

Étude par micro-IRM à 11.7 Tesla du développement du cerveau humain pendant le premier trimestre de grossesse

Dan Boitor-Borza

Département de Gynécologie-Obstétrique
Université de Médecine et Pharmacie
"Iuliu Hatieganu" Cluj-Napoca, Roumanie
danboitor@yahoo.com

Alexandru Farcasanu

Institut de recherche interdisciplinaire en
bio-nano-sciences, Centre d'IRM
préclinique (plateforme INSPIRE)
Université Babes-Bolyai
Cluj-Napoca, Roumanie
stefan.farcasanu@gmail.com

Simion Simon

Institut de recherche interdisciplinaire en
bio-nano-sciences, Centre d'IRM
préclinique (plateforme INSPIRE)
Université Babes-Bolyai
Cluj-Napoca, Roumanie
simon49nmr@gmail.com

Cristina Rotar

Département de Gynécologie-Obstétrique
Université de Médecine et Pharmacie
"Iuliu Hatieganu" Cluj-Napoca, Roumanie
cristina.rotar@umfcluj.ro

Daniel Muresan

Département de Gynécologie-Obstétrique
Université de Médecine et Pharmacie
"Iuliu Hatieganu" Cluj-Napoca, Roumanie
daniel.muresan@umfcluj.ro

Résumé — L'objectif de cette étude de recherche morphologique est de décrire les structures du cerveau embryonnaire et fœtal précoce, qui n'ont pas été précédemment documentées dans la littérature, en utilisant la micro-IRM. Nous avons examiné *in vitro* 7 embryons Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Allemagne) à 11.7 Tesla. L'étude a été menée au Centre National d'IRM, Plateforme INSPIRE, de l'Université "Babes-Bolyai" de Cluj-Napoca, en Roumanie. La micro-IRM offre aux embryologistes une alternative aux techniques histologiques classiques. Par micro-IRM, nous avons identifié certaines structures nerveuses telles que le noyau accumbens, le noyau sous-thalamique, le noyau rouge, la capsule interne, le noyau olivaire inférieur qui n'ont pas été documentées au premier trimestre par des études précédentes.

D'autres structures nerveuses telles que le noyau lenticulaire, l'épiphyse, le claustrum, la commissure antérieure, la commissure habénulaire, ainsi que la structure laminaire du *subpallium* ont été visualisées par micro-IRM à des âges gestationnels plus précoces comme précédemment rapportés dans la littérature.

Mots-clés — *embryon, fœtus, cerveau, développement, micro-IRM*

I. INTRODUCTION

L'arrivée de l'IRM a élargi les frontières des sciences de la vie. Smith et al. [1] ont utilisé cette technique pour la première fois pour étudier les embryons humains, ainsi que les embryons d'autres espèces animales.

L'IRM à forte intensité du champ magnétique offrent une résolution spatiale remarquable. La méthode est également appelée "microscopie IRM" ou "histologie IRM" en raison du fait que les tailles de voxels peuvent être 10^6 fois plus petites que dans les dispositifs cliniques [2]. La micro-IRM est une technique de recherche morphologique qui a démontré sa viabilité dans les investigations *in vitro* des embryons humains, avec une résolution spatiale de 20 μm /voxel ou moins dans des échantillons fixés chimiquement [3].

En utilisant l'investigation par micro-IRM, cette étude a comme objectif de fournir une description de la morphogenèse du cerveau chez les embryons et fœtus âgés de 6 à 14 semaines d'aménorrhée (SA). Nous cherchons à mettre en évidence les régions cérébrales à des âges embryonnaires ou fœtaux très précoces pour lesquels des descriptions par micro-IRM n'ont pas été publiées auparavant. Un deuxième objectif est la spécification précise de la sémiologie de la micro-IRM du cerveau en développement jusqu'à 14 SA, que nous n'avons pas trouvée dans la littérature examinée. De plus, nous avons l'intention de compiler un atlas d'images de référence pour la morphologie par micro-IRM du cerveau embryonnaire et fœtal précoce.

humains entre 6 et 10 semaines d'aménorrhée et 4 fœtus entre 11 et 14 semaines d'aménorrhée. L'investigation par micro-IRM a été réalisée avec un scanner Bruker BioSpec 117/16USR (

