



HAL
open science

IRM du manganèse (MEMRI) : couplage à l'imagerie chimique par microsonde synchrotron pour optimiser l'imagerie fonctionnelle du transport neuronal

Alexia Daoust

► **To cite this version:**

Alexia Daoust. IRM du manganèse (MEMRI) : couplage à l'imagerie chimique par microsonde synchrotron pour optimiser l'imagerie fonctionnelle du transport neuronal. Autre [cond-mat.other]. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENY051 . tel-00770158

HAL Id: tel-00770158

<https://theses.hal.science/tel-00770158>

Submitted on 4 Jan 2013

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique pour les sciences du vivant**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Alexia DAOUST

Thèse dirigée par **Emmanuel BARBIER** et **Sylvain BOHIC**

préparée au sein du **Grenoble – Institut des Neurosciences**
dans l'**École Doctorale de Physique**

IRM du manganèse (MEMRI) : couplage à l'imagerie chimique par microsonde synchrotron pour optimiser l'imagerie fonctionnelle du transport neuronal

Thèse soutenue publiquement le **13 Novembre 2012**,
devant le jury composé de :

M. Jean Marie BONNY

Chargé de recherche

INRA Clermont-Ferrand

Rapporteur

M. Richard ORTEGA

Directeur de recherche

Université Bordeaux

Rapporteur

M. Jean François LE BAS

Professeur

Université de grenoble

Examineur

M. Marc DHENAIN

Directeur de recherche

MIRcen

Examineur

M. Emmanuel BARBIER

Directeur de recherche

Université de Grenoble

Examineur

M. Sylvain BOHIC

Chargé de recherche

Université de Grenoble

Examineur



Table des matières

TABLE DES MATIERES	i
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	vii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xiii
ETHIQUE EN EXPERIMENTATION ANIMALE	xv
RESUME DE THESE	xvii
CHAPITRE 1 - DU MANGANESE A L'IMAGERIE IRM	1
1.1. LE MANGANESE, SOURCES D'EXPOSITION ET ROLE BIOLOGIQUE	2
1.1.1. PRESENCE DU MN DANS L'ENVIRONNEMENT	2
1.1.1.1 EAU DE BOISSON	2
1.1.1.2 ALIMENTATION	3
1.1.1.3 INHALATION	3
1.1.1.4 UTILISATION DU MN DANS L'INDUSTRIE	4
1.1.2. ROLE BIOLOGIQUE	6
1.1.2.5 ENTREE DU MN DANS L'ORGANISME	6
1.1.2.6 DISTRIBUTION DU MN DANS L'ORGANISME	6
1.1.2.7 EXCRETION DU MN	6
1.1.2.8 ROLE PHYSIOLOGIQUE DU MN	7
1.1.2.9 ROLES CELLULAIRES	8
1.2. TOXICITE DU MN	9
1.2.1. LES PROTEINOPATHIES	9
1.2.2. MANGANISME	10
1.2.3. TOXICITE SUR LES ORGANES AUTRE QUE LE CERVEAU	13
1.3. HOMEOSTASIE DU MN ET CELLULES NERVEUSES	14
1.3.1. ENTREE DU MN DANS LE CERVEAU	14
1.3.1.1 BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE	16
1.3.1.2 BARRIERE SANG-LCR	18
1.3.2. ENTREE ET TRANSPORT DU MN DANS LA CELLULE	20
1.3.3. MECANISMES DE NEUROTOXICITE DU MN	23
1.3.3.1 ETUDE CELLULAIRE : MN A FAIBLES DOSES	23
1.3.3.2 ETUDE CELLULAIRE : MN A FORTES DOSES	24
1.4. LA MEMRI ET SES APPLICATIONS	26
1.4.1. PROPRIETES PHYSIQUES DU MN	26
1.4.1.1 HISTOIRE	26
1.4.1.2 COMPARAISON AVEC D'AUTRES AGENTS DE CONTRASTE	27
1.4.2. UTILISATION EN CLINIQUE	27
1.4.3. IRM DU MANGANESE (MEMRI)	28
1.4.4. IMAGERIE DE LA CYTOARCHITECTURE CEREBRALE	28
1.4.4.3 IMAGERIE FONCTIONNELLE	29
1.4.4.4 TRAÇAGES DE RESEAUX NEURONAUX	32
CHAPITRE 2 - OBJECTIFS	35
CHAPITRE 3 - DISTRIBUTION DU MN DANS L'HIPPOCAMPE	39
3.1. INTRODUCTION	40
3.1.1. VISUALISATION DU MN	40

3.1.2.	HIPPOCAMPE	44
3.2.	MATERIELS ET METHODES	47
3.2.1.	ANIMAUX	47
3.2.2.	PREPARATION DU $MnCl_2$	47
3.2.3.	CHIRURGIE ET INJECTION DU TRACEUR	47
3.2.4.	IRM <i>IN VIVO</i>	49
3.2.5.	ANALYSE DES DONNEES IRM	49
3.2.6.	HISTOLOGIE ET IMAGERIE SYNCHROTRON	50
3.2.7.	IMAGERIE PAR FLUORESCENCE X AU SYNCHROTRON	50
3.2.8.	ANALYSES HISTOLOGIQUES	52
3.2.9.	ANALYSES STATISTIQUES	52
3.3.	RESULTATS	54
3.3.1.	DISTRIBUTION DU MN DANS L'HIPPOCAMPE DE RAT APRES IMAGERIE MEMRI	54
3.3.2.	CONCENTRATIONS DE MN DANS L'HIPPOCAMPE DETERMINEES PAR SYNCHROTRON ET IRM	56
3.3.3.	DISTRIBUTION ET CONCENTRATION DU ZN, DU CA ET DU FE	57
3.4.	DISCUSSION	60
3.4.1.	CONCENTRATIONS DE MN DANS L'HIPPOCAMPE DETERMINEES PAR SYNCHROTRON ET IRM	60
3.4.2.	DISTRIBUTION DU MN DANS L'HIPPOCAMPE DE RAT PAR IMAGERIE MEMRI ET SYNCHROTRON	62
3.4.3.	COMPARAISON DES DEUX TECHNIQUES	63
3.4.4.	IMPACT DU MN SUR L'HOMEOSTASIE DU CA, FE ET ZN DANS L'HIPPOCAMPE DE RAT ETUDIE PAR IMAGERIE SYNCHROTRON	64
CHAPITRE 4 - ACCUMULATION DU MANGANESE DANS LES NEURONES ET SON IMPACT SUR LA CAPACITE DE RETENTION CALCIQUE MITOCHONDRIALE		67
4.1.	INTRODUCTION	68
4.1.1.	MANGANESE ET MITOCHONDRIE	68
4.1.1.1.	CHAINE RESPIRATOIRE	68
4.1.1.2.	PORE DE TRANSITION DE PERMEABILITE MITOCHONDRIALE	69
4.1.2.	MANGANESE ET CYTOPLASME / NOYAU	70
4.1.3.	LOCALISATION DU MANGANESE DANS L'APPAREIL DE GOLGI	71
4.1.4.	MANGANESE ET ADN / MICROTUBULES	71
4.1.5.	OBJECTIFS DE L'ETUDE	71
4.2.	MATERIELS ET METHODES	73
4.2.1.	MISE EN CULTURE DES LIGNEES CELLULAIRES N2A ET PC12	73
4.2.1.1.	LIGNEE CELLULAIRE PC12	73
4.2.1.2.	LIGNEE CELLULAIRE N2A	74
4.2.1.3.	MILIEU DE CULTURE ET MISE EN DIFFERENTIATION	74
4.2.1.4.	CONDITIONS DE CULTURE	76
4.2.1.5.	ENTRETIEN CELLULAIRE	76
4.2.2.	CULTURE PRIMAIRE DE NEURONES HIPPOCAMPIQUES (NH)	77
4.2.2.1.	MISE EN CULTURE	77
4.2.2.2.	DEVELOPPEMENT NEURONAL	77
4.2.3.	PREPARATION DU $MnCl_2$	77
4.2.4.	TEST DE VIABILITE CELLULAIRE	77
4.2.5.	CONCENTRATION EN MN DANS LES CELLULES N2A	79
4.2.5.1.	IRM <i>IN VITRO</i>	79
4.2.5.2.	CALCUL DE LA RELAXIVITE R1 DU MANGANESE	79
4.2.5.3.	ANALYSE DES DONNEES IRM OBTENUES SUR LES CELLULES N2A	80

4.2.6.	IMAGERIE SYNCHROTRON DES N2A ET NH	81
4.2.6.1	PREPARATION DES ECHANTILLONS	81
4.2.6.2	ANALYSE SYNCHROTRON	81
4.2.7.	IMPACT DU MN SUR LES EXTENSIONS NEURONALES ET LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE DES NH	82
4.2.7.1	MARQUAGE IMMUNOFLUORESCENT DE L'ACTINE ET DE LA TUBULINE	83
4.2.7.2	OBSERVATION DES LAMES	83
4.2.7.3	IMPACT DU MANGANESE SUR LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE	84
4.2.8.	IMPACT DU MN SUR LA CAPACITE DE RETENTION CALCIQUE MITOCHONDRIALE	85
4.2.8.1	MESURE DE LA CAPACITE DE RETENTION CALCIQUE (CRC) MITOCHONDRIALE	85
4.2.8.2	MITOCHONDRIES ISSUES DES LIGNEES CELLULAIRES PC12 ET N2A	86
4.2.8.3	MITOCHONDRIES ISOLEES DE CERVEAU DE RAT	87
4.2.8.4	ANALYSES DES DONNEES DE LA CRC	88
4.2.9.	LOCALISATION DU MN DANS LA CELLULE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	88
4.2.10.	ANALYSES STATISTIQUES	89
4.3.	RESULTATS	90
4.3.1.	VIABILITE CELLULAIRE DES PC12, N2A ET NH	90
4.3.2.	CONCENTRATION DU MN DANS LES CELLULES N2A	90
4.3.3.	IMAGERIE SYNCHROTRON DES N2A ET NH	91
4.3.4.	IMPACT DU MN SUR LES EXTENSIONS NEURONALES ET LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE DES NH	95
4.3.5.	IMPACT DU MN SUR LA CAPACITE DE RETENTION CALCIQUE DES MPC12, MN2A ET MCR	98
4.3.6.	LOCALISATION DU MN PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	101
4.4.	DISCUSSION	103
CHAPITRE 5 - IMPACT DU MN SUR LE METABOLISME HIPPOCAMPIQUE, ANALYSES PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE HAUTE RESOLUTION A ANGLE MAGIQUE (RMN-HRMAS)		111
5.1.	INTRODUCTION	112
5.1.1.	RMN HRMAS DU PROTON	113
5.1.1.1	PRINCIPE	113
5.1.1.2	APPLICATIONS	114
5.1.2.	ANALYSE DES DONNEES RMN-HRMAS	115
5.1.3.	METABOLITES OBSERVABLES EN RMN HRMAS	116
5.2.	MATERIELS ET METHODES	122
5.2.1.	ANIMAUX ET GROUPES	122
5.2.2.	PREPARATION DU MNCL ₂	122
5.2.3.	CHIRURGIE ET INJECTION DU TRACEUR PAR VOIE INTRACEREBRALE	122
5.2.4.	IRM <i>IN VIVO</i>	122
5.2.5.	PRELEVEMENT DES HIPPOCAMPES	122
5.2.6.	ANALYSES <i>EX VIVO</i> PAR RMN HRMAS DU PROTON	124
5.2.6.1	ACQUISITION DES SPECTRES	124
5.2.6.2	COURBE DE CALIBRATION	125
5.2.7.	ANALYSES EN RMN DU LIQUIDE <i>IN VITRO</i>	125
5.2.8.	ANALYSE DES DONNEES IRM	126
5.2.9.	STATISTIQUES	126
5.3.	RESULTATS	127
5.3.1.	DISTRIBUTION DU MN DANS L'HIPPOCAMPE DE RAT APRES MEMRI	127
5.3.2.	EFFET DU MN SUR LES SPECTRES HRMAS DE L'HIPPOCAMPE	127

5.3.2.1	EFFET DU MN SUR LES SIGNAUX RMN _____	127
5.3.2.2	QUANTIFICATION DU MN GRACE A L'ELARGISSEMENT DE LA RAIE DU LACTATE ¹²⁹	
5.3.2.3	EVOLUTION DU SIGNAL IRM LE LONG DE L'HIPPOCAMPE _____	133
5.3.3.	IMPACT DU MN SUR LE METABOLISME HIPPOCAMPIQUE _____	133
5.4.	DISCUSSION _____	138
5.4.1.	DETECTION DU MN DANS LES BIOPSIES _____	138
5.4.1.1	CHELATION DU MN PAR LES ACIDES _____	138
5.4.1.2	DETERMINATION DE LA CONCENTRATION DU MN _____	139
5.4.2.	IMPACT DU MN SUR LE METABOLISME _____	140
CHAPITRE 6 - EVALUATION DE LA CONNECTIVITE FONCTIONNELLE PAR MEMRI CHEZ UN MODELE DE SOURIS DEFICIENTE POUR MAP6 _____		145
6.1.	INTRODUCTION _____	146
6.1.1.	LES MICROTUBULES : _____	146
6.1.2.	DESCRIPTION DES SOURIS KO MAP-6 (KO STOP) _____	148
6.1.2.1	COMPORTEMENT _____	148
6.1.2.2	NEUROTRANSMISSION _____	148
6.1.2.3	ANATOMIE _____	150
6.2.	ETUDE I : ETUDE DE LA CONNECTIVITE FONCTIONNELLE DES VOIES OLFACTIVES CHEZ LA SOURIS KO MAP6 _____	152
6.2.1.	INTRODUCTION _____	152
6.2.2.	MATERIELS ET METHODES _____	154
6.2.2.1	ANIMAUX _____	154
6.2.2.2	PREPARATION DU MNCL ₂ _____	154
6.2.2.3	INJECTION DU MN _____	154
6.2.2.4	IRM <i>IN VIVO</i> _____	154
6.2.2.5	ANALYSE DES DONNEES IRM _____	155
6.2.2.6	ANALYSES STATISTIQUES _____	156
6.2.3.	RESULTATS _____	157
6.2.3.1	EVOLUTION DU SIGNAL AU COURS DU TEMPS _____	157
6.2.3.2	INTENSITE DU SIGNAL AU COURT DU TEMPS _____	158
6.3.	ETUDE II : ETUDE DE LA CONNECTIVITE FONCTIONNELLE DU TRACT THALAMO-CORTICAL CHEZ LES SOURIS KO STOP _____	161
6.3.1.	INTRODUCTION _____	161
6.3.2.	MATERIELS ET METHODES _____	163
6.3.2.1	ANIMAUX _____	163
6.3.2.2	PREPARATION DU MNCL ₂ _____	163
6.3.2.3	INJECTION DU MN _____	164
6.3.2.4	IRM <i>IN VIVO</i> _____	166
6.3.2.5	ANALYSE DES DONNEES IRM _____	166
6.3.2.6	TRAÇAGE DU TRACT THALAMO-CORTICAL PAR INJECTION CEREBRALE DE LENTIVIRUS _____	167
6.3.2.7	EUTHANASIE ET PREPARATION DES CERVEAUX _____	168
6.3.2.8	TRAÇAGE DU TRACT THALAMO-CORTICAL PAR INJECTION DE DII _____	168
6.3.2.9	IMMUNO-MARQUAGE DE LA GFP _____	168
6.3.2.10	HISTOLOGIE _____	169
6.3.2.11	ANALYSES HISTOLOGIQUE DES TRACTS MYELINISES _____	170
6.3.2.12	ANALYSES STATISTIQUES _____	170
6.3.3.	RESULTATS _____	171
6.3.3.1	TAILLE DES TRACTS CHEZ LA SOURIS KO MAP6 MIS EN EVIDENCE PAR MARQUAGE MYELINIQUE (GOLD) _____	171
6.3.3.2	TRAÇAGE DU TRACT THALAMO-CORTICAL PAR MEMRI _____	172

6.3.3.3	EVOLUTION DU RSI AU COURS DU TEMPS _____	173
6.3.3.4	TRAÇAGE DU TRACT THALAMO-CORTICAL PAR DII _____	176
6.3.3.5	TRAÇAGE DU TRACT THALAMO-CORTICAL PAR INJECTION DE LENTIVIRUS _____	178
6.4.	DISCUSSION _____	180
6.4.1.	LIMITES METHODOLOGIQUES _____	180
6.4.2.	CONNECTIVITE FONCTIONNELLE DES SOURIS KO MAP6 _____	181
6.4.3.	PERSPECTIVES _____	185
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES _____	187
	REFERENCES _____	189
	DOCUMENTS ANNEXES _____	209
	PRINCIPE DE L'IRM _____	211
	PRINCIPE DE L'IMAGERIE ELEMENTAIRE PAR FLUORESCENCE X EXCITEE PAR LE RAYONNEMENT SYNCHROTRON _____	213
	TRAVAUX ANNEXES REALISES _____	220
	LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS _____	223
	CURRICULUM VITAE _____	225

Liste des principales abréviations

Ac :	anticorps
AP :	antéro-postérieur
AuD :	cortex auditif secondaire
Bg :	bruit de fond (background)
BHE :	barrière hémato-encéphalique
BO :	bulbe olfactif
CA (1/2/3) :	corne d'Ammon
cc :	corps calleux
CG :	cellules glomérulaire
ci :	capsule interne
CPu :	caudate putamen
CRC :	capacité de rétention calcique
Cx :	cortex
DL50 :	dose létale 50%
DMT1 :	transporteur de métaux divalents (divalent metal transporter 1)
DRO :	dérivé réactif oxygéné (reactive oxygen species)
DV :	dorso-ventral
ESRF :	rayonnement synchrotron européen (european synchrotron radiation facility)
FH :	fissure hippocampique
FOV :	champs de vue (field of view)
GD/DG :	gyrus denté (dentate gyrus)
HD :	hippocampe dorsal
HI :	hippocampe intermédiaire
HRMAS :	haute resolution par rotation à l'angle magique (high resolution magic angle spinning)
HV :	hippocampe ventral
IC :	intra cérébrale
ICP-MS :	spectrométrie de masse à plasma inductif (inductively coupled plasma mass spectrometry)
IP :	intra péritonéale
IRM :	imagerie par résonance magnétique
IV :	intra veineux
KO :	invalidation génique (knockout)
LCR :	liquide céphalo-rachidien
MAP :	protéine associée aux microtubules (microtubule associated protein)
mCR :	mitochondries de cerveau de rat

MEMRI :	imagerie par résonance magnétique du manganèse (manganese enhanced magnetic resonance imaging)
ML:	médio-latéral
MMT :	méthylcyclopentadiényl manganèse tricarbonyl
mN2A :	mitochondries de cellules N2A
mPC12 :	mitochondries de cellules PC12
mPTP :	pore de perméabilité mitochondriale (mitochondriale permeability transition pore)
NGF :	facteur de croissance (nerve growth factor)
NH :	neurones hippocampiques
NT :	neurotransmetteur
PC :	plexus choroïdes
pc :	pédoncule cérébrale
Po :	noyau thalamique postérieur
PtA :	cortex des associations pariétales
RMN :	résonance magnétique nucléaire
RSI :	intensité du signal relative (relative signal intensity)
S1fl :	cortex somatosensoriel S1 forelimb
S2 :	cortex somatosensoriel secondaire
SNC:	système nerveux central
SNR:	signal sur bruit (signal to noise ratio)
SOD :	superoxyde dismutase
SR-XRF :	imagerie synchrotron basée sur la fluorescence des rayons X (synchrotron-based X-ray fluorescence)
T1 :	constante de relaxation longitudinale
T2 :	constante de relaxation transversale
TE :	temps d'écho
Tf :	transferrine
TfR :	récepteur de la transferrine
TH :	thalamus
THant :	thalamus antérieur
THpost :	thalamus postérieur
TR :	temps de répétition
TSP :	sodium 3-triméthylsilyl propionate
VPL :	noyau thalamique postéro-latéral ventral
VPM :	noyau thalamique postéro-médial ventral
WT :	sauvage (wild type)
ZIP :	protéine de transport du zinc (zinc transporter protein)

