU 20 : CONCENTRATIONS D'UCHL-1 (UBIQUITIN C-TERMINAL HYDROLASE 1) ET DE GABA (ACIDE GAMMA-AMINOBUTYRIQUE) ( $M \pm SD$ ) DANS DES BROYATS DE CERVELETS DE RATS TRAITES PAR DU SERUM PHYSIOLOGIQUE, DU GADODIAMIDE OU DU GADOTERATE (N=10 RATS/GROUPE)	239
TABLEAU 21 : RESUME COMPARATIF DES RESULTATS DES DEUX ETUDES D'EVALUATION DE LA NEUROTOXICITE. (EN GRAS, LES PARAMETRES POUR LESQUELS DES EFFETS ONT ETE OBSERVES ; + : EFFET QUALITATIF ; ++ : EFFET SIGNIFICATIF, $P < 0,05$ ; +++ , EFFET SIGNIFICATIF, $P < 0,01$ ).	241



TABLEAU 22 : CARACTERISTIQUES DES STRUCTURES D'INTERET POUR LA CAPTURE CEREBRALE, CHEZ L'HOMME ET CHEZ LE RAT, EXPLIQUANT LES DIFFERENCES D'ACCUMULATION (D'APRES LES TRAVAUX (DONNEES INTERNES ET DONNEES PUBLIEES) DE LA-ICP-MS DE L'EQUIPE KARST ET FINGERHUT) (FINGERHUT 2018B). 264







**Titre :** Capture cérébrale de chélates de gadolinium : imagerie multimodale et analyse des conséquences neurotoxicologiques

**Résumé :** Les chélates de Gd sont largement utilisés en tant qu'agents de contraste en imagerie par résonance magnétique. En 2015, un lien a été établi entre l'observation d'hypersignaux T1 de certaines structures cérébrales et le nombre d'administrations préalables de ces chélates de Gd reçues par les patients. Cette observation fortuite pose la question de la tolérance à long-terme de ces molécules. L'ion  $Gd^{3+}$  ayant un rayon ionique très proche de celui du  $Ca^{2+}$ , il interfère avec de nombreux processus biologiques  $Ca^{2+}$ -dépendants. Sa chélation par un ligand améliore considérablement sa tolérance. Les chélates de Gd sont répartis en 2 classes : macrocycliques et linéaires, différant par leur stabilité thermodynamique et donc leur tendance à se dissocier. Il est classiquement admis que les chélates de Gd ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique saine. L'observation de ces hypersignaux au niveau du noyau dentelé du cervelet, du *globus pallidus* et parfois d'autres structures, remet en cause ce postulat.

Les travaux de cette thèse visent à étudier le mécanisme d'accumulation du Gd dans le système nerveux central (voies de passage, localisations, spéciation du Gd accumulé). Les potentiels effets neurotoxiques associés à la présence de Gd dans le cerveau ont aussi été recherchés.

Nous avons mis en évidence chez le Rat que l'accumulation cérébrale est d'autant plus importante que la stabilité thermodynamique du chélate de Gd est faible, confirmant les observations cliniques. Les hypersignaux T1 sont en effet liés à des injections répétées de chélates linéaires de Gd. Nous avons aussi établi qu'une insuffisance rénale modérée potentialise la capture cérébrale de Gd dans le cas d'un chélate de Gd linéaire. Nous avons observé que les structures cérébrales accumulent d'autant plus de Gd qu'elles sont riches en fer endogène. Une augmentation de la zincurie, après administration de chélates de Gd linéaires, a également été observée, suggérant un phénomène de transmétallation.

La combinaison des techniques de fluorescence X (XRF), de microscopie électronique en transmission (TEM) et du NanoSIMS, a permis l'observation des dépôts de Gd à différentes échelles et sous différentes formes. Cela a permis de documenter les voies de passage du Gd, le rôle des métaux endogènes et du phosphore. L'analyse XRF a permis d'observer qu'au sein des noyaux cérébelleux profonds du Rat, la majorité du Gd est accumulée sous la forme de structures allongées et ramifiées. Ces structures pourraient être des vaisseaux sanguins. Le Gd serait accumulé dans l'espace périvasculaire. En TEM, des dépôts insolubles de Gd ont été observés dans les lames basales de vaisseaux, dans l'interstitium cérébelleux, et dans l'espace périvasculaire. Ces dépôts à l'apparence épineuse sont riches en phosphore, suggérant des dépôts de  $GdPO_4$ . Du Gd et du phosphore ont également été identifiés dans des cellules gliales, au sein de pigments intracellulaires de lipofuscine. Aucun dépôt de Gd n'a été trouvé chez des rats traités par un chélate de Gd macrocyclique.