II. MATÉRIEL ET METHODE

A. Embryons et fœtus humains

Cette étude porte sur 7 embryons humains âgés de 6 à 10 SA et 4 fœtus âgés de 11 à 14 SA. Ils sont conservés dans une solution contenant 9% de formaldéhyde. Afin de classer les embryons dans l'un des stades de Carnegie selon les critères établis par O'Rahilly et Müller [4], les sujets ont été soumis à une analyse morphologique. Sous un microscope, les embryons et les fœtus ont été évalués morphologiquement. Les critères d'inclusion dans l'étude étaient une morphologie extérieure de haute qualité et normale. En utilisant la longueur craniale-caudale (LCC) des sujets, l'âge gestationnel a été déterminé et exprimé en semaines d'aménorrhée à l'aide du nomogramme standard. Les images micro-IRM résultantes ont été comparées avec des images anatomiques et histologiques de référence correspondant à l'âge des sujets que nous avons étudiés. Ces illustrations peuvent être trouvées dans des ouvrages classiques d'embryologie et d'histologie [5].

B. Acquisition des images

Les sujets ont été examinés à l'aide d'un appareil Bruker Biospec 117/16 USR (Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Allemagne) avec une intensité de champ magnétique de 11.7 Tesla. L'étude a été menée à l'Institut de recherche interdisciplinaire en bio-nano-sciences, centre d'IRM préclinique (plateforme INSPIRE) de l'Université Babeş-Bolyai de Cluj-Napoca, en Roumanie. Les fœtus et les embryons ont été scannés dans des tubes en plastique pour IRM contenant une solution de formaldéhyde à une concentration de 9 %.

Sur un espace actif de 72 mm, l'unité de gradient BGS 9S HP fournit une valeur maximale de 760 mT/m. Pour l'excitation et l'acquisition du signal radiofréquence, une bobine quadripolaire avec un diamètre actif de 40 mm a été utilisée. Toutes les acquisitions d'images ont été réalisées à température ambiante (20°C).

Les images ont été collectées pour chaque plan sagittal, axial et coronal, en utilisant les procédures T_1 -wi et T_2 -wi. Lors des examens IRM du cerveau fœtal préservé au formaldéhyde, la force du signal acquis avec les procédures T_1 et T_2 correspond aux études *in vivo* [6, 7].

En plus des scans 2D axiaux avec des sections de 300 μm d'épaisseur et divers intervalles entre les sections, des scans pour les reconstructions 3D des embryons et des fœtus ont également été réalisés. Le FISP (*Fast Imaging with Steady-state Precession*) a été utilisé pour les créer.

Afin d'obtenir la résolution spatiale idéale pour l'identification des structures cérébrales, les paramètres d'acquisition des images ont été modifiés pour chaque sujet. Ils sont détaillés dans le Tableau I. Pour atteindre la plus haute résolution, une matrice 512x512x256 (MTX) a été superposée sur des images de dimensions variables, en fonction de la taille des sujets étudiés.

TABLEAU I. PARAMÈTRES D'ACQUISITION DES IMAGES

Sujet	FOV ^a (mm)	Matrice (pixel)	Coupes (n)	Résolution (mm/voxel)	TE ^b (ms)	TR ^c (ms)	FA ^d (grade)	Largeur de bande (Hz)	Aquisitions (n)
1	25x25	384x384x384	384	0.065x0.065x0.065	2.59	8.58	30	125000	35
2	26.42x26.56x33.95	1024x1024x181	181	0.026x0.026x0.188	5.95	11.95	35	119047.6	33
3	24.35x26.31x31	720x720x256	256	0.034x0.037x0.121	4.31	8.62	30	125000	60
4	25x25x26	1024x1024x256	256	0.024x0.024x0.102	6.04	12.07	35	119047.6	90
5	24.52x10.94x17.33	720x384x256	256	0.034x0.028x0.068	4.43	8.87	30	125000	100
6	23.813x15.92x19.023	512x384x384	384	0.047x0.041x0.050	3.31	6.62	30	125000	80
7	26.55x20.07x21.35	512x384x384	384	0.052x0.052x0.056	3.45	6.90	35	119047.6	70
9	24.38x13.78x15	384x256x128	128	0.063x0.054x0.117	4.31	8.63	30	125000	50
10	25.084x12.167x17.5	256x356x128	128	0.098x0.048x0.137	3.34	6.68	35	125000	40
11	24.79x24.08x24.65	512x384x256	256	0.048x0.063x0.098	3.34	6.70	35	119047.6	60

^a field of view; ^b temps d'écho; ^c temps de répétition; ^d angle de basculement

C. Traitement des images post-acquisition

Les images 2D obtenues ont été traitées à l'aide de l'application ParaVision®360 (Bruker Corporation, Ettlingen, Allemagne). En utilisant le logiciel InVesalius®, des reconstructions 3D des embryons ont été obtenues (Fig. 1, Fig. 2).