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1 : Photo du manganèse sous forme minérale extrait d'un minerai.	1
Figure 2 : Structures cérébrales rehaussées dans le manganisme.....	12
Figure 3 : Efflux du Mn dans le cerveau de singe	13
Figure 4 : Evolution au cours du temps de la distribution cérébrale du Mn.....	15
Figure 5 : Jonctions serrées entre deux cellules endothéliales de la BHE.	17
Figure 6 : Transport du Mn dans le tissu cérébral.	18
Figure 7 : Illustration des deux barrières cérébrales.	20
Figure 8 : Schéma récapitulatif de l'entrée du Mn (billes bleues) dans une cellule cérébrale, ici un neurone, mitochondries en jaune (voir pour revue Pautler, 2004).	22
Figure 9 : Formation d'un radical hydroxyle (OH·).	24
Figure 10 : IRM (1,5T) pondérée T1 chez des travailleurs exposés au Mn.	26
Figure 11 : Images IRM pondérées T1, après une injection systémique de MnCl ₂	29
Figure 12 : Effet de la stimulation au glutamate sur le contraste T1 après injection de MnCl ₂ (IRM 4,7T).	30
Figure 13 : MEMRI fonctionnelle : mise en évidence des structures jouant un rôle dans le chant chez l'oiseau.....	31
Figure 14 : Détection d'un seul glomérule, confirmé par les souris Tg r17→M71.	31
Figure 15 : Traçage de la voie visuelle par injection intra-orbitale de MnCl ₂	32
Figure 16 : Image d'autoradiographie du ⁵⁴ MnCl ₂ inhalé.....	41
Figure 17 : Distribution du Fe dans le cerveau de souris par LA-ICP-MS.....	43

Chapitre 3

Figure 18 : Anatomie de l'hippocampe.....	45
Figure 19 : Schéma du réseau hippocampique (coupe coronale, hippocampe gauche de cerveau de rongeur).	46
Figure 20 : Localisation de l'injection intra-cérébrale de Mn.....	48
Figure 21 : Régions d'intérêt en imagerie synchrotron.	51
Figure 22 : Images MEMRI de rat.....	54
Figure 23 : Contrastes MEMRI dans l'hippocampe de rat pour les groupes contrôles, IP et IC.	55
Figure 24 : Composition cellulaire de l'hippocampe	56
Figure 25 : Cartes de la distribution de métaux dans l'hippocampe obtenues par imagerie synchrotron.	57
Figure 26 : SNR (MEMRI) en fonction de la concentration de Mn déterminée par imagerie synchrotron (SR-XRF).....	61

Chapitre 4

Figure 27 : Gonflement mitochondrial après ajout de calcium (microscopie électronique).	69
Figure 28 : Schéma récapitulatif de la méthodologie utilisée pour l'étude de l'impact du Mn sur les cellules N2A et PC12, sur les NH et sur les mitochondries.	73
Figure 29 : Protocole de quantification de la concentration de Mn par IRM sur des cellules N2A.....	79
Figure 30 : Calcul de la relaxivité r1.....	80

Figure 31 : Schéma résumant le protocole de préparation des échantillons cellulaires N2A et HN pour les analyses synchrotron.....	82
Figure 32 : Exemple de l'ouverture du mPTP (cellules N2A).....	85
Figure 33 : Test de viabilité des cellules N2A, PC12 et des NH exposées à différentes concentrations de Mn.....	90
Figure 34 : Concentration de Mn dans les cellules N2A déterminée par IRM.....	91
Figure 35 : Cartes de la distribution de métaux dans les NH obtenues par imagerie synchrotron.	92
Figure 36 : Cartes de la distribution de métaux dans les N2A obtenues par imagerie synchrotron.	93
Figure 37 : Impact du Mn sur la morphologie des NH.	95
Figure 38 : Impact du Mn sur le nombre et la dynamique mitochondriale.	97
Figure 39 : Capacité de rétention calcique (CRC) mitochondriale sur des cellules PC12, en présence et en absence de MnCl ₂	98
Figure 40 : Capacité de rétention calcique (CRC) mitochondriale à partir des cellules N2A, en présence et en absence de MnCl ₂	99
Figure 41 : Capacité de rétention calcique (CRC) mitochondriale à partir de tissu cérébral de rat, en présence et en absence de MnCl ₂	101
Figure 42 : Microscopie électronique des cellules N2A.	102
Figure 43 : Schéma récapitulatif des effets d'un excès de Mn sur la physiologie cellulaire... 108	

Chapitre 5

Figure 44 : Base de données simulée des signaux des métabolites (NMRSOPE).....	116
Figure 45 : Exemple de spectre expérimental quantifié après adaptation de la base à l'élargissement du NAA, glutamate et lactate.....	118
Figure 46 : Schéma du métabolisme énergétique.	119
Figure 47 : Cycle du glutamine-glutamate dans le cerveau complété avec les navettes alanine-lactate (A) et leucine- kétoisocaproate (B) entre les neurones et les astrocytes.	120
Figure 48 : Séparation des trois parties de l'hippocampe pour les analyses RMN-HRMAS.123	
Figure 49 : Schéma de la procédure chirurgicale pour la dissection rapide des hippocampes gauches et droits du cerveau de rat (Navarro et al., 2008).	123
Figure 50 : Photo des éléments composant le rotor.....	124
Figure 51 : Métabolites étudiés pour la réalisation de la courbe de calibration.....	126
Figure 52 : MEMRI 24h après l'injection de MnCl ₂ par voie intra-cérébrale dans l'hippocampe droit de rat.....	127
Figure 53 : Effet élargissant du manganèse.	128
Figure 54 : Largeur de la raie du lactate en fonction de la concentration du Mn dans une solution aqueuse.....	129
Figure 56 : Largeur de la raie du lactate en fonction de la concentration du Mn dans une biopsie contrôle.....	130
Figure 56 : Largeur de la raie du lactate et du myo-inositol en fonction de la concentration du Mn dans une solution d'eau.....	131
Figure 57 : Largeur des pics CH ₂ du glutamate en fonction de la concentration du Mn dans une solution d'eau.	132
Figure 58 : signal sur bruit (SNR) des 3 sous-parties hippocampiques ipsilatérales (droite) et controlatérales (gauche) à l'injection de MnCl ₂	133
Figure 59 : Impact du Mn sur l'hippocampe droit de rat après injection de MnCl ₂	135
Figure 60 : Impact du Mn sur l'hippocampe gauche de rat après injection de MnCl ₂	136

Figure 61 : Evolution de la quantité des métabolites le long de l'hippocampe (amplitudes en % des témoins, sans unité)	137
--	-----

Chapitre 6

Figure 62 : Microtubules	146
Figure 63 : L'extinction du gène codant pour la protéine MAP6 supprime la stabilité des microtubules.....	147
Figure 64 : Volumes cérébral et ventriculaire obtenus par IRM chez 3 fonds génétiques de souris KO MAP6 et WT.....	151
Figure 65 : Schéma du transport du Mn dans la voie olfactive suite à une injection dans la cavité nasale (d'après Cross et al., 2008).....	153
Figure 66 : Régions d'intérêts tracées manuellement sur les images IRM pondérées T ₁ après injection de MnCl ₂ par voie intra-nasale.....	155
Figure 67 : Evolution de l'intensité du signal en fonction du temps dans le cortex piriforme et le BO.....	158
Figure 68 : Intensité du signal (RSI) maximum et temps correspondant.....	159
Figure 69 : Suivi longitudinal du tract BO / cortex piriforme par MEMRI chez une souris WT.....	159
Figure 70 : Voies de projection du cortex somato-sensoriel S1.....	162
Figure 71 : Schéma récapitulatif de la méthodologie utilisée pour l'étude du tract thalamo-cortical chez les souris KO MAP6.....	163
Figure 72 : Injection de MnCl ₂ dans le cortex somato-sensoriel S1fl.....	165
Figure 73 : Régions d'intérêt (ROI) tracées manuellement sur les images IRM pondérées T ₁ après injection de MnCl ₂ par voie intra-cérébrale.....	167
Figure 74 : Quantification de la surface des tracts des souris KO MAP6 par marquage Gold.....	171
Figure 75 : Evolution du signal au cours du temps après injection de MnCl ₂ dans le cortex S1fl chez une souris WT.....	173
Figure 76 : Intensité du signal relatif (RSI %) en fonction du temps dans la structure b après injection de MnCl ₂ dans le cortex S1 chez les souris WT et KO MAP6.....	174
Figure 77 : Intensité du signal relatif (RSI %) en fonction du temps dans la structure c après injection de MnCl ₂ dans le cortex S1 chez les souris WT et KO MAP6.....	175
Figure 78 : Intensité du signal relatif (RSI %) 24h après injection de MnCl ₂ dans le cortex S1 chez les souris WT et KO MAP6.....	176
Figure 79 : Traçage du tract thalamo-cortical par le cristal DiI chez la souris WT (2 animaux).....	177
Figure 80 : Traçage du tract thalamo-cortical après injection de lentivirus exprimant la GFP dans le cortex S1fl (visible).....	179
Figure 81 : Résumé de l'étude de la voie corticale par MEMRI, DiI et lentivirus.....	183
Figure 82 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus.....	188

Annexes

Figure 83 : Schéma de mesure du signal RMN.....	211
Figure 85 : Dessin du dispositif expérimental d'une ligne de lumière sur un anneau synchrotron.....	214
Figure 86 : Schéma de la ligne de lumière ID22 – station expérimental.....	215
Figure 87 : Dispositif expérimental de la microsonde ID22 pour les études de microfluorescence, microdiffraction et microtomographie.....	215

<i>Figure 88 : Effet photoélectrique.</i>	<i>216</i>
<i>Figure 89 : Détection des photons de fluorescence.....</i>	<i>217</i>
<i>Figure 90 : Spectre somme moyen de fluorescence X obtenu à partir d'une cartographie d'une cellule neuronale.....</i>	<i>218</i>
<i>Figure 91 : Schéma descriptif de la collection des données pour la réalisation de cartographie par fluorescence X et de spectroscopie d'absorption par rayons X.</i>	<i>219</i>

Liste des tableaux

Chapitre 1

<i>Tableau 1 : Les trois voies principales d'expositions au manganèse : normes et consommation.</i>	5
<i>Tableau 2 : Concentration des cations dans les cellules cérébrales (Tholey et al., 1988)</i>	8
<i>Tableau 3 : liste des symptômes d'une intoxication chronique au Mn</i>	11
<i>Tableau 4 : Bio-distribution cellulaire du MnCl₂ dans un modèle de BHE et de barrière sang-LCR après 48h d'incubation (Bornhorst et al., 2012).</i>	19

Chapitre 2

<i>Tableau 5 : résumé des travaux effectués pendant la thèse.</i>	36
---	----

Chapitre 3

<i>Tableau 6 : Concentrations du P, K, Ca, Fe, Cu, Zn et Mn dans la région du GD/CA3 controlatérale, obtenues par imagerie synchrotron.</i>	58
<i>Tableau 7 : Concentrations du P, K, Ca, Fe, Cu, Zn et Mn dans la FH controlatérale, obtenues par imagerie synchrotron.</i>	59

Chapitre 4

<i>Tableau 8 : Milieu de culture pour les cellules PC12</i>	74
<i>Tableau 9 : Milieu de culture pour les cellules N2A</i>	75
<i>Tableau 10 : Concentrations du P, K, Ca, Fe, Cu, Zn et Mn dans les neurones hippocampiques, obtenues par imagerie synchrotron.</i>	94
<i>Tableau 11 : Concentrations du P, K, Ca, Fe, Cu et Mn dans les cellules N2A, obtenues par imagerie synchrotron.</i>	94

Chapitre 5

<i>Tableau 12 : Distribution préférentielle des métabolites et des enzymes entre neurones et astrocytes</i>	121
---	-----

Chapitre 6

<i>Tableau 13 : Valeurs d'intensités brutes des ROI</i>	157
---	-----

Ethique en expérimentation animale

Je tiens à appuyer sur le fait que toutes les expériences effectuées sur l'animal ont été approuvées par le comité local d'éthique (Grenoble) et sont en parfait accord avec les directives de la communauté européenne (EUVD 86/609/ EEC) pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire.

Tous les efforts possibles ont été mis en place afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. De ce fait, la règle des 3R de 1959 établi par Russel et Burch a été suivie, visant à Réduire le nombre d'animaux, Remplacer si possible par des expériences cellulaire et Raffiner la méthodologie utilisée. Le 4^{ème} R à ajouter à cette règle est la Responsabilité de chacun envers l'expérimentation animale et le respect de ce même animal.

Je tiens à rappeler que l'expérimentation animale est réalisée afin d'éviter l'expérimentation sur l'homme. L'éthique est par conséquent une pensée philosophique, une réflexion théorique que la morale de chacun permet d'intégrer et de cadrer. C'est l'éthique qui régleme notre quotidien. La morale décrit et définit les principes et les contraintes qui s'imposent à toutes activités en vue de la protection de la vie et du respect des personnes.

Les objectifs de la science sont multiples, mais il ne faut pas oublier l'essentiel :

« Science sans conscience n'est que ruine de l'âme »

Rabelais, 16^{ème} siècle

Résumé de thèse

Le manganèse est un élément essentiel du corps humain. Au niveau cérébral, c'est un cofacteur important de la superoxyde-dismutase mitochondriale et d'enzymes impliquées dans la synthèse et le métabolisme de neurotransmetteurs. Les propriétés paramagnétiques du manganèse Mn^{2+} permettent son utilisation comme agent de contraste pour l'IRM (Mn-MRI ou MEMRI). Analogue du calcium (Ca^{2+}), il pénètre les neurones essentiellement par les canaux calciques voltage-dépendants de type L. Il est ensuite séquestré dans le réticulum endoplasmique et cumulé pour le transport, qui s'effectue le long des microtubules jusqu'aux synapses où il est libéré, puis capturé par les autres neurones. Ainsi, il peut rendre compte du transport axonal antérograde et rétrograde. L'approche MEMRI permet de mettre en évidence la cyto-architecture de structures cérébrales telles que le bulbe olfactif ou l'hippocampe chez le rongeur et peut apporter des informations uniques sur les altérations du transport neuronal, un élément précoce du développement de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer.

Deux problèmes limitent l'emploi de ce puissant outil d'imagerie *in vivo* :

- (i) A doses élevées, le Mn^{2+} est toxique pour l'organisme et peut provoquer une atteinte grave du système nerveux central, appelé manganisme, présentant des symptômes analogues à ceux de la maladie de Parkinson. Ces mécanismes de toxicité sont mal connus.
- (ii) Le mode de transport du manganèse dans l'approche MEMRI est mal connu.

Afin d'apporter des éléments de réponse à ces deux problèmes, nous avons entrepris une étude couplant IRM et microscopie synchrotron pour mieux comprendre le comportement du Mn^{2+} *in vivo*. Nous avons précisé la distribution cellulaire et sub-cellulaire du Mn pour un modèle de cellules de type neuronal (lignée de neuroblastome N2A), pour des cultures primaires de neurones hippocampiques, mais aussi au niveau de coupes d'hippocampe de rats ou de souris. En parallèle, nous avons étudié les effets du Mn sur le métabolisme cérébral par une technique de RMN-HRMAS du proton. Pour compléter ce travail, nous avons mis en œuvre l'imagerie MEMRI chez les souris KO MAP6 présentant un déficit d'une protéine stabilisatrice des microtubules pour évaluer la connectivité fonctionnelle du tract thalamo-cortical avant et après un traitement microtubulaire.

Chapitre 1 - Du manganèse à l'imagerie IRM

1.1. LE MANGANESE, SOURCES D'EXPOSITION ET ROLE BIOLOGIQUE	2
1.1.1. PRESENCE DU MN DANS L'ENVIRONNEMENT	2
1.1.2. ROLE BIOLOGIQUE	6
1.2. TOXICITE DU MN	9
1.2.1. LES PROTEINOPATHIES	9
1.2.2. MANGANISME	10
1.2.3. TOXICITE SUR LES ORGANES AUTRE QUE LE CERVEAU	13
1.3. HOMEOSTASIE DU MN ET CELLULES NERVEUSES	14
1.3.1. ENTREE DU MN DANS LE CERVEAU	14
1.3.2. ENTREE ET TRANSPORT DU MN DANS LA CELLULE	20
1.3.3. MECANISMES DE NEUROTOXICITE DU MN	23
1.4. LA MEMRI ET SES APPLICATIONS	26
1.4.1. PROPRIETES PHYSIQUES DU MN	26
1.4.2. UTILISATION EN CLINIQUE	27
1.4.3. IRM DU MANGANESE (MEMRI)	28
1.4.4. IMAGERIE DE LA CYTOARCHITECTURE CEREBRALE	28

Le manganèse est un élément chimique noté Mn, de masse moléculaire 54,9g/mol et avec un numéro atomique $Z=25$ (**Figure 1**). Dans la classification périodique des éléments, les métaux les plus courants ayant une masse moléculaire et un numéro atomique proche de ceux du Mn sont le Ca ($M=40,1\text{g/mol}$; $Z=20$), le Fe ($M=55,9\text{g/mol}$; $Z=26$), le Cu ($M=63,6\text{g/mol}$; $Z=29$) et le Zn ($M=65,4\text{g/mol}$; $Z=30$).



Figure 1 : Photo du manganèse sous forme minérale extrait d'un minerai.

Le métal est de couleur blanc-gris similaire au fer.

http://www.kumareducation.com/kumarminerals/index.php?option=com_content&view=article&id=71&Itemid=68

1.1. Le manganèse, sources d'exposition et rôle biologique

Le manganèse (Mn) est un élément naturel que l'on trouve dans l'air, le sol et l'eau. Le Mn est un élément nutritif essentiel pour l'homme et l'animal (U.S. EPA, 2003). En effet, le Mn est un constituant d'un grand nombre d'enzymes cellulaires (comme la superoxyde dismutase-2 ou la pyruvate carboxylase) et sert à en activer d'autres (les kinases, décarboxylases, transférases, hydrolases...) (Hurley et al., 1984; Chemicals, 2002). Les besoins physiologiques en manganèse sont facilement couverts par l'alimentation. Le risque de carence chez l'homme est ainsi quasi nul.

Dans ce paragraphe nous détaillerons dans un premier temps les sources d'exposition au Mn et dans un second temps ses rôles biologiques.

1.1.1. Présence du Mn dans l'environnement

Le Mn est l'un des métaux les plus abondants sur la surface de la terre, recouvrant environ 0,1% de la croûte terrestre. On trouve le Mn sous forme pure mais aussi associé à plus de 100 minéraux (ATSDR, 2000). L'homme peut être exposé au Mn de quatre façons : par l'eau, par l'alimentation, par l'air ou encore par contact avec des produits industriels.

1.1.1.1 Eau de boisson

Le Mn est couramment trouvé dans les eaux souterraines : l'eau de pluie corrode le manganèse sous sa forme minérale (MnO_2 présent dans la roche calcaire). La concentration de l'ion Mn^{2+} dans l'eau potable varie et les plus fortes concentrations de Mn sont trouvées dans les eaux souterraines, les plaines inondables ou les deltas. L'UE (1998) et l'OMS (1993) ont fixés respectivement les normes de la concentration de Mn dans l'eau à 0,5 et 0,05 mg/L. En prenant en compte la norme fixée par l'OMS, la prise de Mn dans l'eau est en moyenne de 0,1 mg/jour pour un adulte buvant 2L d'eau. Peu de données sont disponibles sur les risques liés à l'exposition au Mn dans l'eau de boisson. Des études ont été effectuées chez des enfants chinois exposés à 1,21 mg/L de Mn et des enfants canadiens exposés à 0,16 ou 0,61 mg/L de Mn dans l'eau de boisson. Ces études ont montré des taux de Mn plus élevés que la moyenne dans les cheveux, des diminutions de la dextérité des mains, de la mémoire à court terme, de l'identification visuelle et un comportement hyperactif par rapport à des enfants vivant dans une zone dite « contrôle » (Woolf et al., 2002). Au Bangladesh, de hautes concentrations en Mn dans l'eau de boisson (consommation entre 250 et 4370 μg /jour) ont été associées à un quotient intellectuel faible chez 142 enfants de 10 ans (Wasserman et al., 2006).