L'hypothèse mécanistique établie consiste en l'accès précoce des chélates de Gd au liquide céphalo-rachidien (LCR), puis leur diffusion passive dans le parenchyme proche des ventricules cérébraux, à travers l'épendyme. Arrivés dans des zones riches en métaux endogènes et/ou en phosphore, les chélates de Gd les moins stables thermodynamiquement se dissocieraient, le Gd se liant à des macromolécules endogènes, ou précipitant. La circulation du LCR le long des artéioles pénétrantes piègerait également du Gd au niveau périvasculaire. Les chélates de Gd intacts seraient éliminés par le système glymphatique périvasculaire ou « drainage périartériel intrapariétal ». On retrouve aussi du Gd probablement dissocié à ce niveau.

Hormis une hypoactivité, non spécifique, les études neurocomportementales, histopathologiques et neurochimiques menées chez le Rat n'ont pas permis de mettre en évidence une toxicité avérée, même à des doses élevées.

**Mots clés :** Chélates de Gd ; Imagerie par résonance magnétique ; Accumulation cérébrale ; Tolérance



**Title :** Brain uptake of gadolinium chelates : multimodal imaging and analysis of neurotoxicological consequences

**Abstract:** Gd chelates are widely used as contrast agents in magnetic resonance imaging. In 2015, the finding of T1 hyperintensities in brain structures was associated with the prior administrations of these agents in patients. This observation raised the question of the long-term tolerance of these molecules. The  $Gd^{3+}$  ionic radius is very close to that of  $Ca^{2+}$ , and therefore this lanthanide interferes with numerous  $Ca^{2+}$ -dependent biological processes. Its chelation by a ligand considerably improves its tolerance. Gd chelates are categorized into 2 classes: macrocyclic and linear agents, differing in their thermodynamic stabilities, and therefore in their ability to dissociate. It is classically admitted that Gd chelates do not cross the healthy blood-brain-barrier. The observation of these hyperintensities, in the dentate nucleus of the cerebellum, the globus pallidus, and sometimes other structures, questioned this assumption.

This thesis aimed to study the mechanism of Gd accumulation in the central nervous system: access pathways, tissue and subcellular location, Gd speciation. Potential neuro-toxicological effects associated with long term Gd presence in the brain were also researched.

Using a rat model, we evidenced that the lower the thermodynamic stability of Gd chelates, the greater the cerebral Gd concentration was, thus confirming clinical observations. T1 hyperintensities exclusively appeared following administrations of linear Gd chelates. We also established that moderate renal failure potentiates Gd brain uptake in the case of linear Gd chelate. We also observed that brain structures accumulate even more Gd than their endogenous Fe concentration is high. Administration of linear Gd chelates resulted in an increased zincuria. Gadolinium vs. Zn transmetalation may be responsible for this effect.

The combination of X fluorescence, transmission electronic microscopy, and NanoSIMS, showed Gd deposits at various scales and in various forms. It allowed us to document Gd pathways, and the role of endogenous metals and phosphorus in this phenomenon. X fluorescence analysis depicted, in rat deep cerebellar nuclei, that the majority of Gd was accumulated in the form of elongated and ramified structures, believed to be blood vessels where Gd would be retained in the perivascular area. By means of electron microscopy in rats, Gd insoluble deposits were observed in basal lamina of vessels, in cerebellar interstitium, and in the perivascular space. These Gd deposits, of spiny aspect, were rich in phosphorus, thus suggesting the presence of  $GdPO_4$ . Co-presence of Gd and phosphorous was also identified into glial cells, accumulated in intracellular lipofuscin pigments. No Gd deposits were found in rats treated with a macrocyclic Gd chelate.

The established mechanistic hypothesis consists in the early access of Gd chelates to cerebrospinal fluid, followed by their passive diffusion into the parenchyma close to cerebral ventricles, through the ependyma. Encountering areas rich in endogenous metals and/or phosphorus, the less thermodynamically stable Gd chelates would dissociate, and Gd would bind endogenous macromolecules, or precipitate. Cerebrospinal fluid circulation along penetrating arterioles would also trap Gd at the perivascular level. Intact Gd chelates would be eliminated through perivascular lymphatic pathway, or "intramural periarterial drainage", where probably dissociated Gd is also found.

Except a non-specific hypoactivity, neurobehavioural, histopathological and neurochemical studies performed in rats did not demonstrate any obvious neurotoxicity, even at high doses.

**Keywords :** Gd chelates; Magnetic resonance imaging; Brain uptake; Safety