III. RÉSULTATS

Lorsque le protocole T₂-wi est utilisé avec des champs magnétiques de haute intensité, en particulier pour les reconstructions 3D, le protocole FISP surpasse clairement les méthodes alternatives à impulsions de gradient. Dans notre étude, une résolution spatiale remarquable de 24 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ a été obtenue en réduisant la taille de l'image de seulement 20% par rapport à la plus grande image 2D axiale et en augmentant le nombre d'expositions à 32 (Fig. 3).

Différentes structures cérébrales ont été mises en évidence dans notre étude. Nous avons pu distinguer les couches de la paroi latérale des hémisphères cérébraux (appartenant au *pallium*, le futur néocortex) dans un embryon de 32 mm LCC, 10 SA. Dans un embryon de 21 mm, 9 SA, nous avons pu identifier la structure laminaire uniquement dans la paroi ventrale (*subpallium*) des hémisphères cérébraux, d'où émergent les noyaux basaux, et qui présente les mêmes trois couches visibles sur la micro-IRM que la paroi latérale. Nous n'avons pas trouvé cette description de la lamination du *subpallium* à 9 SA dans la littérature que nous avons examinée. Dans le protocole T₁-wi, la zone corticale et la couche interne sont hyper-intenses, tandis que la zone sous-corticale est hypo-intense. À 9 SA, la zone subcorticale se révèle être la couche la plus développée du *subpallium*. À 10 SA, la portion subcorticale du *pallium* est réduite à une fine bande hypo-intense qui s'élargit au cours des semaines suivantes. Chez un fœtus de 55 mm LCC, 12 SA le putamen, le *globus pallidus* et le *claustrum* ont été mis en évidence. Dans un fœtus de 85 mm, 14 SA, les sections médiales et latérales du *globus pallidus* ainsi que la tête du noyau caudé étaient bien délimitées.

Le stage Carnegie 23 est le stade le plus précoce où nous avons pu identifier le noyau accumbens comme faisant partie du *striatum*

basal dans un embryon de 32 mm LCC. Il émerge comme une structure hyper-intense dans la portion rostrale de la paroi ventromédiale des hémisphères cérébraux dans le protocole T₁-wi. Nous n'avons trouvé aucune référence à la mise en évidence de ce noyau par micro-IRM dans la littérature que nous avons examinée.

Dans nos recherches, le noyau rouge et la substance noire pourraient être identifiées comme des structures hyper-intenses en T₁-wi à partir de 12 SA. La proximité du noyau rouge avec le noyau sous-thalamique valide l'hypothèse selon laquelle la zone sous-thalamique sert de zone de transition entre le diencéphale et le mésencéphale. Nous n'avons trouvé aucune référence à l'imagerie micro-IRM de ces structures dans la littérature.

La capsule blanche interne a été identifiée par nous dans un embryon de 32 mm LCC, 10 SA et ses deux bras ont été observés dans un fœtus de 55 mm LCC, 12 SA. Dans le protocole T₁-wi, la capsule interne apparaît comme une structure à faible intensité du signal.

La commissure habenulaire est la première commissure cérébrale à se développer. À côté de la glande pinéale, nous avons identifié la commissure habenulaire chez un fœtus mesurant 38 mm LCC, 11 SA. Nous avons identifié la commissure blanche antérieure chez un fœtus mesurant 55 mm LCC à 12 SA, et le fornix chez un fœtus mesurant 85 mm LCC à 14 SA. Bien que la formation du corps calleux commence à 12 semaines, nous n'avons pas pu l'identifier à cet âge gestationnel, ni à 13 semaines ou 14 semaines. Les formations commissurales télencéphaliques apparaissent comme des structures hypo-intenses dans le protocole T₁-wi.

Dans notre recherche, les progéniteurs du cervelet, les lèvres rhombiques, ont été trouvés dans un embryon de 7 mm LCC, stage Carnegie 13. Leur union dorso-médiale a été observée pour la première fois dans notre étude d'un embryon de 21 mm LCC, stage Carnegie 21. Dans un fœtus mesurant 55 mm, 12 SA, le vermis cérébelleux a pu être identifié.