Le Mn, tout comme le Fe, peut facilement être extrait de l'eau potable. Le manganèse soluble étant sous forme divalente Mn(II), son oxydation forme du Mn(IV) solide. La technique la plus utilisée est l'ozonation qui consiste à oxyder le Mn²⁺ par l'ozone pour former un précipité MnO₂. Le coût élevé du traitement des eaux et surtout de la technique d'ozonation (la plus efficace pour l'élimination du Mn), font que l'exposition au Mn dans l'eau de boisson est plus forte dans les populations rurales des pays en voie de développement (Charlet et al., 2012).

1.1.1.2 Alimentation

Les aliments présentant les plus fortes teneurs en Mn sont les cacahuètes, les fruits et le soja. Quand le Mn est ingéré, il est considéré comme étant l'oligoélément le moins toxique chez l'adulte sain puisque seulement 3 à 10% du Mn ingéré est absorbé (Mertz, 2009). Plusieurs constituants du régime alimentaire (tanins, oxalates, phytates, fibres) inhibent l'absorption du Mn en formant des complexes insolubles dans l'intestin.

A titre d'exemple, 1% des Aborigènes habitant à Groote Eylandt en Australie, présentent des symptômes dus à un excès de Mn dans l'alimentation. Les chercheurs ont détecté des concentrations de 16 ppm dans les cheveux des Aborigènes vivant dans cette région, contre 2 ppm pour les habitants d'une ville contrôle. Le sol de cette région est très riche en Mn (40 000-50 000 µg/g) et beaucoup de fruits et légumes y poussent (Stauber and Florence, 1989).

La concentration moyenne de Mn dans le sol aux Etats-Unis est de 550 µg/g (Shacklette and Boerngen, 1984). Les plus fortes expositions au Mn se font généralement par le biais de l'alimentation. Un adulte consomme en moyenne entre 0,7 et 10,9 mg de Mn/jour. Cette concentration peut être bien plus élevée pour une alimentation végétarienne par exemple. L'apport journalier recommandé par l'Afssa est de 2 mg/jour ; la limite de consommation étant comprise entre 4,2 et 10 mg de Mn/jour.

1.1.1.3 Inhalation

En Europe, Australie et Amérique du Nord, les travailleurs et piétons inhalent le Mn émis par les véhicules à moteur. Dans ces pays, le Mn est principalement émis par les véhicules alimentés par de l'essence sans plomb. L'addition du tétraéthyl dans l'essence, utilisé pour augmenter l'indice d'octane est maintenant remplacé par du manganèse méthylcyclopentadiényl tricarbonyl (MMT). Une directive du parlement Européen (01/01/2011) limite la valeur maximale autorisée en MMT à 6 mg/L d'essence. Cependant, la combustion du fuel contenant du MMT peut libérer des

particules riches en Mn dans l'atmosphère (Lynam et al., 1999). L'exposition à des particules riches en Mn (mineurs, soudeurs, travailleurs de poudre de blanchiment...) entraîne des symptômes moteurs et de démence semblables à ceux de la maladie de Parkinson (décrits ci-après).

La réglementation en vigueur fixée par l'OMS sur la concentration de Mn dans l'air est de $0,15 \mu\text{g Mn/m}^3$. A titre d'exemple, au centre ville de Lyon, la concentration de Mn en 2007 a oscillé entre $0,004$ et $0,012 \mu\text{g Mn/m}^3$ d'air. Ces concentrations peuvent varier avec la distance à la source de Mn (pollution, industrie).

1.1.1.4 Utilisation du Mn dans l'industrie

Le Mn sous forme de pyrolusite (MnO_2), psilomélane (oxyde hydraté), haussmannite (Mn_3O_4), rhodochrochite (MnCO_3) et rhodonite (MnSiO_3) est extrait des minerais. Le Mn est souvent associé à des minerais de Fer, c'est pourquoi les minerais dits métallurgiques ont des teneurs dépassants 35 % de Mn et sont destinés à la fabrication d'alliages. Le manganèse métallique, non allié, n'a pas d'utilisation finale. Le Mn est principalement utilisé dans les manufactures de préparation d'alliages telles que l'acier qui contient jusqu'à 14% de manganèse. Le Mn a la propriété d'augmenter la résistance des alliages d'aluminium, d'acier et de fer*.

Le Mn est aussi utilisé dans les produits comme les batteries, le verre et les feux d'artifices. Comme décrit ci-dessus, le MMT a été utilisé comme composé organique pour augmenter l'indice d'octane dans l'essence sans plomb (Lynam et al., 1999). Les autres composants où l'on trouve du Mn sont l'engrais, le vernis, les fongicides, les piles mais aussi dans des compléments d'alimentation pour l'homme et le bétail (Aschner et al., 2006a). Enfin, de façon moins connue, le permanganate (MnO_4^-) est vaporisé, notamment en Chine, afin de donner un aspect délavé aux pantalons Blue-Jeans. Les eaux rejetées n'étant pas correctement traitées, d'importante quantité de Mn se retrouvent dans les eaux à proximité des usines de textiles.

Les normes et la consommation moyenne de Mn pour ces quatre voies d'expositions (décrites précédemment), sont résumées dans le **Tableau 1**.

* <http://www.societechimiquedefrance.fr/extras/Donnees/metaux/mang/texman.htm>

Chapitre 1 - Du manganèse à l'imagerie IRM - 5

	Normes	Exposition de Mn constatée	Exposition toxique de Mn (chronique)
Eau	- OMS (1993) : 0,05 mg/L - UE (1998) : 0,5 mg/L	- 0,1 mg/jour (pour un adulte consommant 2L d'eau par jour, OMS 1993)	- 1,2 mg/L (Woolf et al., 2002) - 0,2 à 0,6 mg/L (Woolf et al., 2002) - 0,3 à 4,4 mg/jour (Wasserman et al., 2006)
Aliment	- AJR Afssa : 2 mg/jour - DJA OMS (2006) : 0,06 mg/Kg/jour	- 0,7 à 10,9 mg/jour (Afssa) - US EPA : 0,14 mg/Kg/jour - 550 ppm dans le sol aux US	- > 10 mg/jour (Afssa) - 4500 ppm dans le sol à Groote Eylandt (Stauber and Florence, 1989)
Inhalation	- Parlement européen (01/01/2011) : 6 mg de MMT/L d'essence - OMS : $1,5 \cdot 10^{-4}$ mg de Mn/m ³ d'air	Concentrations variables : - Centre ville (Lyon 2011) : $2 \cdot 10^{-6}$ à $4 \cdot 10^{-6}$ mg/m ³ d'air - $2 \cdot 10^{-3}$ mg/m ³ d'air/an (Sen et al., 2011) - US EPA : $5 \cdot 10^{-5}$ mg/m ³ d'air - ATSDR : $4 \cdot 10^{-5}$ mg/m ³ d'air	- > $5 \cdot 10^{-5}$ mg/m ³ d'air (Bowler et al., 2007) - 0,9 mg/m ³ d'air/an induit le manganisme (Sen et al., 2011)

Tableau 1: Les trois voies principales d'expositions au manganèse: normes et consommation.

Afssa : agence française de sécurité sanitaire des aliments

AJR : apport journalier recommandé

ATSDR : agence des substances toxiques et des maladies (agency for toxic substances and disease registry)

DJA : dose journalière admissible

OMS : organisation mondiale de la santé

US EPA : agence de protection environnementale américaine (US environmental protection agency)

1.1.2. Rôle biologique

Le manganèse est trouvé sous 11 états d'oxydation différents dans l'environnement, mais les états Mn^{2+} , Mn^{4+} et Mn^{7+} sont les plus fréquents. Tous les êtres vivants sont donc exposés au manganèse.

1.1.2.5 Entrée du Mn dans l'organisme

Les états d'oxydation du Mn affectent son absorption. En effet, des recherches ont montré que la forme Mn^{2+} ($MnCl_2$) est plus facilement absorbée que les autres tels que les sels de sulfates ou acétate (Gibbons et al., 1976). La voie d'absorption est aussi importante puisque le Mn est absorbé plus rapidement par inhalation que par les autres voies (Tjälve et al., 1996). En effet, très peu de Mn passe la barrière cutanée. L'absorption de Mn après inhalation, par injection intraveineuse ou intrapéritonéale (expérimentation chez l'animal) permet de contourner la faible absorption du Mn par le tract gastro-intestinal. En effet, seulement 3 à 10% du Mn ingéré est absorbé (Mertz, 2009). Le Mn absorbé sous la forme Mn^{2+} par l'intestin est complexé avec les protéines du sang qui sont ensuite éliminées par le foie via la veine porte. De nombreux processus physiologiques permettent cette régulation de l'entrée de Mn et le maintien de son homéostasie. A titre d'exemple, chez l'animal il est connu que le Mn inhalé est transporté de façon rétrograde de l'épithélium olfactif jusqu'au striatum cérébral (Gianutsos et al., 1997).

1.1.2.6 Distribution du Mn dans l'organisme

Le Mn est présent dans tous les tissus du corps. Les plus forts taux sont couramment trouvés dans le foie, les reins, le pancréas et les glandes surrénales (Sumino et al., 1975). Des concentrations intermédiaires sont trouvées dans le cerveau, le cœur et les poumons (voir le rapport de "agency for toxic substances and disease registry" ; ATSDR, 2000), avec une accumulation préférentielle dans certaines régions du cerveau des nourrissons et jeunes animaux (Kontur and Fechter, 1988). Les plus faibles concentrations sont trouvées dans les os et la graisse. Certaines études suggèrent que les tissus riches en mitochondries (par exemple le foie, les reins et le pancréas) contiennent plus de Mn (Kato, 1963).

1.1.2.7 Excrétion du Mn

Le Mn est entièrement excrété par les fèces, seule une toute petite proportion (0,1-2%) est éliminée par les urines (Hauser et al., 1994) . De plus, le Mn fécal est composé de

Mn ingéré non absorbé et de Mn excrété par la bile (Davis and Greger, 1992). La sueur, les cheveux et le lait maternel contribuent aussi à l'excrétion du Mn.

1.1.2.8 Rôle physiologique du Mn

Le Mn est indispensable au bon fonctionnement de nombreux organes mais aussi à celui du système immunitaire. Il joue un rôle important dans la régulation de la glycémie ou encore pour la production de l'énergie cellulaire, la reproduction, la digestion et la croissance des os. Le Mn est également nécessaire (avec le potassium) pour initier la coagulation du sang (Aschner et al., 2006a). Placés expérimentalement en carence de Mn, les hommes présentent une éruption érythémateuse sur le torse et les femmes développent une humeur altérée et une augmentation de la douleur pendant la phase pré-menstruel du cycle ovarien (voir pour revue Aschner and Aschner, 2005).

Afin de mettre en évidence le rôle essentiel du manganèse, Golub et al. ont étudié plusieurs types d'alimentation chez le singe nouveau né. Les singes ont été nourris avec du soja (contenant naturellement 300 µg de Mn/L), du soja supplémenté en Mn (1000 µg de Mn/L) ou avec une alimentation classique. Lors de la croissance des singes, ils ont observé que la concentration des métabolites dopaminergiques et sérotoninergiques tend à augmenter (non significatif) lorsque l'alimentation contient du soja enrichie en Mn contrairement aux singes nourris avec une alimentation classique ou avec du soja seul. Cette tendance était corrélée à des troubles du comportement tels qu'une diminution des interactions sociales (Golub et al., 2005). Ces expériences suggèrent qu'une exposition à une alimentation fortement enrichie en Mn peut influencer le développement cérébral.

Un autre exemple du rôle essentiel du Mn a été montré par Vanoevelen et al. qui ont découvert qu'une mutation du gène ATP2C1 codant pour la protéine SPCA1, peut provoquer une maladie rare de la peau, appelé maladie de Hailey-Hailey (Missiaen et al., 2004; Vanoevelen et al., 2005). Les protéines SPCA1 sont des pompes ATPase présentent dans les membranes de l'appareil de Golgi transportant le Ca²⁺ et le Mn²⁺ du cytosol cellulaire vers la lumière du Golgi. Elle joue un rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie du Ca et Mn dans le cytosol et le Golgi (Missiaen et al., 2004). Enfin, nous pouvons mentionner qu'un déficit de Mn peut retarder la croissance, causer une activité épileptique, conduire à une formation osseuse insuffisante, porter atteinte à la fertilité et causer des malformations congénitales chez l'homme (Aschner et al., 2006a). Toutefois, comme nous l'avons rappelé plus haut, un déficit de Mn est très rare, voire inexistant car le Mn est très présent dans la nourriture ou l'eau de boisson.

1.1.2.9 Rôles cellulaires

Dans l'organisme des mammifères, on trouve le manganèse sous forme Mn^{2+} et Mn^{3+} . Il forme facilement des complexes avec des ligands organiques et inorganiques tels que :

- les molécules de faible masse moléculaire comme le bicarbonate, le citrate ;
- l'albumine ;
- les grosses protéines comme les macroglobulines.

Le Mn peut assurer un rôle structural pour les métalloprotéines. En effet, c'est un cofacteur de plusieurs enzymes telles que (Zhang et al., 2003) :

- la superoxyde dismutase 2 (SOD-2), présente dans les mitochondries en tant qu'anti-oxydant (élimine les radicaux libres) ;
- la glutamine synthétase (localisé dans les astrocytes) ;
- la phosphatase alcaline (présente dans l'ADN/ARN des hépatocytes et dans les vésicules de calcification des cellules osseuses ostéoblastes et chondroblastes) ;
- l'arginase (dans les hépatocytes, c'est la dernière enzyme du cycle de l'urée).

Il est aussi essentiel pour le fonctionnement normal de plusieurs processus incluant les acides aminés, lipides, protéines et le métabolisme des hydrates de carbone (Erikson and Aschner, 2006). Le Mn joue aussi un rôle de catalyse ou de régulation dans les réactions enzymatiques impliquant les hydrolases, déhydrogénases, kinases, décarboxylases et les transférases.

Le Mn est trouvé en faible quantité dans l'organisme par rapport à d'autres éléments tels que le Mg et le Ca (**Tableau 2**).

	Cellules gliales (mM)	Neurones (mM)
Ca^{2+}	39,90	24,90
Mg^{2+}	15,40	22,00
Fe^{2+}	0,52	0,48
Cu^{2+}	0,27	0,22
Zn^{2+}	0,54	0,72
Mn^{2+}	0,38	0,11

Tableau 2 : Concentration des cations dans les cellules cérébrales (Tholey et al., 1988)

1.2. Toxicité du Mn

En plus de toutes ces contributions essentielles, le Mn est connu pour être un neurotoxique depuis plus de 150 ans.

1.2.1. Les protéinopathies

Connues depuis Hippocrate (5^{ème} siècle avant notre ère), les protéinopathies sont de plus en plus répandues parallèlement à l'augmentation du vieillissement des populations. Les protéinopathies sont des maladies dans lesquelles certaines protéines deviennent structurellement anormales et perturbent le fonctionnement des cellules, tissus et organes. Il existe aujourd'hui 80 protéinopathies dont les maladies neurodégénératives humaines telles qu'Alzheimer, Parkinson et Creutzfeldt-Jakob. Lorsque les premiers diagnostics des protéinopathies ont été effectués, les chercheurs ont été très attentifs à l'influence potentielle de l'environnement. Effectivement, 20 ans après que James Parkinson publie la première description de la "paralysie agitante" (appelée par la suite maladie de Parkinson (MP) par le neurologue français Jean Martin Charcot), James Couper (Couper, 1837) démontre que le manganisme, une maladie présentant des symptômes similaires à la MP, affecte les individus exposés de manière chronique à de fortes doses de manganèse. De même, chez l'animal, une composition trop pauvre ou trop riche en cuivre dans les sols et herbes peut induire des maladies neurodégénératives (Voisin, 1959). La plus commune de ces maladies est l'encéphalopathie spongiforme bovine dont les symptômes sont proches de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Ironsides, 2012). De même, une intoxication au plomb peut induire le saturnisme, maladie provoquant différents symptômes dont le retard mental et la paralysie des membres (Acosta-Saavedra et al., 2011).

Ces indications montrent que les caractéristiques de certains environnements peuvent induire des prédispositions aux maladies protéinopathiques (Davies and Brown, 2009). Le rôle des métaux dans les maladies neurodégénératives est de plus en plus étudié et plus précisément leur distribution dans le corps, les complexes formés dans les cellules et les quantités de métaux auxquelles le corps est exposé (Bohic et al., 2011).

1.2.2. Manganisme

Cette maladie initialement décrite par Couper en 1837, est fréquemment retrouvée chez les mineurs, les soudeurs, et les ouvriers travaillant dans le blanchiment du textile. En effet, lorsque les conditions de travail sont mauvaises (ventilation insuffisante, protection limitée), ces travailleurs respirent des particules de Mn tout au long de leurs années de travail. Dans la littérature, les mots clefs « welders manganese », sont associés à 138 articles référencés dans Pubmed décrivant un grand nombre de patients (environ 50 par publication) présentant les symptômes du manganisme.

Il a été montré qu'une exposition chronique au manganèse (inhalation supérieure à 0,15 µg de Mn / m³ d'air par jour) induit une accumulation de cet ion dans le cerveau (Bonilla et al., 1982). Seule une exposition chronique (plusieurs années) peut induire le manganisme ; une exposition aiguë chez l'homme n'a jamais été reportée dans la littérature. Chez le rongeur, elle peut induire un arrêt cardiaque (Jiang and Zheng, 2005). L'atteinte du système nerveux central (SNC) conduit à une variété de perturbations psychiatriques et motrices. Les premières conséquences visibles d'une intoxication au Mn ont été des syndromes extra-pyramidaux, similaires à la MP (Couper, 1837; Barbeau, 1984), comme la bradykinésie (trouble moteur, rigidité musculaire), tremblement, trouble de la démarche, posture instable et dystonie (ensemble de dérèglements du tonus postural et du tonus d'action) et/ou ataxie (manque de coordination fine des mouvements volontaires), mais aussi des déficits cognitifs comme la perte de mémoire, perte du langage, diminution de la flexibilité mentale, ralentissement cognitif (Josephs et al., 2005; Weiss, 2006 ; voir **Tableau 3**). D'autres symptômes semblent être plus spécifiques du manganisme tels que les changements de l'humeur et de l'état psychiatrique (dépression, agitation, hallucination, rires et pleurs anormaux). Pour plus d'information, Bowler et al. ont réalisé une liste des revues de la littérature traitant des symptômes neurologiques et neuropsychologiques des travailleurs exposés au manganèse (Bowler et al., 2007). Kieburtz et Kurlan évoquent une relation de cause à effet entre MP et Mn. En effet, des travaux ont montré sans équivoque une relation entre le travail de certaines personnes (soudeurs...) et la MP (Kieburtz and Kurlan, 2005).

Tableau 3 : liste des symptômes d'une intoxication chronique au Mn

- démarche anormale
 - problème de coordination
 - rire anormal
 - visage sans expression
 - faiblesse
 - bradykinésie
 - somnolence
 - dysarthrie
 - difficultés à marcher
 - maladresse
 - manque d'équilibre
 - douleurs musculaires
 - diminution de la puissance des jambes
-

Les problèmes de coordination, rire anormal, faiblesse, somnolence, maladresse, douleurs musculaires et de diminution de la puissance des jambes ne sont généralement pas associés à la maladie de Parkinson (Weiss, 2006).

La dégénérescence neuronale est évidente au niveau du globus pallidus avec des dommages moins sévères dans le striatum (putamen et noyaux caudés) et dans la substance noire réticulée. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet de révéler la localisation du Mn^{2+} dans le cerveau, notamment au niveau du globus pallidus (bilatéral), du striatum, du bulbe olfactif et dans la substance blanche frontale et cela aussi bien chez l'homme (Dietz et al., 2001) que chez l'animal (injection chez le singe de 10 à 14mg/Kg de $MnCl_2$, 7 fois, une fois par semaine, (Shinotoh et al., 1995)) ; ce qui n'est pas retrouvé dans la MP (**Figure 2**). La MP et le manganisme diffèrent également par l'âge des patients (souvent jeunes pour le manganisme) et par la faible réponse au traitement à la L-dopa (Lévodopa) (Koller et al., 2004).

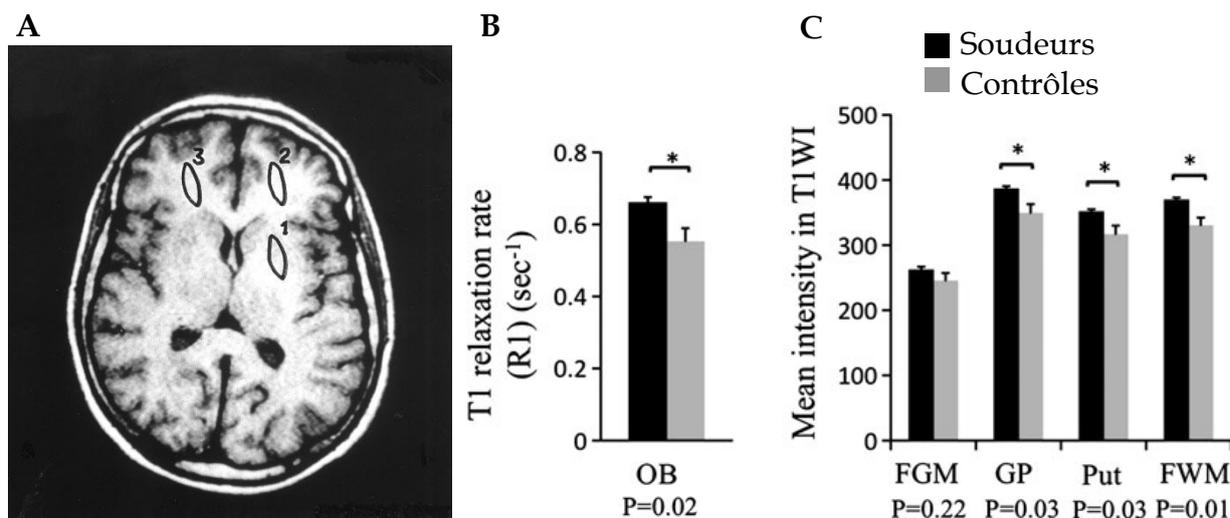


Figure 2 : Structures cérébrales rehaussées dans le manganisme

A. Exemple d'une IRM 0,5T avec un signal pondéré T1 hyper-intense dans le globus pallidus (ROI 1) et dans la substance blanche frontale (ROI 2 et 3) chez l'homme. **B.** Temps de relaxation R1 plus court dans le bulbe olfactif (OB) chez les soudeurs. **C.** Intensité du signal pondéré T1 (IRM 3T) de la substance grise frontale (FGM), du globus pallidus (GP), du putamen (Put) et de la substance blanche frontale (FWM) plus prononcée chez les soudeurs (Dietz et al., 2001; Sen et al., 2011).

Le manganisme est une maladie irréversible, en effet, le manganèse est éliminé lentement du cerveau (Schmitt et al., 2011). Newland et al. ont exposé des primates à l'isotope radioactif ⁵⁴Mn par inhalation et ont montré une élévation du taux de Mn cérébral avec un pic à 40 jours. Le Mn disparaît du cerveau, avec une demi-vie comprise entre 223 et 267 jours (**Figure 3**) (Newland et al., 1987). Chez l'homme, il met parfois des années à être éliminé du cerveau. Son effet toxique sur les cellules est par contre beaucoup plus rapide. Il a été montré, chez le rongeur, que la dose de Mn est corrélée à une diminution de la mémoire spatiale et à une réduction des neurones nouvellement formés dans la zone subgranulaire (Tan et al., 2007).

Il semblerait que le rongeur soit moins sensible que l'homme à la toxicité du Mn (Newland, 1999). Une des explications avancées serait la différence d'architecture cérébrale entre le rongeur et l'homme.

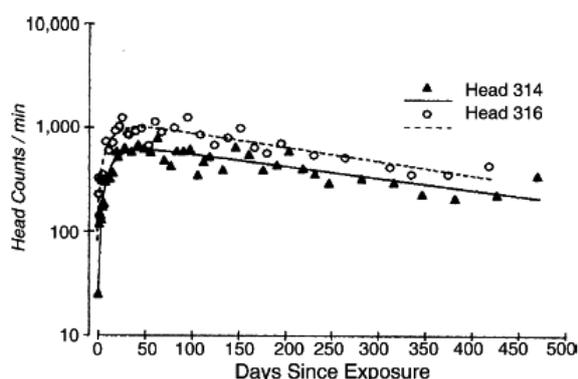


Figure 3 : Efflux du Mn dans le cerveau de singe
Radioactivité dans le cerveau après inhalation de ^{54}Mn chez deux singes. (Newland et al., 1987)

Concernant le traitement, il n'existe pas de plan précis à ce jour pour le manganisme. Les médicaments anti-Parkinsonniens (tel que la lévodopa) peuvent avoir un effet positif sur les symptômes du manganisme, mais cet effet est temporaire et souvent de courte durée. L'objectif principal est de diminuer la concentration de Mn dans l'organisme. Voici les différents traitements effectués chez l'homme ou l'animal ayant des effets prometteurs :

- Chélation du Mn par du Ca-EDTA (Rivera-Mancía et al., 2011)
- Chélation du Mn par l'acide para-aminosalicylique (PAS). Ce traitement effectué chez l'homme améliore l'état général des patients (écriture et démarche quasi-normale, examen IRM normal) (Jiang et al., 2006). Le PAS est prometteur, il réduit la neurotoxicité causé par le Mn sur les cellules dopaminergiques (études en cours sur l'animal) (Nelson et al., 2010).
- Traitement au diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate (DPTVP), effectué seulement chez le rat. Il améliore les performances motrices probablement par ses propriétés anti-oxydantes (Ávila et al., 2010).

Le traitement principal consiste à mettre fin à l'exposition au Mn à la phase précoce de la maladie (apparition des premiers symptômes), dans ce cas, la maladie est réversible.

1.2.3. Toxicité sur les organes autre que le cerveau

Le manganèse peut avoir des effets toxiques sur d'autres organes que le cerveau. Son action toxique dépend des doses auxquelles le corps est exposé. Les doses indiquées ci-dessous représentent une concentration moyenne de Mn administrée de façon chronique.

A des doses normales (se référer au **Tableau 1**), le manganèse n'a pas d'effet toxique sur l'organisme. A doses moyennes (supérieures aux normes, exposition chronique sur plusieurs années, **Tableau 1**), le Mn peut provoquer une réponse

inflammatoire des poumons, c'est-à-dire une augmentation de la sensibilité aux infections respiratoires telles que les bronchites et les pneumonies. Le Mn touche aussi les organes de reproduction et peut induire une infertilité. Il s'accumule particulièrement dans le cœur par les canaux calciques et provoque des troubles cardiaques tels que de la tachycardie, bradycardie et arythmie sinusale (Jiang and Zheng, 2005). Pour finir, à dose élevée (exposition aigue, décrite uniquement chez l'animal), le Mn s'accumule dans le cœur, les poumons et le foie. Cela peut provoquer un arrêt cardiaque.

1.3. Homéostasie du Mn et cellules nerveuses

1.3.1. Entrée du Mn dans le cerveau

Dans l'organisme, le manganèse est présent sous trois formes prédominantes : le Mn^{2+} , Mn^{3+} et Mn^{4+} . Les concentrations tissulaires sont très faibles (élément trace) chez l'homme et répartie de façon inhomogène. Par exemple dans le cerveau, on retrouve des quantités allant de 0,72 à 4,2 $\mu\text{g/g}$ de tissu sec de cerveau humain (soit 13 à 77 μM de Mn par extrapolation à du tissu frais). Les plus fortes concentrations sont localisées au niveau du BO et des noyaux gris centraux (striatum, pallidum, noyau sous-thalamique, substance noire) ainsi que dans la glande pinéale (épiphyse) et la graisse (**Tableau 2**). De plus, la substance grise comporte plus de Mn que la substance blanche (1,54 $\mu\text{g/g}$ dans la substance grise contre 0,93 $\mu\text{g/g}$ dans la substance blanche) (Bonilla et al., 1982). Ces structures sont aussi celles où le Mn s'accumule en cas d'exposition chronique.

Cette distribution varie légèrement en fonction des espèces mais certaines structures accumulant le Mn sont communes à l'homme, au primate non humain et au rongeur. Bock et al. ont étudié l'accumulation du Mn chez le ouistiti (primate non humain) et le rat. Ils ont observé, pour une même dose, une quantité de Mn plus élevée dans le cerveau du ouistiti que dans celui du rat. De plus, ils ont noté un contraste pondéré T1 significativement plus fort chez les animaux ayant reçus du Mn (30 mg/Kg, 40 mM, 4 doses à 48h d'intervalle) que chez les animaux contrôles (sans Mn) pour les structures suivantes : BO, cervelet, DG/CA3 (hippocampe), globus pallidus et glande pituitaire pour les rats comme pour les ouistitis. Cependant, un rehaussement au niveau des ganglions de la base et du cortex visuel a été observé uniquement chez le ouistiti. Une explication avancée par les auteurs est un transport du Mn par le liquide céphalorachidien via les ventricules latéraux beaucoup plus larges chez le ouistiti que chez le rat. Un fort rehaussement est aussi observé au niveau des hippocampes chez le ouistiti et le rat, une structure adjacente aux ventricules. Cette accumulation

au niveau des BO, cervelet, hippocampes, globus pallidus et glande pituitaire est commune chez tous les primates incluant l'humain et les rongeurs (Bock et al., 2008a).

Les concentrations tissulaires étant très faibles (élément trace), il est assez difficile de détecter le Mn à des concentrations physiologiques. Les travaux de recherche ont été effectués sur des rongeurs après administration aiguë ou chronique de $MnCl_2$. Aoki et al. ont étudié la distribution du Mn au cours du temps dans le cerveau de rat (**Figure 4**). 2h après injection IV de $MnCl_2$ ($884,3 \mu\text{mol/Kg}$, 2 mL, 64 mM), il a été observé une augmentation du signal T1 dans les structures ventriculaires et dans les organes périventriculaires comme la glande pituitaire (Pit), la glande pinéale et les éminences médianes. Un jour après injection, le signal est augmenté dans tout le cerveau mais de façon hétérogène. Le BO, l'hippocampe et les structures cérébrales profondes présentent les contrastes les plus forts. L'augmentation du signal est encore clairement visible 4 jours après l'injection mais diminue petit à petit jusqu'à atteindre la même intensité que chez les contrôles au bout de 14 jours (Aoki et al., 2004a).

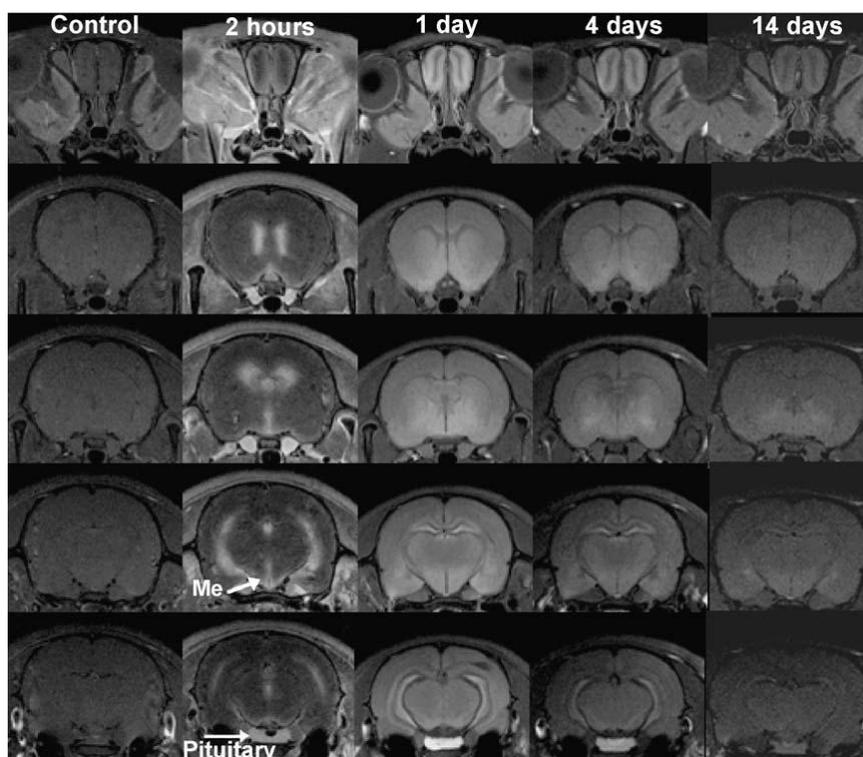


Figure 4 : Evolution au cours du temps de la distribution cérébrale du Mn.

IRM (11,7T) pondérée T1 reflétant la distribution du Mn dans le cerveau du rat pendant une période de 2 semaines après administration de $MnCl_2$ par voie intra-veineuse. L'IRM est effectuée 2h, 1 jour, 4 jours et 14 jours après l'administration de $MnCl_2$ en IV ($884,3 \mu\text{mol/Kg}$; 2 mL ; 64 mM). Les contrôles qui n'ont pas reçus de Mn, présentent un très faible contraste (Aoki et al., 2004a).

Me : « median eminence » (éminences médiane) ; « Pituitary » : glande pituitaire

Ceci illustre bien qu'une fois le Mn entrée dans le cerveau, sa clairance reste très lente (voir p13). Deux voies d'entrée principales au niveau du cerveau sont possibles pour le Mn : la barrière hémato-encéphalique (BHE) et la barrière sang-liquide céphalo-rachidien (sang-LCR) (**Figure 7**). Les transporteurs du Mn à travers ces barrières sont mal connus et encore sujet de débat. Par conséquent plusieurs équipes de recherche travaillent sur la question suivante : Comment le Mn traverse la BHE et la barrière sang-LCR ?

1.3.1.1 Barrière hémato-encéphalique

La BHE est un filtre physiologique entre le cerveau et le sang. Elle est composée de cellules endothéliales à jonctions serrées, de péricytes et d'astrocytes tapissant la paroi abluminale des capillaires sanguins. Le côté basal des cellules endothéliales est fixé sur une lame basale constituée de collagène. Cet ensemble complexe filtre l'entrée de molécules et d'ions dans le tissu cérébral. Seules les substances gazeuses comme l'oxygène et le dioxyde de carbone diffusent facilement au travers de la BHE. Il existe différents modes de transports décrits ci-dessous.

Dans le plasma, environ 80% du Mn est lié à la globuline ou à l'albumine et une petite fraction est liée à la transferrine (Tf). Lié à l'albumine et à la globuline, le Mn ne peut pas traverser la BHE, la molécule formée ayant une masse moléculaire trop importante et étant instable (Critchfield and Keen, 1992).

Les différents modes de passage du Mn à travers la BHE seraient :

► **Transport passif**

Ce type de transport ne nécessite pas d'énergie.

► **Diffusion simple ou libre**

Le Mn sous forme libre peut traverser la BHE par les jonctions serrées (**Figure 5**), c'est de la diffusion paracellulaire (Zheng et al., 2003).

► **Diffusion facilité**

Le Mn utilise essentiellement les canaux calciques pour traverser les membranes cellulaires. Il peut traverser la membrane par d'autres canaux ioniques tels que les TRPM7 (trivalent receptor potential melastatin 7). Le Mn traverse aussi les membranes liées à des protéines de transport telles que :

- l'acide citrique (synthétisé lors du cycle de Krebs) (Crossgrove et al., 2003).
- la transferrine (transporteur du Fe^{3+} , Tf) pour le transport de Mn^{3+}

- Les gènes SLC39 (solute carrier-39) qui codent pour les protéines de transport du Zn^{2+} : ZIP. En particulier, les gènes SLC39A8 et A14 codent pour les protéines ZIP8 et ZIP14 ayant une forte affinité avec le Mn^{2+} (He et al., 2006).

- DMT-1 (divalent-metal transporter 1) pour le transport de Mn^{2+}

- P2X et P2Y (Homomeric purine receptors) (Köles et al., 2011)

Les transporteurs prédominants au niveau de la BHE sont la Tf et le DMT1 (aussi appelé NRAMP-2 ou DCT-1). La **Figure 6** résume les modes de transport du manganèse à travers la BHE les plus courants (Yokel, 2006; Aschner et al., 2007; Fitsanakis et al., 2007).



Figure 5 : Jonctions serrées entre deux cellules endothéliales de la BHE.

Microscopie électronique à balayage, coupe de striatum de rat, Karin Pernet-Gallay, GIN, Grenoble. Barre d'échelle=1 μ m.

1 : jonctions serrées ; 2 : lumière du vaisseau ; 3 : lame basale.

► Transport actif

Il permet la traversée des ions à travers la membrane contre leur gradient de concentration. Ce transport nécessite de l'énergie sous forme d'ATP.

- le gène park9 ou ATP13A2 code pour une protéine lysosomale membranaire de type P5 transportant les cations. Il a été montré, chez la levure, que cette protéine est un transporteur du Mn et protège les cellules contre un excès de ce dernier (Tan et al., 2011).

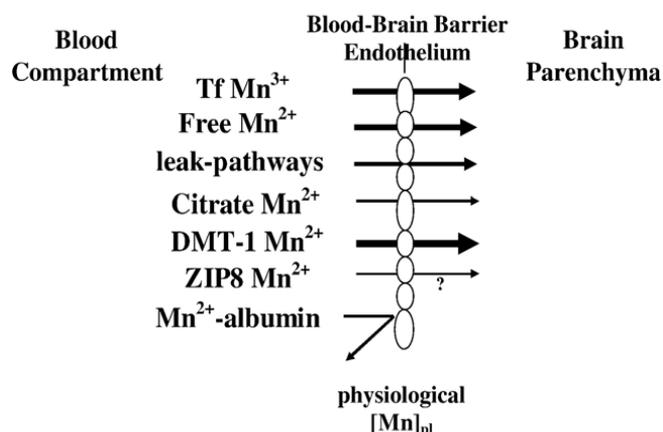


Figure 6 : Transport du Mn dans le tissu cérébral.

Mécanismes principaux du transport du Mn à travers la BHE à des doses physiologiques (Aschner et al., 2007)

1.3.1.2 Barrière sang-LCR

La barrière sang-LCR est formée par les cellules endothéliales, reliées entre elles par les jonctions serrées des plexus choroïdes (PC). Cette barrière a une surface 5000 fois moins importante que la BHE (Vandenhoute, 2011), mais est tout aussi importante pour l'approvisionnement du cerveau en vitamines et glucose par exemple (Liddelow, 2011). L'entrée du Mn est 100 fois plus rapide via les PC que via la BHE. Contrairement à la BHE, le passage du Mn à travers la barrière sang-LCR a été peu étudié. Les propositions de transporteurs incluent la Tf, le DMT1, MTP1 (metal transport protein-1), les canaux calciques et les transporteurs du Zn tels que (ZnT1, ZnT3, ZnT4 et ZnT6) (Yokel, 2006).

Bornhorst et al. défendent l'hypothèse que le Mn, après injection ou ingestion, gagne le système nerveux central (SNC) via la barrière sang-LCR plutôt que via la BHE. Ils ont établi un modèle *in vitro* de BHE et de barrière sang-LCR à partir de cellules porcines. Pour des concentrations $> 0,2$ mM, appliquées du côté apical, ils observent une altération de la BHE (fuite paracellulaire du Mn). Lorsque cette même concentration est appliquée du côté basal, ce qui mime les conditions *in vivo* d'accumulation du Mn dans les structures cérébrales, le Mn n'affecte pas la perméabilité de la BHE jusqu'à des concentrations de 0,5 mM. Pour mémoire, la concentration physiologique cérébrale du Mn est comprise entre 0,013 et 0,077 mM. Dans le cas d'une intoxication, elle peut être bien plus élevée. De plus, les auteurs ont observé un faible efflux de Mn à travers le modèle de BHE pour des concentrations de Mn $> 0,1$ mM. Le Mn pourrait donc être éliminé par diffusion lente à travers la BHE (Yokel et al., 2003), ce qui est en accord avec les expériences décrites précédemment (Aoki et al., 2004a). Ils ont aussi montré que les cellules des PC

accumulent plus le Mn que les cellules de la BHE (**Tableau 4**). Tout comme la BHE, la barrière sang-LCR est plus affectée si le Mn est appliqué du côté apical que s'il est appliqué du côté basal (Bornhorst et al., 2012).