Dans la moelle allongée, nous avons pu identifier les olives bulbaires chez un fœtus mesurant 55 mm LCC, 12 SA, ainsi que les noyaux gracile et cunéiforme chez un fœtus mesurant 85 mm, 14 SA. Le protocole T₁-wi révèle un hypersignal dans certaines

structures nerveuses. Nous n'avons trouvé aucune référence à ces structures dans la littérature.

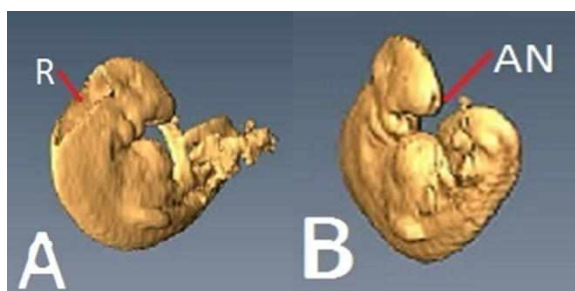


Fig. 1. Embryon humain de 4,5 mm LCC, stage Carnegie 12 examiné par micro-IRM. Les reconstructions 3D sont reproduites (A, B). AN: neuropore rostral, R: rhombencéphale.

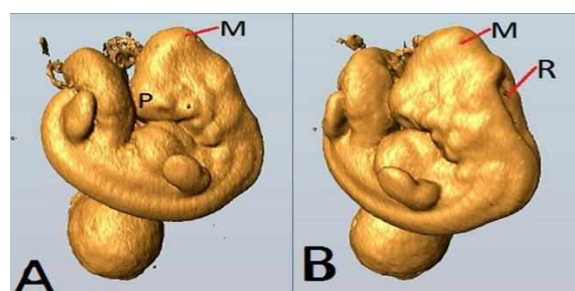


Fig. 2. Embryon humain de 7 mm LCC, stage Carnegie 13, examiné par micro-IRM. Les reconstructions 3D sont reproduites (A, B). M: mésencéphale, P: prosencéphale, R: rhombencéphale.

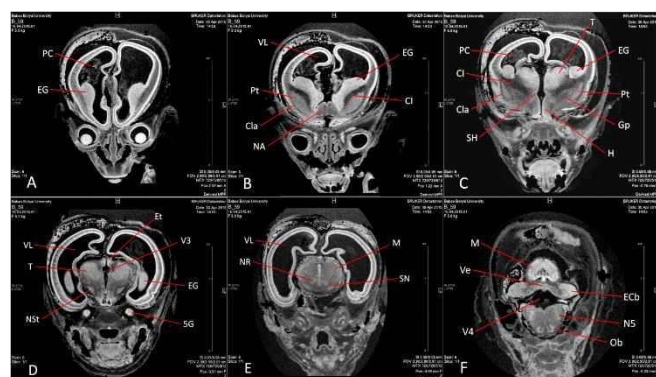


Fig. 3. Fœtus humain de 55 mm LCC, 12 SA, examiné par micro-IRM, coupes coronales (A-F). VL: ventricule latéral, EG: éminence ganglionnaire, T: thalamus, NS: noyau subthalamique, V3: 3ème ventricule, V4: 4ème ventricule, Et: épiphallus, CI: capsule blanche interne, Hp: hippocampe, M: mésencéphale, Pt: putamen, Gp: globus pallidus, NS: noyau subthalamique, Cla: claustrum, Ecb: hémisphères cérébelleuses, NA: nucleus accumbens, PC: plexus choroïde, H: hypothalamus, SH: sillon hypothalamique, SG: noyau trigéminal, NR: noyau rouge, SN: substance noire, Ve: vermis, Ob: olive bulbaire.

IV. DISCUSSION

Cette étude examine les caractéristiques morphologiques du cerveau chez les embryons et fœtus humains au cours du premier trimestre de grossesse.

Dans cette investigation par micro-IRM, le noyau accumbens, le noyau sous-thalamique, le noyau rouge, la capsule blanche interne et les olives bulbaires ont été identifiés à des âges gestationnels précoces. Aucune documentation de ces structures utilisant cette technique n'a été trouvée dans la littérature examinée. Certaines structures nerveuses (noyau lenticulaire, épiphyse, claustrum, commissure blanche antérieure et commissure habénulaire), ainsi que la stratification du *subpallium*, ont été

révélées par micro-IRM à des âges gestationnels inférieurs à ceux rapportés dans la littérature examinée.