Incubated MnCl ₂	Cellular Mn in PBCECs	Cellular Mn in PCPECs
μM	$\mu\text{g Mn/mg protein}$	$\mu\text{g Mn/mg protein}$
0	0.20 ± 0.03	0.20 ± 0.01
50	1.14 ± 0.18	3.33 ± 0.05
200	2.90 ± 0.76	7.63 ± 1.76

Tableau 4 : Bio-distribution cellulaire du MnCl₂ dans un modèle de BHE et de barrière sang-LCR après 48h d'incubation (Bornhorst et al., 2012).

Les cellules sont mises en culture en boîte classique avant incubation au MnCl₂.

PBCECs : cellules étant utilisées comme modèle *in vitro* de la BHE

PCPEPs : cellules étant utilisées comme modèle *in vitro* de la barrière sang-LCR

L'influx de Mn (à des doses physiologiques) au travers la BHE est la voie d'entrée principale dans le cerveau (par rapport à la barrière sang-LCR). Une infusion de 11,7 μM de Mn induit une concentration plasmatique de plus de 8 μM (Yokel, 2006). Précédemment, nous avons noté l'apparition du Mn dans les ventricules 2h après injection de Mn, suggérant une accumulation du Mn dans les PC (Aoki et al., 2004a). Ces données montrent que les mécanismes d'entrée du Mn restent encore ambigus.

Nous pouvons tout de même en conclure qu'à des doses physiologiques le Mn passerait dans le cerveau via la BHE et qu'à des doses non physiologiques (en excès) les PC seraient privilégiés (Aschner et al., 2007). Enfin, le Mn traverse facilement ces deux barrières mais son efflux semble limité par un manque de transporteurs du côté apical des cellules vasculaires.

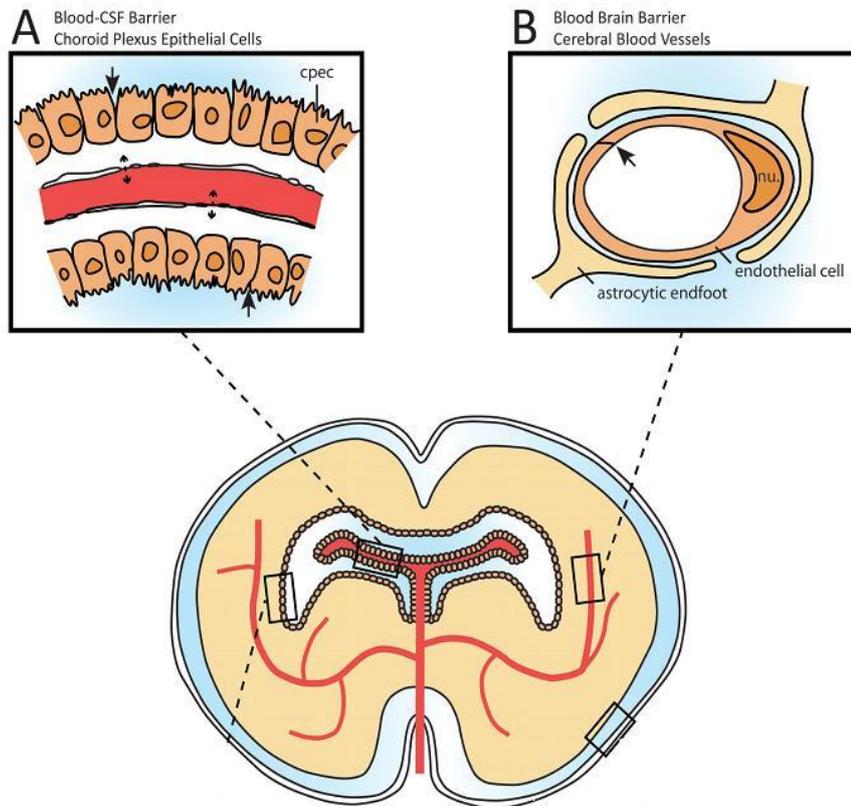


Figure 7 : Illustration des deux barrières cérébrales.

Coupe coronale d'un cerveau de rat au niveau des hippocampes dorsaux.

A. Barrière sang-LCR (blood-CSF barrier). Elle se situe entre les vaisseaux sanguins des PC et le LCR. Les vaisseaux sanguins des PC sont fenêtrés et forment une barrière non restrictive (flèches du milieu). Les cellules épithéliales des PC (CPEC) sont liées par des jonctions serrées fonctionnelles (flèches).

B. Barrière hémato-encéphalique. Elle se situe entre la lumière des vaisseaux sanguins cérébraux et le parenchyme cérébral. Les jonctions serrées des cellules endothéliales (flèches) forment la barrière physique arrêtant les mouvements des molécules. Les pieds astrocytaires sont en contact direct avec les vaisseaux sanguins cérébraux et forment une « unité neuro-vasculaire » (Liddelow, 2011).

1.3.2. Entrée et transport du Mn dans la cellule

Une fois dans le cerveau, le manganèse entre dans les cellules gliales et neuronales. Un des canaux les plus connus pour le passage du Mn est le canal Ca^{2+} voltage dépendant de type L. Narita et al. ont étudié ce phénomène sur la jonction neuromusculaire de la grenouille. Le nerf a été stimulé et la réponse a été mesurée en terme de PPSEs (potentiel post synaptique spontané ou potentiel de plaque, en mV).

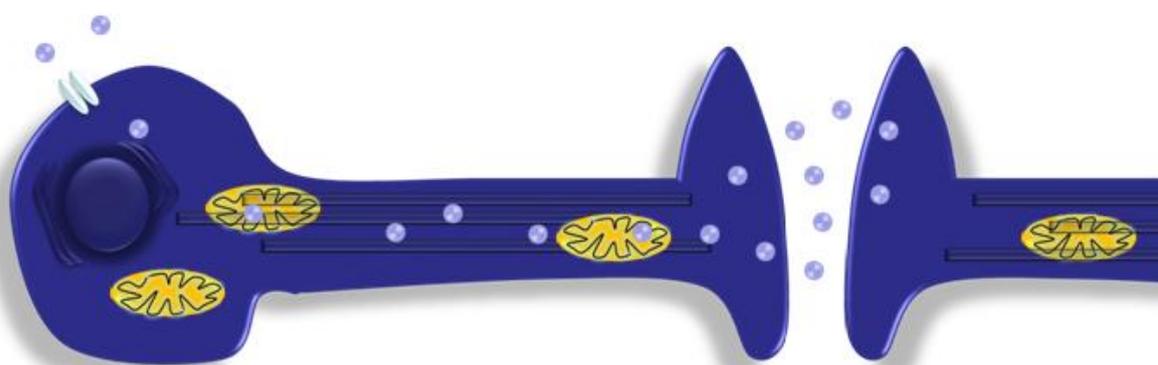
En présence d'un inhibiteur des canaux calciques voltage dépendant de type L, la vérapamil (40 μ M), et de Mn (0,5 μ M), l'intensité des PPSEs est diminuée par rapport à la condition sans inhibiteur. Le blocage des canaux calciques a donc limité la propagation du Mn. Cela démontre l'analogie du Mn²⁺ avec le Ca²⁺ et son passage à travers les canaux calciques voltage dépendant (Narita et al., 1990). De plus, l'analogie du Mn pour le Ca est utilisée pour bloquer la fluorescence des sondes calciques (quench ; sonde Fura-2 ou Rhod2) (Simpson et al., 1995; Du et al., 2001).

Nous savons donc que le Mn traverse la BHE et qu'il rentre dans les cellules cérébrales (neurones + cellules gliales ; détaillé dans le chapitre 4). Cependant, les mécanismes de transports et les fonctions du manganèse restent encore mal compris et leur étude se heurte à un challenge biologique et analytique du fait de la très faible concentration tissulaire du Mn. Ci-dessous, nous rapportons les données de la littérature proposant un système d'entrée et de transport du Mn au niveau cellulaire.

La plupart des études sur les transporteurs du Mn dans la cellule ont été réalisées chez la levure. Il a été montré que, outre les canaux calciques, le Mn peut entrer dans les cellules par les transporteurs du Fe³⁺ (Tf) mais aussi du Zn²⁺ (ZIP8). Son transporteur membranaire spécifique chez la levure est le Smf1, un transporteur de métaux de la famille des Nramp (Culotta et al., 2005). Une fois entré dans la cellule, le manganèse serait tout d'abord séquestré dans le réticulum endoplasmique puis stocké dans des vésicules pour le transport. Le Mn serait alors délivré dans les mitochondries via les récepteurs Mtm1p pour l'activation de la SOD-2 et dans l'appareil de Golgi via les récepteurs Pmr1p pour l'activation de la STase (nécessaire pour le transfert du sucre) (Culotta et al., 2005). Il serait par la suite transporté le long des microtubules par les mitochondries ou des vésicules. Ce point a été démontré par ajout d'une drogue (directement au niveau cérébral) détruisant les microtubules, la colchicine : le transport du Mn se retrouve altéré de -82% dans l'étude de Takeda et al (0,4 mg/Kg de colchicine) et -44% dans l'étude de Smith et al (1 mg/Kg de colchicine chez la souris) (Takeda et al., 1998; Smith et al., 2007b). Enfin, Le Mn serait relargué au niveau de la fente synaptique et pris en charge par le neurone suivant. En présence de Mn et après stimulation du neurone, il a été observé une co-libération de Mn et de glutamate au niveau de l'espace synaptique. Cela suggère la possibilité d'une co-localisation du Mn et du glutamate dans les vésicules ; le Mn serait ainsi transporté par ce système jusqu'à la fente synaptique (Lin and Koretsky, 1997). La **Figure 8** schématise l'entrée du Mn dans une cellule neuronale.

De plus, le Mn est retrouvé dans les cellules gliales, les neurones et les vaisseaux sanguins cérébraux. A des doses physiologiques, environ 80% du manganèse cérébral est stocké dans les astrocytes, le Mn étant un cofacteur essentiel pour l'enzyme astrocytaire, la glutamine synthétase (Wedler and Denman, 1984). Cette

enzyme, qui permet de synthétiser de la glutamine à partir du glutamate capturé par les astrocytes, est nécessaire aux neurones glutamatergiques (Albrecht et al., 2010). La concentration de Mn total dans les cellules gliales est plus importante que dans les neurones : 50-75 μM . Dans les cellules gliales, le Mn est distribué de la façon suivante : 30-40% dans le cytoplasme, 60-70% dans les mitochondries (Wedler et al., 1994). Il a été retrouvé moins de 10 μM en moyenne de Mn dans les neurones (Prohaska, 1987), moins de 0,02 μM dans le sang et moins de 0,1 μM dans les cellules endothéliales (Aschner et al., 1992).



Entrée Mn^{2+}	Transport Mn^{2+} le long des microtubules	Mn^{2+} transmission
Canaux Ca^{2+}	Transport mitochondrie / vésicules	synaptique

Figure 8 : Schéma récapitulatif de l'entrée du Mn (billes bleues) dans une cellule cérébrale, ici un neurone, mitochondries en jaune (voir pour revue Pautler, 2004).

La libération de neurotransmetteurs (NT) est dépendante du flux calcique via les canaux ioniques spécifiques activés par la dépolarisation des terminaisons nerveuses pré-synaptiques. En effet, le changement de polarité de membrane provoqué par l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau d'une synapse déclenche l'ouverture de canaux calciques membranaires dépendants du voltage. L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire qui en résulte provoque la fusion de la membrane vésiculaire avec la membrane plasmique et la libération des neuromédiateurs. Certains métaux tels que le Sr et le Ba peuvent remplacer le Ca dans le processus de libération des NT, alors que la plupart des métaux suppriment la transmission synaptique et l'influx de Ca. Le Mn a un effet plus complexe sur la neurosécrétion. Tout comme le calcium, il peut pénétrer par les canaux calciques pré-synaptiques et peut contribuer à la libération de dopamine par les terminaisons nerveuses dépolarisées. Cependant, le Mn n'est pas capable d'initier la libération de NT (Drapeau and Nachshen, 1984).

Certaines études suggèrent que la toxicité du Mn peut être liée à la prise de Mn par les neurones dopaminergiques du striatum. Par exemple, Erikson et al. suggèrent l'entrée du Mn via les transporteurs dopaminergiques (TDA). Cependant, l'absence de TDA fonctionnels n'affecte pas l'accumulation de Mn dans les régions du cerveau autre que le striatum. En effet, le Mn s'accumule dans des structures comme l'hippocampe qui est essentiellement glutamatergique (Erikson and Aschner, 2006).

1.3.3. Mécanismes de neurotoxicité du Mn

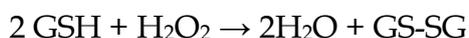
A l'échelle cellulaire, les doses toxiques diffèrent de celles rapportées pour l'organisme (cf. **Tableau 1**, p5)

1.3.3.1 Etude cellulaire : Mn à faibles doses

Nous avons vu précédemment que le Mn, à des doses physiologiques est important pour le fonctionnement de diverses enzymes telles que la superoxyde dismutase mitochondriale. Cette enzyme joue un rôle clé d'anti-oxydant dans la cellule et de lutte contre les dérivés réactifs oxygénés (DRO ou ROS en anglais pour « reactive oxygen species ») tels que les radicaux libres, les ions oxygénés et les peroxydes. La dismutation de l'ion superoxyde, catalysée par les SOD, peut être écrite sous la forme suivante :



En condition physiologique, l'ion O_2^- est produit essentiellement à partir des NADPH oxydases. Le peroxyde d'hydrogène ainsi formé est par la suite soit dégradé en $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ par la catalase (enzyme anti-oxydante) soit dégradé grâce à la glutathion peroxydase (GSH, enzyme anti-oxydante) :



(GSH représente le monomère réduit du glutathion et le GS-SG le disulfure de glutathion oxydé).

Aux concentrations physiologiques, le Mn joue donc un rôle d'anti-oxydant (Chang and Kosman, 1989).

1.3.3.2 Etude cellulaire : Mn à fortes doses

Nous savons, suite aux études effectuées sur le manganisme, que le Mn, à forte dose, induit une toxicité et la mort des cellules. Les cellules principalement visées par la toxicité du Mn sont les cellules dopaminergiques. Un des multiples facteurs impliqué dans la toxicité du Mn est le stress oxydatif induit notamment par la stimulation par le Mn de l'auto-oxydation des neurones dopaminergiques (Sloot et al., 1996). Cette observation est renforcée par celle d'une accumulation de Mn dans des régions riches en cellules dopaminergiques dont la concentration en dopamine se retrouve diminuée (Mustafa and Chandra, 1971). Afin d'examiner les mécanismes par lesquels le Mn induit une réponse toxique, de nombreuses études ont utilisé la lignée cellulaire PC12 (phéochromocytome de rat) comme modèle présentant une grande partie du mécanisme biochimique associé aux neurones dopaminergiques. A forte dose (800 μM), le Mn entraîne la mort des cellules PC12 par apoptose (Desole et al., 1996; Hirata, 2002). En effet, à ces doses, le Mn n'a plus ou peu de fonctions anti-oxydantes et au contraire engendre un stress oxydatif par libération de DRO (**Figure 9**) et de quinones (Graham, 1984) endommageant alors l'ADN, les protéines et les lipides des membranes par formation de radicaux libres (Malecki, 2001).

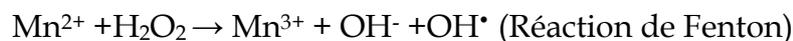


Figure 9 : Formation d'un radical hydroxyle (OH).

Le manganèse réagit avec l'eau oxygénée pour donner un radical hydroxyle (**OH**). Ce radical, hautement réactif peut oxyder les constituants cellulaires. La dismutation du superoxyde catalysée par la SOD permet d'éviter cette toxicité dans des conditions physiologiques.

De ce fait, outre l'oxydation de la dopamine, le Mn engendre 3 types de perturbations cellulaires conduisant à la mort cellulaire (Desole et al., 1996; Hirata, 2002) :

- le Mn entre dans les mitochondries et provoque un dérangement de la chaîne respiratoire mitochondriale et plus précisément de la phosphorylation oxydative et du cycle de l'acide citrique (ou cycle de Krebs). La production d'énergie sous forme d'ATP se retrouve amoindrie (Malecki, 2001; Malthankar et al., 2004; Zwingmann et al., 2004). Ce dérangement peut provoquer la destruction mitochondriale par la libération du cytochrome C et activation de la cascade apoptotique.

- L'homéostasie du $\text{Fe}^{2+/3+}$ et du Ca^{2+} sont perturbées, en raison notamment de leurs similarités atomiques avec le Mn^{2+} ($\text{Mn}=55\text{g/mol}$; $\text{Fe}=55,85\text{g/mol}$; $\text{Ca}=40,1\text{g/mol}$) (Drapeau and Nachshen, 1984; Zheng and Zhao, 2001; Kwik-Urbe et al., 2003).
- Le fonctionnement des astrocytes est affaibli, ce qui entraîne une élévation de la concentration extracellulaire du glutamate et abouti à une excitotoxicité.

1.4. La MEMRI et ses applications

1.4.1. Propriétés physiques du Mn

1.4.1.1 Histoire

Le manganèse est paramagnétique. Sa présence accélère le processus de relaxation en RMN. Cette propriété a été mise à profit très tôt en RMN, notamment par Connick et Poulson en 1959, pour mesurer la vitesse d'échange de l'eau entre l'intérieur et l'extérieur de la première sphère de coordination du Mn^{2+} (Connick and Poulson, 1959). Ces effets de relaxation interviennent dans l'interaction Mn^{2+} /macromolécules et ont ouvert la voie à des études RMN structurales (Mildvan and Cohn, 1963) et ont permis de mettre en place les concepts utilisés pour l'élaboration d'agents de contraste en imagerie. Lauterbur, pour sa part, a été le premier à utiliser le Mn^{2+} en imagerie ; il a montré que les effets de relaxation peuvent modifier l'intensité du signal (Lauterbur, 1973) ouvrant la voie à l'utilisation de produits de contrastes exogènes en IRM. Lin et Koretsky en 1997 sont les premiers à avoir mis en évidence l'emploi du Mn pour l'étude du SNC (cf. 1.4.3.2.) (Lin and Koretsky, 1997).

Les premières études IRM effectuées sur des patients atteints de manganisme (dans les années 90) montrent un rehaussement du contraste mettant en avant la cytoarchitecture cérébrale contrairement aux personnes n'ayant pas été exposées au Mn (**Figure 10**).

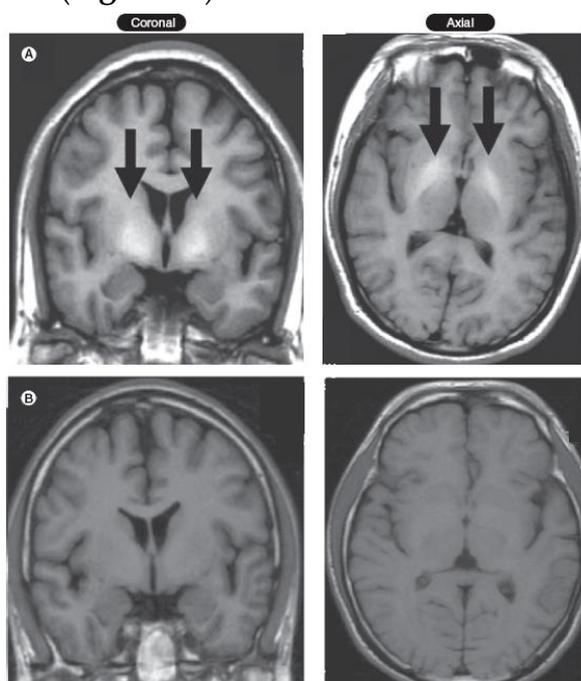


Figure 10 : IRM (1,5T) pondérée T1 chez des travailleurs exposés au Mn.

A. Les images IRM présentent une augmentation significative du signal pondéré T1 dans les ganglions de la base et dans le globus pallidus (flèche).

B. Patient non exposé au Mn (Bock and Silva, 2007).

1.4.1.2 Comparaison avec d'autres agents de contraste

Les propriétés intrinsèques des agents de contrastes basées sur les ions métalliques autres que le gadolinium (Gd^{3+}) tels que le Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} et Cu^{2+} , sont moins intéressantes. En effet, avec 7 électrons non appariés et un grand moment magnétique, le Gd^{3+} est un agent de contraste paramagnétique idéal pour l'IRM. Les autres ions métalliques ont moins d'électrons non appariés et un moment magnétique plus faible. Cependant le Gd^{3+} n'est pas un élément naturellement présent dans l'organisme et sa biochimie est mal connue. A l'inverse, le manganèse, le cuivre et le fer ont une biochimie bien établie (Barral, 2006).

1.4.2. Utilisation en clinique

Les métaux paramagnétiques utilisés en RMN doivent être chélatés ou complexés afin d'éviter toute accumulation toxique dans l'organisme. De ce fait, le Gd, couramment utilisé en clinique, est complexé (par exemple avec une molécule de DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid)). En imagerie clinique, le manganèse est utilisé comme agent de contraste sous une forme complexée diminuant ainsi fortement sa toxicité. Le Mn-DPDP, (aussi appelé manganese (II) N,N'-dipyridoxylethylenediamine-N,N'-diacetate-5,5'bis(phosphate); Mangafodipir ou Teslascan®) est un chélate d'un dérivé phosphate et d'un atome de Mn. Le Mn est capté préférentiellement par les parenchymes hépatique et pancréatique normaux ce qui permet d'atteindre un rehaussement du contraste entre le tissu anormal et normal. Il a été utilisé pour une étude clinique sur 40 patients pour détecter des tumeurs du foie (Hamm et al., 1992). Récemment, le Mn a été complexé à une porphyrine pour donner le complexe Mn^{3+} -Porphyrin, moins toxique, et qui se fixe à la membrane des cellules tumorales hépatiques de façon plus spécifique que le Gd-porphyrin (Zhang et al., 2009). Cependant, quelques doutes persistent sur la stabilité du complexe *in vivo*. En effet, après injection chez l'animal de Mn-DPDP ou Mn-DTPA, la distribution cérébrale du Mn reste élevée (Gallez et al., 1997, 1999).

Le manganèse complexé ne peut plus être internalisé par les neurones ou les astrocytes. C'est donc un challenge de découvrir de nouveaux agents, à base de Mn, ayant la capacité d'être perméable aux cellules. Lee et al. ont fabriqué une molécule basée sur le manganèse et la porphyrine : le Mn-(DPA-C₂)₂-TPPS₃ qui pénètre dans les cellules et est stocké dans les neurones hippocampiques pendant plusieurs jours (Lee et al., 2010). Ce produit a été conçu pour être sensible aux ions zinc. Le rehaussement du signal IRM avec cet agent de contraste est donc plus prononcé dans l'hippocampe, région riche en zinc (fibres moussues). De nouvelles molécules sont en

cours de synthèse pour la détection des tumeurs du foie, telles que des nanoparticules de Mn couplées à un oxyde de fer superparamagnétique (Mn-SPIO). Cet agent de contraste permet un changement de l'intensité du signal de l'ordre de 80% en 5 min et pourrait donc être utilisé pour détecter de petites lésions hépatiques (Lu et al., 2009).

Dans nos études, nous utilisons le Mn sous forme libre afin de préserver toutes ses propriétés physiques et biologiques.

1.4.3. IRM du manganèse (MEMRI)

Nous avons rappelé que le Mn^{2+} (sous la forme $MnCl_2$) a la capacité d'entrer dans les neurones via les canaux calciques, d'être transporté dans les neurones et est un ion paramagnétique. Ses propriétés en font un excellent agent de contraste.

La MEMRI est l'imagerie du manganèse en IRM ou « Manganese Enhanced Magnetic Resonance Imaging ». Elle permet essentiellement de :

- améliorer la visualisation de la cytoarchitecture cérébrale ;
- tracer des connexions spécifiques dans le cerveau ;
- visualiser l'activité neuronale.

1.4.4. Imagerie de la cytoarchitecture cérébrale

La MEMRI améliore le contraste de la cytoarchitecture cérébrale et pourrait permettre de mettre en évidence des différences entre un cerveau sain et malade. La MEMRI permet aussi d'améliorer le contraste pour les études chez les nouveaux nés, pour lesquels la résolution est souvent faible (Gillet et al., 2010). Toutes les études ont été réalisées sur des rongeurs ou primates non humains du fait de la neurotoxicité avérée du Mn^{2+} . Une étude de Aoki et al. illustre le potentiel de la MEMRI. Les auteurs ont administré une dose de 64 mM de $MnCl_2$ par la voie i.v. chez le rat (2 mL ; 1,8 mL/h). Après un délai de 24h, les animaux ont été imagés dans un IRM 11,7 T. Nous observons un fort rehaussement du contraste cérébral, notamment au niveau des différentes couches du bulbe olfactif, de la glande pituitaire, du cortex, de l'hippocampe, du cervelet, de l'amygdale, des ganglions de la base et de l'hypothalamus (**Figure 11**). De plus, le contraste est maximum 24h après l'injection (Aoki et al., 2004a). Il est alors possible de mettre en évidence les six différentes couches du cortex cérébral chez le rat (Aoki et al., 2004a).

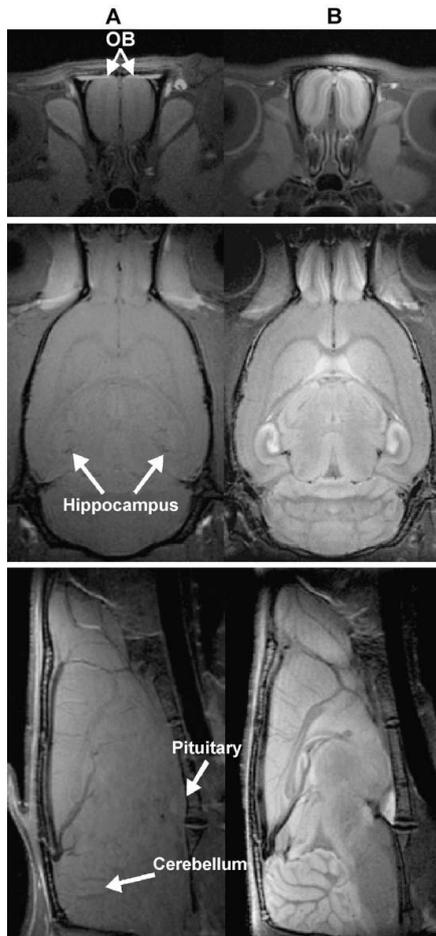


Figure 11 : Images IRM pondérées T1, après une injection systémique de $MnCl_2$.

IRM (11,7T) d'un animal contrôle (colonne A) vs animal injecté avec 64 mM $MnCl_2$ (colonne B). Des coupes coronales au niveau du bulbe olfactif sont présentées dans les images du haut. Les images du milieu montrent des coupes horizontales, incluant la formation hippocampique. Les images du bas représentent les coupes sagittales. Nous observons un rehaussement caractéristique principalement au niveau des bulbes olfactifs, des hippocampes, du cervelet et de la glande pituitaire (Aoki et al., 2004a).

1.4.4.3 Imagerie fonctionnelle

L'imagerie fonctionnelle par la MEMRI ou encore appelée « activity-induced manganese-dependant contrast » (AIM) permet de cartographier l'activité cérébrale reliée à la capture du Mn^{2+} par les neurones via les canaux calciques. En effet, comme les canaux voltage dépendant s'ouvrent pendant la dépolarisation neuronale, le Mn^{2+} s'accumule dans les cellules en activité. L'activation peut être cartographiée *in vivo* de façon indépendante du changement hémodynamique. Nous décrivons ci-dessous trois applications de cette technique :

(i) La première étude ayant démontrée la faisabilité de la MEMRI fonctionnelle a été effectuée par Lin et Koretsky (Lin and Koretsky, 1997). Nous savons que le manganèse s'accumule dans le cerveau et altère le temps de relaxation T1, ce qui peut être représentatif de l'influx calcique dans le cerveau. Pour tester cette idée, Lin et Koretsky ont injecté en continu du $MnCl_2$ (120mM, $3,6\mu\text{mol}/\text{min}$) par voie i.v. chez le rat tout en imageant l'animal en IRM. Une heure après l'injection de $MnCl_2$ et 10 min après rupture de la BHE du côté droit (injection de mannitol par la voie intracarotidienne), un rehaussement du contraste commence à être visible au niveau des

ventricules. Lorsque l'on ajoute du glutamate (0,2mL, 10 mg/mL) dans l'artère carotide droite, cela augmente le signal IRM dans le cerveau de 238% (**Figure 12**).

En effet, le glutamate induit l'influx calcique en pré et post synaptique. Dans la **Figure 12A**, nous observons peu de changement du contraste car il n'y a pas eu de glutamate. Par contre dans la **Figure 12B**, une augmentation du signal est visible uniquement du côté droit.

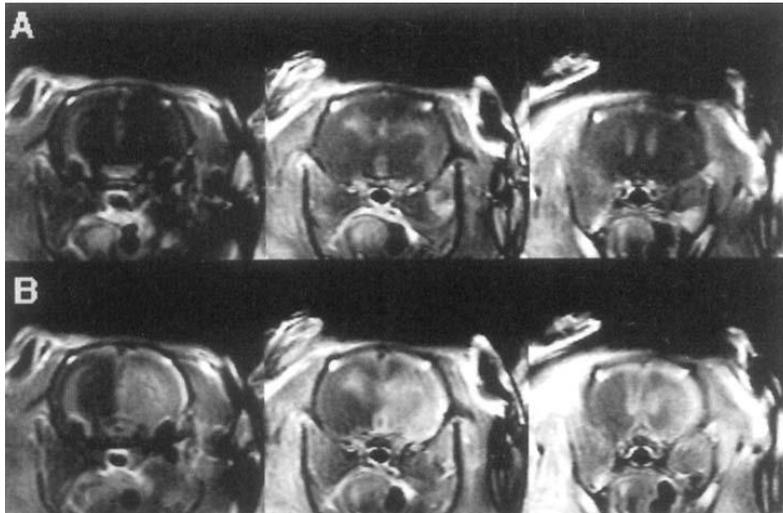


Figure 12: Effet de la stimulation au glutamate sur le contraste T1 après injection de $MnCl_2$ (IRM 4,7T).

A. Image coronale de cerveau de rat, 1h après infusion intraveineuse de Mn et 10 min après rupture de la BHE.

B. Image coronale de cerveau de rat, 1h après infusion intraveineuse de Mn, 10 min après rupture de la BHE et 24 min après l'injection de glutamate dans l'artère carotide droite. (Lin and Koretsky, 1997).

(ii) Van der Linden et al. ont souhaité mettre en évidence les structures jouant un rôle dans le contrôle du chant chez l'oiseau. Ils ont alors injecté du $MnCl_2$ (200nL, 80mM) dans le haut centre vocal (HVC pour high vocal center). Après l'injection, toujours sous anesthésie, l'oiseau est exposé à des enregistrements vocaux de la même espèce (30 min) dans le but d'améliorer l'activité neuronale du HVC et de ce fait, de faciliter l'entrée du Mn. L'imagerie cérébrale est réalisée de 2 à 6h après l'injection de $MnCl_2$. Ils ont observé plusieurs structures ayant un rehaussement de contraste : l'HVC (site d'injection), le noyau *robustus archistriatalis* (RA, connu pour jouer un rôle dans le chant chez l'oiseau) et une région inconnue X (**Figure 13**). Dans cette étude, la MEMRI a permis de mettre en évidence une nouvelle structure cérébrale jouant un rôle dans le chant chez l'oiseau (Van der Linden et al., 2002, 2004).

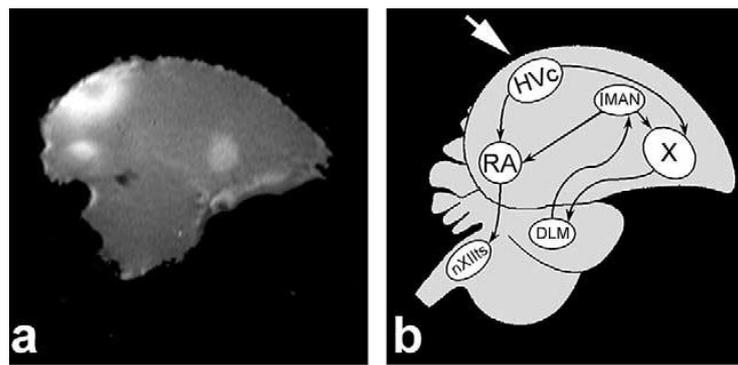


Figure 13 : MEMRI fonctionnelle : mise en évidence des structures jouant un rôle dans le chant chez l'oiseau.

a. MEMRI *in vivo*, coupe sagittale chez l'oiseau 6h après injection de $MnCl_2$ dans le HVC. Les zones où le signal est plus fort correspondent aux régions RA et X où le Mn c'est accumulé.

b. Schéma des structures jouant un rôle dans le chant chez l'oiseau (Van der Linden et al., 2002).

HVC : High vocal center; LMAN : Lateral magnocellular nucleus of the anterior neostriatum; DLM : dorsolateral nucleus of the medial thalamus; nXIIIts : *nucleus hypoglossus pars tracheosyringalis*

(iii) Chuang et al. ont voulu observer des glomérules spécifiques du BO de souris. Pour cela, ils ont utilisé des souris transgéniques (Tg) $r17 \rightarrow M71$, le récepteur $r17$ étant connu pour répondre aux odeurs d'octanal. Le récepteur M71 est remplacé par le $r17$ de rat qui co-exprime la GFP et la B-galactosidase. Les souris Tg reçoivent une injection de $MnCl_2$ ($7\mu L$ à 10 mM) par voie intra-nasale. Le BO est ensuite stimulé par de l'octanal odorant et les souris sont imagées. Nous pouvons observer spécifiquement les récepteurs $r17$ en MEMRI et en fluorescence (**Figure 14**). Par conséquent, la MEMRI permet de visualiser des structures très petites (Chuang et al., 2009).

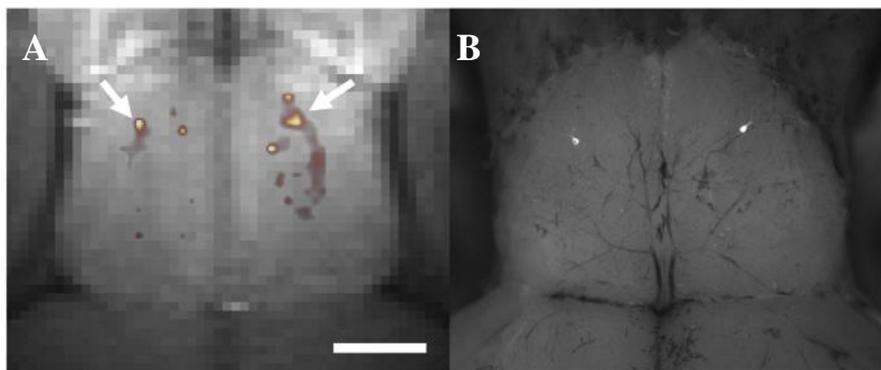


Figure 14 : Détection d'un seul glomérule, confirmé par les souris Tg $r17 \rightarrow M71$.

A. Coupe horizontale d'une image MEMRI des souris $r17 \rightarrow M71$ mettant en évidence le rehaussement de contraste.

B. Image à fluorescence du même animal montrant le marquage GFP des glomérules $r17 \rightarrow M71$. Deux glomérules sont observés (un dans chaque BO).

Barre d'échelle = 1mm (Chuang et al., 2009).

1.4.4.4 Traçages de réseaux neuronaux

Des études ont montré que la MEMRI est capable d'imager les connexions neuronales antérogades et rétrogrades après injection de Mn dans une structure particulière du cerveau. Les exemples ci-dessous illustrent bien cette utilisation particulière de la MEMRI :

(i) Les voies visuelles ont été étudiées par Watanabe et al. (Watanabe et al., 2001). 24h après injection de $MnCl_2$ (100 nL, 1 M) dans l'œil gauche de rat. La rétine gauche, le nerf optique ainsi que le chiasme optique sont « tracés » par le Mn en imagerie IRM (Figure 15).

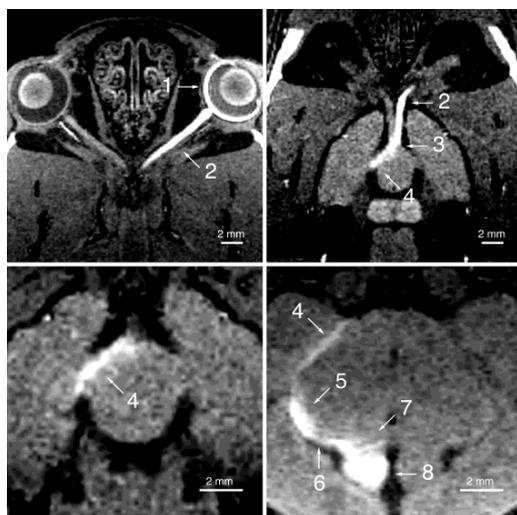


Figure 15 : Traçage de la voie visuelle par injection intra-orbitale de $MnCl_2$.

24h après l'injection, nous observons une augmentation du signal dans les voies visuelles : (1) rétine gauche, (2) nerf optique gauche, (3) chiasme optique, (4) tract optique droit, (5) noyau géniculé droit, (6) brachium droit du colliculus supérieur, (7) région prétectale droite et (8) colliculus supérieur droit (Watanabe et al., 2001).

(ii) Il est possible aussi de mettre en évidence un ralentissement du transport axonal par la MEMRI chez un modèle murin de la maladie d'Alzheimer ou un modèle animal du vieillissement. Suite à une injection de Mn dans le bulbe olfactif, les études MEMRI ont montré la diminution significative du transport axonal en fonction de l'âge des animaux (Smith et al., 2007; Minoshima and Cross, 2008; Kim et al., 2011; Bertrand et al., 2012). Une diminution du transport axonal chez des souris modèles de la maladie d'Alzheimer a aussi été montrée au niveau des circuits hippocampiques et du système visuel (Gallagher et al., 2012).

(iii) Serrano et al. montrent l'utilité de la MEMRI comme un index nommé MTI (manganese transfert index) évaluant la fonction neuronale (Serrano et al., 2008). Suite à une injection intra-nasale de $MnCl_2$ (4 μ L 0.77 g/mL), l'imagerie par IRM 24h après a permis d'étudier l'impact d'agents pharmacologiques tels que l'isoflurane et la mémantine (anesthésique). Le MTI correspond au rapport entre l'intensité du signal en post-synaptique (cortex olfactif) sur l'intensité du signal en pré-synaptique

(bulbe olfactif). Après traitement à l'isoflurane (atténue la libération de vésicules synaptiques) ou à la mémantine (atténue la capture de Ca^{2+} en post-synaptique, donc de Mn^{2+}) une diminution du MTI est observée montrant une diminution de la libération du Mn^{2+} en pré-synaptique. Ils ont aussi regardé si le changement du MTI pouvait être détecté chez différents modèles de souris Tg présentant des dysfonctions neuronales accompagnées ou non de neurodégénérescences. Leurs résultats montrent que les valeurs du MTI diminuent ou augmentent en réponse aux différences fonctionnelles telles que les changements anatomiques. Ces résultats montrent l'utilisation potentielle de la MEMRI comme un indicateur de dysfonctionnement neuronal.

(iv) Bonny et al. ont étudié les connections neuronales avec ou sans lésion de la moëlle épinière chez le rat (Bonny et al., 2008). Le MnCl_2 est injecté au niveau du site lésé ou non lésé (contrôle) dans la moëlle épinière (cervicale C6, 10 mM, 50 nL). 24h après, l'animal est euthanasié et la moëlle est récupérée et imagée. Leurs résultats montrent que l'imagerie du Mn *ex-vivo* peut permettre de caractériser une activité spécifique des couches de la moëlle. En effet, après une lésion partielle, il y a une forte réduction du signal lié au Mn dans la partie caudale du site d'injection et ce même signal est complètement éteint lors de lésion totale de la moëlle, montrant une diminution voire une abolition du transport du Mn le long de la moëlle épinière. Cette technique peut permettre de caractériser la gravité d'une lésion de la moëlle épinière.