La micro-IRM est particulièrement adaptée aux examens morphologiques de petits échantillons anatomiques en raison de son exceptionnelle résolution spatiale. Dans cette étude, nous avons utilisé le protocole T₁-wi (séquence d'écho de gradient pondérée en T₁), qui est le mieux adapté pour mettre en évidence les différences de densité cellulaire entre les différentes zones du cerveau [8]. La technique T₂-wi (séquence ultrarapide de spin-écho pondérée en T₂) montre en particulier les contours et les caractéristiques de surface des structures examinées.

Les recherches de micro-IRM *in vitro* ont plusieurs avantages : la possibilité d'utiliser des champs magnétiques de haute intensité, l'absence de mouvement, la possibilité de réduire la taille des images, la réduction de l'épaisseur des sections [9]. Cependant, l'acquisition et l'interprétation des images peuvent être affectées par la qualité anatomique des sujets. Pour prévenir l'autolyse tissulaire, il est recommandé que les sujets soient placés dans une solution de formol à 9 % dès que possible après la collecte et conservé à 4°C pendant 48 heures avant l'examen par micro-IRM.

La résolution spatiale et le contraste tissulaire de la micro-IRM avec une intensité de champ magnétique de 11.7 Tesla sont supérieurs à ceux obtenus en milieu clinique. Ainsi, la micro-IRM peut fournir des informations concernant la structure du cerveau (par exemple, la visualisation des noyaux basaux) ainsi que l'ultrastructure de certaines régions du cerveau, telles que la paroi cérébrale [10, 11]. Cette résolution spatiale qui tombe en dessous de 100 µm/voxel est le résultat de l'absence de mouvement (ce qui empêche l'apparition des artefacts), de l'utilisation d'un champ magnétique de haute intensité et de la période prolongée d'acquisition d'images [3]. Dans cette étude, des résolutions spatiales extraordinaires de 24 µm/voxel ont été atteintes, permettant de visualiser les caractéristiques structurales du cerveau. De plus, la micro-IRM est une technique reproductible, et il est possible de générer plusieurs sections du volume 3D développés à tout moment pour mieux comprendre la disposition spatiale des caractéristiques anatomiques. Bien que la micro-IRM ne soit pas aussi précise que les préparations histologiques, grâce aux méthodes de reconstruction 3D elle peut offrir des images des structures du cerveau en développement [12]. La micro-IRM a un avantage par rapport à d'autres techniques d'imagerie, telles que la tomographie, en raison de son contraste tissulaire élevé, qui permet une distinction précise des tissus [11]. Cette technique d'imagerie est non invasive et préserve l'intégrité des échantillons étudiés, les rendant disponibles pour des recherches ultérieures.

Le temps nécessaire pour l'acquisition d'images est un inconvénient majeur de la micro-IRM. La période d'acquisition pour un seul embryon ou fœtus était d'environ 24 heures dans notre étude, ce qui est cohérent avec les résultats des chercheurs précédents [2]. Un autre obstacle est le coût élevé des tests de micro-IRM, ce qui rend cette technique inaccessible au grand public.

Avoir examiné un petit nombre de sujets est une limitation de notre étude. Il est difficile d'obtenir un nombre substantiel d'embryons humains dans notre milieu. D'autre part, les éventuelles asymétries ou dysmorphies des cerveaux des sujets testés n'ont pas été prises en compte.

Nous n'avons aucune information concernant d'éventuels défauts ou syndromes génétiques qui auraient pu affecter les sujets étudiés. Dans ces circonstances, il est difficile de prédire si un composant anatomique particulier décrit à un stade de développement produirait un organe normal ou malformé. Bien que la morphologie extérieure des embryons et des fœtus ait été examinée avant leur inclusion dans l'étude, nous ne pouvons pas

affirmer avec certitude que les caractéristiques rapportées sont "normales". En considérant les parallèles entre les caractéristiques morphologiques des sujets que nous avons décrits et celles présentées dans des études précédentes [13], cela ne peut être qu'une supposition.

CONCLUSIONS

Pour une évaluation complète du cerveau en développement, des études d'embryologie sont encore nécessaires. Celles-ci peuvent aider à comprendre le développement normal et anormal du système nerveux central.