Chapitre 2 - Objectifs

L'imagerie IRM est une technique utilisée dans un but clinique depuis 1979. Trois grandes applications de l'IRM sont effectuées à ce jour (non exhaustif). La première concerne l'IRM anatomique. Les recherches cliniques en neurosciences utilisant l'IRM ont permis de mettre en évidence des caractéristiques anatomiques cérébrales chez les patients atteints de maladies neurodégénératives. La deuxième application est l'IRM fonctionnelle, permettant de caractériser l'état général de fonctionnalité du cerveau. Le signal observé est basé sur la réponse hémodynamique liée à l'activité cérébrale (signal « blood oxygen level dependent », BOLD). La troisième application correspond à l'imagerie de diffusion (imagerie du tenseur de diffusion, « diffusion tensor imaging », DTI), qui permet d'observer les voies de connections cérébrales chez les sujets sains et pathologiques. Toutefois, aucune technique ne permet de mettre en avant la connectivité fonctionnelle cérébrale. De ce fait, le développement de l'imagerie MEMRI semble bienvenu. En effet, cette technique utilisée uniquement en pré-clinique chez l'animal, peut apporter des informations uniques sur les altérations du transport neuronal, un élément précoce du développement de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer mais aussi sur l'état fonctionnel du cerveau (Bertrand et al., 2012).

Cependant, la technique MEMRI assez récente, présente deux problèmes qui en limitent son utilisation :

- A doses élevées, le Mn^{2+} est toxique pour l'organisme et peut provoquer une atteinte grave du système nerveux central (manganisme). Les mécanismes de toxicité sous-jacents à cette exposition au Mn sont mal connus.

- Le mode de transport du manganèse dans l'approche MEMRI est mal connu. Il est donc nécessaire d'apporter des éléments de réponse à ces deux problèmes pour le développement et la meilleure compréhension de la technique MEMRI.

C'est suivant cet axe que les développements présentés dans cette thèse s'inscrivent. Pour cela, nous avons mis en œuvre différentes techniques à trois échelles différentes : tissulaire, cellulaire et moléculaire (**Tableau 5**).

Nous allons rapporter nos travaux sur l'étude de la distribution cellulaire du Mn au niveau de coupes d'hippocampe de rats par couplage de l'IRM et de la microscopie par fluorescence X synchrotron (Chapitre 3) et au niveau sub-cellulaire dans un modèle de cellules neuronales (lignée de neuroblastome N2A différenciées) et pour des cultures primaires de neurones hippocampiques (Chapitre 4). Nous nous intéresserons ensuite aux effets du Mn sur le métabolisme cérébral par une technique

de RMN-HRMAS du proton (Chapitre 5). Pour compléter ce travail, nous avons mis en œuvre l'imagerie MEMRI chez des souris KO MAP6 présentant des altérations de la taille de certains tracts pour évaluer un lien entre la connectivité anatomique et la connectivité fonctionnelle (Chapitre 6).

Chapitres	Injection du MnCl ₂	Quantité de Mn	Echelle	Techniques principales
3	Injection de Mn dans le gyrus denté de l'hippocampe droit de rat	10μL, 50mM	Tissulaire	IRM Synchrotron
4	Ajout du Mn dans le milieu de culture des cellules cancéreuses N2A et PC12 et de culture primaire de neurones hippocampiques (NH)	N2A : 0-2000 μM PC12 : 0-2000 μM HN : 0-150 μM	Cellulaire	Synchrotron Microscopie optique/fluorescence
5	Idem chapitre 3	Idem chapitre 3	Moléculaire	RMN-HRMAS
6	Injection de Mn dans le cortex somatosensoriel S1 de souris KO MAP6	60nL, 100mM	Organe	MEMRI

Tableau 5 : résumé des travaux effectués pendant la thèse.

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse a été effectué principalement au GIN et avec l'aide de différentes personnes dont je précise ici les rôles.

Les acquisitions IRM et les expérimentations animales (chirurgies, euthanasies) ont été effectuées en toute autonomie sur la plateforme IRM petit animal de Grenoble (UMS IRMAGE). Il en est de même pour la culture et l'entretien des lignées cellulaires PC12 et N2A.

Les acquisitions synchrotron (ESRF, Grenoble) ainsi que les reconstructions des images ont été réalisées en plusieurs campagnes d'analyses dépendantes de l'acceptation des projets de recherches que nous avons déposés pour accéder au synchrotron et j'ai été assistée pour ces mesures sur ce grand instrument par Sylvain Bohic (co-directeur de thèse). J'ai par la suite quantifié les métaux et analysé les résultats obtenus après imagerie synchrotron.

Les neurones hippocampiques ont été isolés par l'équipe 1 du GIN (Jacques Brocard, Mariano Bisbal et Nora Collomb). Je les ai par la suite mis en culture et préparés de

façon adéquate pour les analyses. Les marquages immuno-fluorescents (tubuline, actine) et les acquisitions d'images et de vidéo en microscopie ont été réalisés avec Yasmina Saoudi (équipe 1 du GIN) et avec Violaine Hubert que j'ai encadrée lors de son stage de M1.

Les études de microscopie électronique ont été menées par Karin Pernet-Gallay (plateforme de microscopie électronique, GIN).

Les mesures de la capacité de rétention calcique mitochondriale ont été le fruit d'une collaboration avec Cécile Batandier (LBFA, Grenoble) mais aussi du travail de deux stagiaires que j'ai encadré : Mathilde Maisonnette (M1) et Jennifer Carraud (BTS). L'étude du métabolisme par RMN-HRMAS a été entreprise en collaboration avec Florence Fauvelle (CRSSA, Grenoble), avec l'aide de Sandrine Ringal-Maunoir.

Pour finir, les travaux sur les souris KO MAP6 font parti d'une collaboration avec Jean-Christophe Deloulme (équipe 1 du GIN) avec l'aide de Véronique Coizet (équipe 8 du GIN), Sylvie Gory (équipe 1 du GIN) et Clément Debacker (équipe 5, GIN).

Chapitre 3 - Distribution du Mn dans l'hippocampe

3.1. INTRODUCTION	40
3.1.1. VISUALISATION DU MN	40
3.1.2. HIPPOCAMPE	44
3.2. MATERIELS ET METHODES	47
3.2.1. ANIMAUX	47
3.2.2. PREPARATION DU $MnCl_2$	47
3.2.3. CHIRURGIE ET INJECTION DU TRACEUR	47
3.2.4. IRM <i>IN VIVO</i>	49
3.2.5. ANALYSE DES DONNEES IRM	49
3.2.6. HISTOLOGIE ET IMAGERIE SYNCHROTRON	50
3.2.7. IMAGERIE PAR FLUORESCENCE X AU SYNCHROTRON	50
3.2.8. ANALYSES HISTOLOGIQUES	52
3.2.9. ANALYSES STATISTIQUES	52
3.3. RESULTATS	54
3.3.1. DISTRIBUTION DU MN DANS L'HIPPOCAMPE DE RAT APRES IMAGERIE MEMRI	54
3.3.2. CONCENTRATIONS DE MN DANS L'HIPPOCAMPE DETERMINEES PAR SYNCHROTRON ET IRM	56
3.3.3. DISTRIBUTION ET CONCENTRATION DU ZN, DU CA ET DU FE	57
3.4. DISCUSSION	60
3.4.1. CONCENTRATIONS DE MN DANS L'HIPPOCAMPE DETERMINEES PAR SYNCHROTRON ET IRM	60
3.4.2. DISTRIBUTION DU MN DANS L'HIPPOCAMPE DE RAT PAR IMAGERIE MEMRI ET SYNCHROTRON	62
3.4.3. COMPARAISON DES DEUX TECHNIQUES	63
3.4.4. IMPACT DU MN SUR L'HOMEOSTASIE DU CA, FE ET ZN DANS L'HIPPOCAMPE DE RAT ETUDIE PAR IMAGERIE SYNCHROTRON	64

- Daoust A., Barbier E. L. and Bohic S. **Manganese Enhance MRI in rat hippocampus: A correlative study with synchrotron X-Ray Microprobe.** *NeuroImage, in press.*
- Daoust A., Barbier E. L. and Bohic S. **Mn Distribution in rat hippocampus: Correlative use of Synchrotron X-Ray Microprobe and MEMRI.** ISMRM, 2011, Montréal (Canada).
- Daoust A., Barbier E. L. and Bohic S. **Distribution du Mn dans l'hippocampe de rat: couplage de l'imagerie IRM du manganèse (MEMRI) avec l'imagerie microsonde synchrotron.** RITS, 2011, Rennes (France).

3.1. Introduction

La MEMRI est de plus en plus utilisée, mais ses mécanismes de transport, de distribution et de toxicité cérébrale restent mal connus. A l'échelle cellulaire, une exposition au Mn induit une perturbation mitochondriale et une modification de l'homéostasie d'autres métaux tels que le $\text{Fe}^{2+/3+}$ et le Ca^{2+} (Drapeau and Nachshen, 1984; Kwik-Urbe et al., 2003; Fitsanakis et al., 2010). Les effets toxiques du Mn peuvent affecter les structures et les fonctions cérébrales étudiées. La question de la répartition tissulaire du Mn dans le cerveau suite à une injection de Mn a donc été étudiée (Aschner et al., 2007). De plus, quelques travaux ont été effectués pour déterminer la concentration moyenne de Mn dans le cerveau chez l'homme et l'animal (concentration physiologique ou après injection de Mn ou inhalation) (Bonilla et al., 1982; Tracqui et al., 1995; Yasui et al., 1995; Liu et al., 2000). A notre connaissance, la distribution du Mn à l'échelle cellulaire n'a pas encore été rapportée. Ci-dessous nous décrivons les différentes techniques permettant de visualiser et/ou quantifier le Mn :

3.1.1. Visualisation du Mn

- L'autoradiographie / comptage du ^{54}Mn

Les approches utilisant le ^{54}Mn radioactif sont nombreuses (Sloot and Gramsbergen, 1994; Gallez et al., 1997; Brenneman et al., 2000) (**Figure 16**). Cependant deux éléments limitent leurs utilisations :

- (i) La résolution spatiale de l'autoradiographie est limitée. Elle dépend de l'isotope utilisé et de la préparation de l'échantillon. Elle est généralement comprise entre 0,1 et 1 mm (Schmidt and Smith, 2005).
- (ii) Cette méthode ne donne pas d'information sur la concentration réelle de Mn. Cette technique nécessite l'injection du radiotracer par voie intra-veineuse ou intra-cérébrale, le résultat obtenu est exprimé en pourcentage de la dose injectée par g de tissu (comptage de radioactivité) ou en intensité du signal (autoradiographie). Ces résultats représentent la quantité de ^{54}Mn injecté s'étant accumulé dans les régions étudiées et non pas une quantité totale du Mn (radioactif et non radioactif).

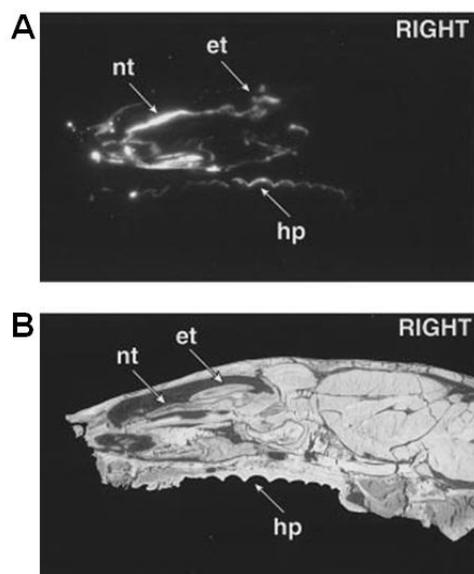


Figure 16 : Image d'autoradiographie du $^{54}\text{MnCl}_2$ inhalé.

Autoradiographique (A) et photo de la coupe de tissu correspondante (coupe sagittale, B) de la cavité nasale après inhalation de 0.277 mg $^{54}\text{MnCl}_2/\text{ml}$ (activité spécifique = 2.24 mCi/mg Mn). (d'après Brenneman et al., 2000).

nt : nasoturbinates, et : ethmoturbinates, hp : hard palate

- L'histologie

Les techniques d'histologie permettent de révéler certains métaux tels que le Fe, le Ca ou le Zn. La technique la plus connue est la coloration de Perls (marque les complexes insolubles contenant du Fe) qui utilise le bleu de Prusse ou le bleu de Turnbull pour mettre en évidence le Fer par précipitation. Pour le calcium, il est possible d'effectuer les colorations de Von Kossa qui transforment les sels de calcium en sels argentiques ou bien la coloration au Rouge Alizarin S qui chélate directement le calcium tissulaire et donne une coloration rouge. Pour finir, le Zn peut être mis en évidence par la méthode de Timm (Timm-staining) par un marquage au sulfure d'argent. Cependant, les techniques histologiques permettant de mettre en évidence le Mn sont rares sans doute du fait de la très faible quantité de Mn dans les tissus. Une technique utilisée est le marquage « périodate-tétrabase » décrit en 1946 par Feigel. Cette technique a été mise en application par Eggert et Hayden pour l'étude de l'absorption et l'accumulation du Mn dans la pomme après traitement des pommiers par une solution contenant du MnSO_4 (Eggert and Hayden, 1969). Cette technique semble sensible puisqu'elle peut détecter des spots de Mn de $0,001\mu\text{g}$ de Mn/spot ($0,02 \text{ nmol}$). Le périodate de potassium (KIO_4) chauffé en présence de MnO_2 donne un produit réagissant avec le tétrabase (tétrabase-4,4'-méthylènebis (N,N-diméthylaniline) pour former une coloration bleue.

Cependant, les techniques d'histologie sont semi-quantitatives et les produits utilisés sont très toxiques. De plus, la préparation de l'échantillon nécessite des rinçages pouvant déplacer l'ion Mn ce qui pose problème pour l'étude de la localisation du Mn à l'échelle cellulaire.

- La microscopie électronique

La microscopie électronique à transmission (MET) et la spectroscopie électronique permettent d'observer les métaux dans des structures très fines. Les images obtenues avec ces techniques ont une résolution inégalée, de l'ordre du nanomètre. Enfin, la préparation de l'échantillon est longue et demande une grande expertise. Cette méthode est quantitative (nombre d'atome par unité de surface).

Les techniques modernes de microscopie électronique sont la MET couplée à un spectromètre d'analyse X par dispersion d'énergie (scanning transmission electron microscopy with energy-dispersive X-ray ; STEM-EDX) ou filtrée en énergie (energy-filtered transmission electron microscopy ; EFTEM). Ces techniques fournissent également des informations sur la répartition des métaux au niveau ultrastructural (Bohic, et al., 2012). Leurs sensibilités sont cependant limitées pour détecter des éléments traces car la technique nécessite l'utilisation de coupes d'échantillons ultrafines (environ 30 nm) et la taille de la zone sondée est donc restreinte.

- La spectroscopie de masse des ions secondaires

nano-SIMS

Cette technique d'analyse physico-chimique est basée sur la détection des ions secondaires produits sous l'effet d'un bombardement d'ions primaires incidents et permet de sonder la surface de l'échantillon (~ quelques dizaines d'Angstrom). Les ions secondaires émis de la surface de l'échantillon sont analysés par un spectromètre de masse permettant ainsi une détermination de la répartition élémentaire ou isotopique sur cette surface. La préparation de l'échantillon biologique pour effectuer de la nano-spectrométrie de masse des ions secondaires (nano-secondary ion mass spectrometry ; nano-SIMS) est similaire à celle pour la microscopie électronique. Cette technique d'imagerie chimique est d'une haute sensibilité. Cependant, la quantification est difficile du fait de la forte variation du rendement d'ionisation qui dépend d'un grand nombre de paramètres (nature du substrat, effet de matrice...). Il n'y a pas d'analyse quantitative directe mais des informations quantitatives relatives peuvent être obtenues par comparaison des spectres ou en effectuant des rapports d'intensités.

ICP-MS

L'ICP-MS (Inductively coupled Plasma Mass Spectrometry) est une technique instrumentale d'analyse reposant sur la séparation, l'identification et la quantification des éléments constitutifs d'un échantillon en fonction de leur masse. Cette technique fournit des concentrations moyennes en éléments tels le Mn dans un homogénat de tissu. Par conséquent, l'ICP-MS ne donne pas d'information sur la

localisation spatiale du Mn. Sa limite de détection est cependant très basse, de l'ordre du ng/Kg.

LA-ICP-MS

L'ablation laser a été couplée à l'ICP-MS (laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry, LA-ICP-MS) ; cette technique d'analyse destructive consiste à focaliser (objectif de type Cassegrain) un rayon laser de longueur d'onde fixe (4 à 250 nm selon le type de laser) sur un échantillon non traité (coupe congélation fine de 20-30 microns d'épais de cerveau par exemple). Un plasma se forme dans la zone d'interaction laser - matière. Ce plasma vaporise, atomise puis ionise les éléments qui sont transformés en aérosol et sont transportés par l'intermédiaire d'un gaz porteur (généralement de l'argon) à un spectromètre de masse à torche à plasma (ICP) puis sont triés en fonction du rapport charge/masse. La quantification des éléments est effectuée en $\mu\text{g/g}$ ou ppm. La méthode est cependant très sensible à l'hétérogénéité des échantillons, ce qui conduit à des incertitudes importantes sur les quantifications. Des interférences spectrales peuvent aussi intervenir et contribuer à ces incertitudes. Un exemple d'image obtenue avec cette technique est donné dans la (Figure 17).

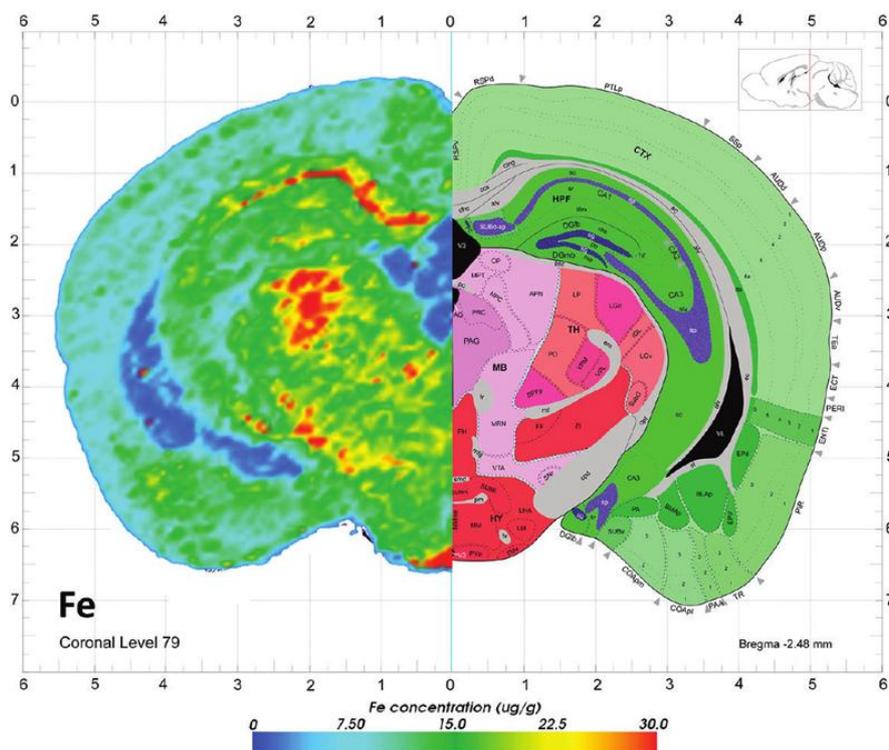


Figure 17 : Distribution du Fe dans le cerveau de souris par LA-ICP-MS.
La carte du Fe (gauche) est recalée sur un atlas stéréotaxique (droite). D'après (Hare et al., 2012).