La micro-IRM offre une alternative aux procédures histologiques conventionnelles pour les embryologistes. Elle est faisable pour les études de morphologie embryonnaire et fœtale car elle fournit des images de haute qualité avec une grande résolution spatiale et un bon contraste tissulaire. De plus, la méthode est reproductible et ne compromet pas l'intégrité des spécimens, qui peuvent être utilisés dans des recherches futures. Avec cette méthode, il est possible de générer des images 3D des structures nerveuses, ce qui est un avantage par rapport aux techniques conventionnelles.

Les résultats de cette étude complètent les connaissances acquises par les approches traditionnelles en embryologie, anatomie et histologie. Ils peuvent être utilisés comme référence pour comprendre la morphogenèse cérébrale. De plus, ces images peuvent servir de références pour les futures études d'imagerie *in vivo* du cerveau en développement.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par :

- le Ministère de la Recherche, de l'Innovation et de la Digitalisation, en tant qu'Organisme Intermédiaire pour le Programme Opérationnel Compétitivité 2014-2020 (code de projet SMIS 2014+ 127725, contrat n° 352/390028/23.09.2021, acronyme du projet INSPIRE) ;
- le Ministère des Investissements et des Projets Européens (MIPE)

en tant qu'Autorité de Gestion pour le Programme de Croissance Intelligente, de Numérisation et d'Instruments Financiers 2021 - 2027 et le Ministère de la Recherche, de l'Innovation et de la Numérisation (MCID) en tant qu'Organisme de Recherche Intermédiaire (code de projet SMIS 2021+ 324771, contrat MIPE n° G-2024-71962/23.10.2024 et contrat MCID n° 390005/23.10.2024, acronyme du projet INSPIRE-II).

RÉFÉRENCES

- [1] Smith BR, Linney E, Huff DS, Johnson GA. Magnetic resonance microscopy of embryos. *Comput Med Imaging Graph.* 1996;20:483-490.
- [2] Lhuire M, Martinez A, Kaplan H, Nuzillard JM, Renard Y, Tonnelet R, et al. Human developmental anatomy: Microscopic magnetic resonance imaging (μ MRI) of four human embryos (from Carnegie Stage 10 to 20). *Ann Anat.* 2014;196: 402-409.
- [3] Lhuire M, Tonnelet R, Renard Y, et al. Developmental anatomy of the liver from computerized three-dimensional reconstructions of four human embryos (from Carnegie stage 14 to 23). *Ann Anat.* 2015;200:105-13.
- [4] O'Rahilly R, Müller F. Significant features in the early prenatal development of the human brain. *Ann Anat.* 2008;190:105-118.
- [5] Bayer SA, Altman J. The human brain during the early first trimester. Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA. 2008.
- [6] Shirai T, Terada Y, Kose K, Yamada S. Histological Properties of a Chemically Fixed Human Embryo Visualized with Quantitative Susceptibility Mapping. *Magn Reson Med Sci.* 2024 Feb 27. doi: 10.2463/mrms.tn.2023-0149.
- [7] Kunieda K, Makiyama K, Yamada S, Yamaguchi M, Nakamura T, Terada Y. Brain Structures in a Human Embryo Imaged with MR Microscopy. *Magn Reson Med Sci.* 2024 Feb 16. doi: 10.2463/mrms.mp.2023-0110.
- [8] Badea A, Johnson GA. Magnetic resonance microscopy. *Stud Health Technol Inform.* 2013;185:153-184.
- [9] Yamada S, Takakuwa T. The human embryo. InTech, Rijeka, Croatia, 2012:3-20.
- [10] Matsuda Y, Ono S, Otake Y, et al. Imaging of a Large Collection of Human Embryo Using a Super-Parallel MR Microscope. *Magn Reson Med Sci.* 2007;6(3):139-146.
- [11] Otake Y, Handa S, Kose K, Shiota K, Yamada S, Uwabe C. Magnetic resonance microscopy of chemically fixed human embryos at high spatial resolution. *Magn Reson Med Sci.* 2015. doi:10.2463/mrms/2014-0034.
- [12] Shiota K, Yamada S, Nakatsu-Komatsu T, Uwabe C, Kose K, Matsuda Y, et al. Visualization of human prenatal development by magnetic resonance imaging (MRI). *Am J Med Genet. Part A.* 2007;143A:3121-3126.
- [13] Yamada S. Kyoto Collection in The Anatomical Record. *Anat Rec (Hoboken).* 2023 Jul 12. doi: 10.1002/ar.25286.