PIXE

Cette technique d'analyse par faisceau d'ions PIXE pour Particle Induced X-ray Emission est basée sur l'ionisation des couches internes K, L ou M de l'atome cible par la particule chargée (souvent des protons de quelques MeV) et sur la détection du rayonnement X produit par le réarrangement électronique (fluorescence X) (c.f. **Annexe synchrotron**). Il est ainsi possible d'obtenir des informations sur la composition élémentaire de l'échantillon. Des microsondes PIXE ont été développées et permettent de cartographier la distribution des éléments composants un échantillon. Les analyses sont effectuées sous vide et les limites de détection sont de l'ordre du $\mu\text{g/g}$ ou ppm. Cette technique nécessite un accélérateur de particules et si toutefois elle reste plus accessible que le synchrotron, l'accès est limité. Les limites de détection sont moins basse qu'avec l'utilisation du synchrotron, dont l'analyse, dans l'air, rend plus commode l'étude de coupes entières de cerveau déposées sur des lames de micro-dissection laser. Les quantités de manganèse étant très faibles dans les tissus, la sensibilité du synchrotron semblait plus appropriée.

- L'imagerie synchrotron

Ce type d'imagerie (Synchrotron-based X-ray fluorescence ; SR-XRF) est l'une des seules pouvant à la fois effectuer une cartographie du Mn total dans le tissu (ainsi que d'autres éléments) avec une résolution de quelques microns ou même sub-microns (100nm), quantifier en ppm le Mn dans le tissu sec et préserver l'intégrité de ce même tissu. C'est pourquoi nous avons utilisé cette technique dans nos études décrites dans les chapitres 3 et 4 (**voir le principe en Annexe**).

-L'IRM

L'IRM permet de détecter de façon indirecte les métaux dans un organisme *in vivo*. La présence d'un métal au voisinage des protons de l'eau affecte le signal collecté en RMN permettant ainsi la détection de la présence du métal. Il est possible de détecter le fer, le gadolinium ou encore le Mn (**voir le principe en Annexe**).

3.1.2. Hippocampe

Suite à une injection par voie systémique, le Mn s'accumule dans certaines structures cérébrales et plus particulièrement dans les hippocampes, comme décrit par Mok et al. (Mok et al., 2011). Dans cette étude, nous nous intéressons à l'accumulation et à la distribution cellulaire du Mn dans les hippocampes. Tout d'abord, voici quelques rappels d'anatomie hippocampique.

L'hippocampe est une structure cérébrale appartenant au système limbique. Ses fonctions sont essentiellement attribuées à la mémoire et à la localisation dans l'espace. C'est aussi un des rares lieux de neurogenèse cérébrale, permettant le renouvellement des cellules nerveuses (environ 9000 cellules nouvelles par jour dans le GD de rat). En coupe coronale, nous observons les deux hippocampes situés sous le cortex (néocortex), symétriques l'un par rapport à l'autre. Chaque hippocampe est composé de deux structures en forme de U inversé : le gyrus denté (GD) et la corne d'Ammon (décrit par Ramon y Cajal en 1934). La corne d'Ammon (CA) est elle-même subdivisée en 3 parties : CA3, CA2 et CA1 (**Figure 18**).

Les circuits de l'hippocampe sont composés de projections commençant au niveau du cortex enthorinal, projetant sur le gyrus denté composé de cellules granulaire. Les prolongements des cellules granulaires, appelés fibres moussues, partent du GD et projettent leur axones jusqu'aux cellules pyramidales du CA3 qui sont ensuite relayées par celles du CA2 et CA1 (collatérale de Schaffer). Le subiculum et le CA1 sont directement connectés avec le cortex enthorinal et, de ce fait, le système forme une boucle composée de sous parties hippocampiques, excepté le GD qui donne également lieu à des projections extrinsèques.

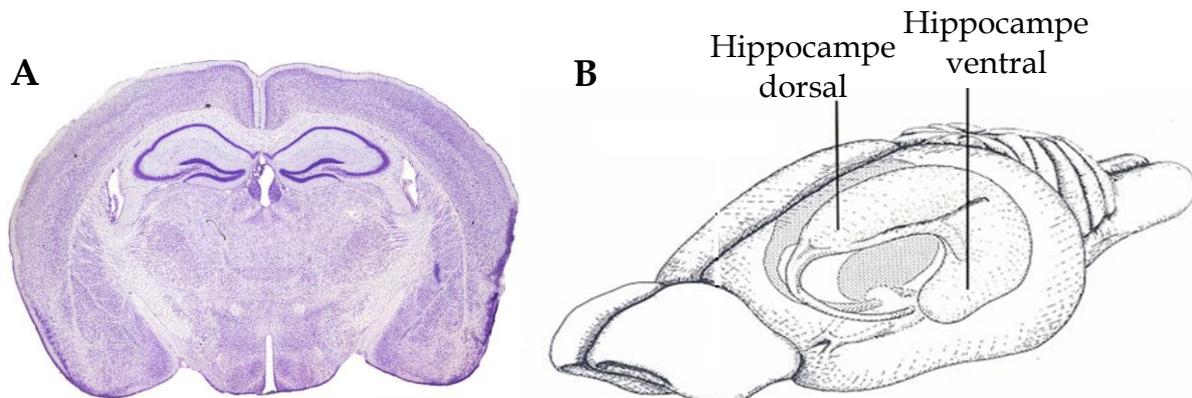


Figure 18 : Anatomie de l'hippocampe

A. Coupe coronale de cerveau de rat au niveau des hippocampes dorsaux. Coloration de Nissl (Paxinos and Watson, 2004). Barre d'échelle = 2mm.

B. Perspective en 3D sagittal d'un cerveau de rat. La forme des hippocampes est caractéristique.

Le collatéral de Schaffer correspond à la zone de rencontre entre les dendrites du CA1 et les axones du CA3. Les terminaisons des dendrites du CA1 arrivent au niveau de la fissure hippocampique (anatomiquement localisée au même endroit que le collatéral de Schaffer) (**Figure 19**). Outre les diverses connections, l'hippocampe est composé de différentes couches cellulaires appelées aussi *stratum* (Ishizuka et al.,

1995). Le *stratum pyramidal* contient les corps cellulaires des cellules pyramidales de la CA et les *stratum radiatum* et *moleculare*. Dans le CA3, une couche supplémentaire est reconnue : le *stratum lucidum*, composé des fibres moussues des cellules granulaires. Au niveau du gyrus denté on observe trois couches cellulaires :

- couche granulaire (*stratum granulosum*) contient les corps cellulaires des cellules granulaires ;
- couche moléculaire (*stratum moleculare*) formée par les dendrites apicales des cellules granulaires et leurs afférences ;
- couche polymorphique (ou hilus) formée par la naissance des fibres moussues, ainsi que par quelques cellules en corbeille.

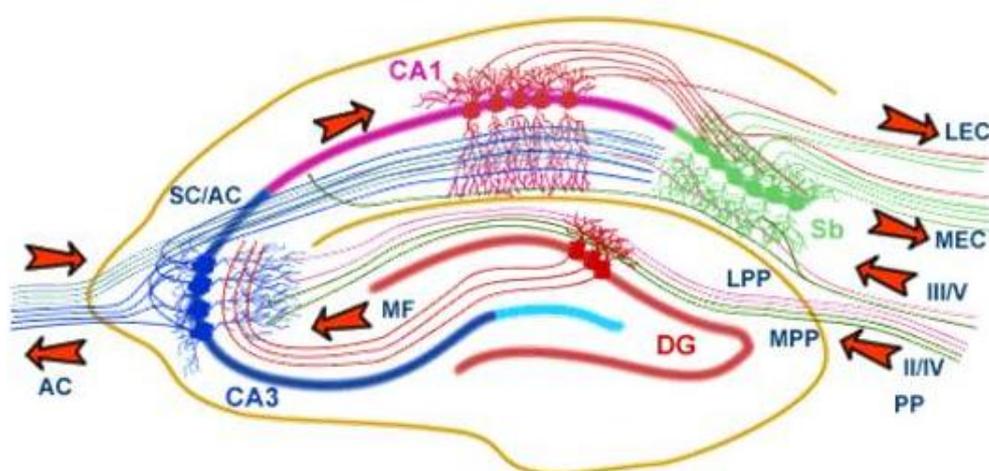


Figure 19 : Schéma du réseau hippocampique (coupe coronale, hippocampe gauche de cerveau de rongeur).

L'hippocampe forme un réseau unidirectionnel dont l'entrée est le cortex enthorinal (EC) qui forme des connexions avec le gyrus denté (DG) et les neurones pyramidaux du CA3 via la voie perforante (PP) (divisée en latéral et médial). Les neurones du CA3 reçoivent les fibres moussues (MF) venant du gyrus denté. Ils envoient leurs axones au niveau des cellules pyramidales de la CA1 via le collatéral de Shaffer (SC) tout comme le font les axones des cellules de la CA1 au niveau de l'hippocampe controlatéral via la commissure associative (AC). Les neurones du CA1 reçoivent aussi une entrée directement de la PP et projettent leurs axones dans le subiculum (Sb). Ces neurones vont à leur tour se projeter dans le cortex enthorinal (output) pour former une boucle (Brinton, 2009).

Dans cette étude, nous utilisons la technique d'imagerie synchrotron (X-ray fluorescence microprobe ou SR-XRF) afin de cartographier *ex vivo* la distribution du Mn et des autres éléments dans l'hippocampe dorsal de rat. Les données sont comparées aux images *in vivo* MEMRI pour évaluer l'influence possible de la voie d'injection sur la distribution du Mn. Les voies systémique (intra-péritonéale) et locale (intra-hippocampique) ont été étudiées.

3.2. Matériels et Méthodes

3.2.1. Animaux

Au total, 23 rates femelles, de souche Sprague-Dawley, (230 ± 11 g, Charles Rivers, France) ont été utilisées. Toutes les expériences ont été effectuées sous anesthésie générale avec un mélange d'isoflurane (IsoFlo, Axience, France) et d'air (induction : 5% dans air, maintien : 2% dans air enrichi en O₂ à 40%). La température rectale a été monitorée et maintenue à environ 37°C à l'aide d'une couverture chauffante.

Pour des raisons d'éthique et donc de bien être animal, le comportement des rats (inspection visuelle de la démarche, du pelage, du nez et des yeux) a été surveillé. En cas de souffrance, l'animal aurait été immédiatement euthanasié selon les méthodes conventionnelles. Aucun de ces points limites n'a été atteint pour les doses de MnCl₂ utilisées dans ce protocole.

3.2.2. Préparation du MnCl₂

Deux solutions de MnCl₂ à 100 mM et 50 mM dans de l'eau distillée ont été préparées (MnCl₂·4H₂O, M1787, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Comme chaque mole de MnCl₂ correspond à 3 Osm, une concentration de 100 mM est nécessaire pour avoir une osmolarité physiologique. La solution à 50 mM dans l'eau étant hypotonique, l'osmolarité de la solution a été ajustée aux valeurs physiologiques (300 mOsm/L) par ajout de 400 mM de bicine (B3876, Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) et le pH des deux solutions a été ajusté à 7,3 par ajout de NaOH 1M. Pour finir, les solutions ont été stérilisées par filtration sur membrane (0,2 µm de diamètre).

Les doses de MnCl₂ ont été choisies à partir de plusieurs articles dont celui de Silva et al. qui décrit la DL50 (doses létales induisant 50% de mort des animaux) et les doses couramment utilisées pour la MEMRI chez les rats (de 54 à 175 mg/kg de MnCl₂ en iv) (Silva et al., 2004).

3.2.3. Chirurgie et injection du traceur

Deux types d'injection ont été effectués :

- Injection par voie intra-péritonéale (ip), les rats ont reçu une injection ip d'une solution de MnCl₂ à 100 mM, 30 mg/kg (n = 5) ou d'une solution contrôle de sérum physiologique (n = 5).

- Injection par voie intra-cérébrale de 10 µL d'une solution de MnCl₂ à 50 mM (n = 5) ou d'une solution contrôle de sérum physiologique (n = 5).

L'animal a été placé en décubitus ventral sur la table du cadre stéréotaxique. Il a été immobilisé et calé grâce à deux barres d'oreilles logées dans le méat auditif et à une barre d'incisives pour le maintien de la mâchoire et pour véhiculer l'anesthésie gazeuse. Une anesthésie locale a été effectuée au site d'incision par application cutanée de Xylocaïne pure (Vétoquinol, France). Une incision allant de la région frontale à la région occipitale a été réalisée, exposant les sutures coronales, sagittales et transversales. La surface crânienne osseuse a soigneusement été ruginée et asséchée. Les coordonnées d'implantation de la seringue Hamilton (32 gauges) dans le GD de l'hippocampe droit du rat ont été déterminées à partir de l'atlas de Paxinos & Watson 2004 : AP -3,2 mm, ML 1,2 mm et DV -3,6 mm (**Figure 20**). Le trou de trépanation, localisé selon les coordonnées stéréotaxiques à partir du bregma, a été effectué à l'aide d'une aiguille (25 gauge), sans endommager le cerveau. Les méninges ont ensuite été percées à l'aide de cette même aiguille. La seringue Hamilton a été reliée à un pousse-seringue permettant de délivrer la solution de $\text{MnCl}_2 + 4\text{H}_2\text{O}$ (50 mmol/L ; 10 μL) ou de NaCl à un débit constant de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Ce débit assez faible permet de limiter les dommages mécaniques et biologiques portés aux tissus cérébraux. A la fin de l'injection, la seringue a été laissée en place pendant 10 min puis retirée lentement afin d'éviter des fuites de la solution injectée le long du trajet de l'aiguille. La plaie du rat a ensuite été suturée à l'aide de fil stérile et le champ opératoire a été désinfecté avec de la Vétadine (Vétoquinol, France). Pour contrôler la précision spatiale de l'injection IC, trois animaux supplémentaires ont reçus 3 μL d'encre de chine à la place de la solution de MnCl_2 puis ont été euthanasiés directement après l'injection pour des analyses histologiques.

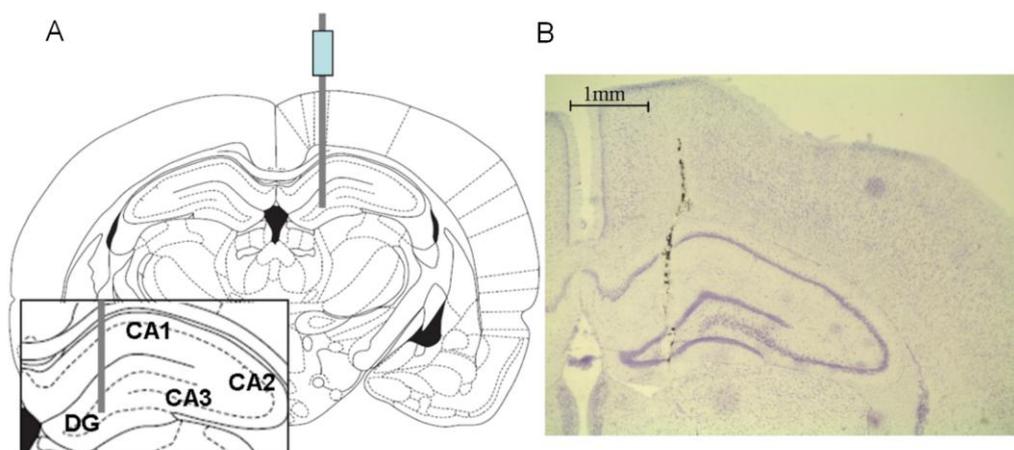


Figure 20 : Localisation de l'injection intra-cérébrale de Mn

A. Représentation du site d'injection, au niveau de l'hippocampe droit de rat, sur un atlas stéréotaxique (Paxinos and Watson, 2004).

B. Section histologique après injection d'encre de chine (noir) au niveau du site d'injection du Mn (afin de contrôler l'injection) et marquage au crésyl violet.

3.2.4. IRM *in vivo*

L'imagerie IRM a été réalisée 24h après l'administration de l'agent de contraste. Les animaux ont été placés en décubitus ventral sur un berceau spécialement conçu pour l'IRM petit animal et calé par un système de contention (barres d'oreilles, mousses et barre d'incisives) permettant un positionnement stable de la tête de l'animal (limite les mouvements liés à la respiration). La température et la fréquence respiratoire ont été monitorées pendant les acquisitions. Les expériences ont été effectuées sur un IRM horizontal 7T (Avance III, Bruker, Ettlingen, Germany). Une antenne volumique linéaire a été placée et fixée au centre de l'aimant permettant l'émission radiofréquence et une antenne de surface a été placée sur la tête de l'animal permettant la réception du signal. Un système de guidage laser permet de centrer la tête du rat à l'isocentre de l'aimant (là où le champ magnétique est le plus homogène). L'antenne volumique a été accordée à la fréquence de Larmor. Cette action est réalisée par variation des capacités des condensateurs de la bobine. Une fois ce paramètre réglé, une séquence « Tripilot » a été utilisée afin d'imager dans les trois directions spatiales (transversale, sagittale et coronale) la position de l'animal. Cette première séquence est précédée par une phase de réglage automatique de la machine (mesure de la fréquence de Larmor, détermination des gains à l'émission et à la réception). Cette séquence permet de savoir si la tête de l'animal est correctement positionnée, et le cas échéant, de repositionner les champs de vue de l'IRM ou l'animal.

Des images pondérées T1 ont été obtenues (TurboRare 3D, TR = 300 ms, TE = 12 ms, matrice 128 x 128 x 64, FOV = 16 x 16 x 32 mm, taille d'un voxel = 0,125 x 0,125 x 0,5 mm). Le temps d'acquisition était de 14 min par rat. Des cartes T1 à une résolution spatiale plus faible ont été obtenues en utilisant une approche de saturation-récupération (Spin-Echo, 18 TR dans l'intervalle [30-3750] ms, TE = 7,8 ms, matrice 128 x 128, FOV=28 x 28 mm, épaisseur des coupes = 1 mm et taille des voxels = 0,22 x 0,22 mm). Le temps d'acquisition était de 17 min par rat.

L'IRM terminé, l'animal a été replacé dans sa cage en salle de réveil.

3.2.5. Analyse des données IRM

Les données IRM ont été analysées en utilisant un logiciel développé par l'équipe dans l'environnement Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA), appelé UVASC, permettant, dans notre cas, de tracer les régions d'intérêts. Les cartes T1 ont été obtenues par ajustement des données de saturation-récupération (fonction monoexponentielle à deux paramètres) en utilisant un algorithme d'ajustement non linéaire.

Les valeurs de T1 ont été converties en concentration de Mn comme décrit par (Silva et al., 2004) utilisant une relaxivité r_1 pour le Mn de $6,7 \text{ mMol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

4 régions d'intérêts (ROI) ont été tracées manuellement (**Figure 21**) :

Bruit de fond, CA3/GD, CA1/2 et FH.

Le rapport du signal sur bruit ou « signal to noise ratio » (SNR) a été calculé pour les régions CA3/GD, CA1/2 et dans la FH. Le contraste MEMRI pour une ROI a été obtenu en calculant la différence des mesures SNR avec et sans Mn.

3.2.6. Histologie et imagerie synchrotron

Après l'IRM, tous les animaux ont été euthanasiés par injection intra-cardiaque d'une dose létale de pentobarbital (250mg/kg, Doléthal, Vétoquinol, France). Le cerveau a été rapidement prélevé et congelé à $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ dans de l'isopentane (2-méthylbutane), puis stocké à -80°C . Des coupes adjacentes (10 et $20 \mu\text{m}$ d'épaisseur) de l'hippocampe dorsal ont été obtenues à l'aide d'un cryostat (Microm Cryo-Star HM560 Cryostat). Les sections de $10 \mu\text{m}$ d'épaisseur ont été collectées sur des lames de verres gélatinées dédiées aux marquages immunohistologiques. Les coupes de $20 \mu\text{m}$ d'épaisseur ont été montées sur des lames de micro-dissection (MMI Molecular Machines and Industries, Zurich, Switzerland) et stockées à température ambiante dans un environnement sec avant les analyses au synchrotron. Cette préparation ne nécessite aucun rinçage et est donc appropriée à l'analyse du Mn.

3.2.7. Imagerie par fluorescence X au synchrotron

Les expériences ont été réalisées au « European Synchrotron Radiation Facility » (ESRF) de Grenoble sur les stations ID22 et ID18F (Bohic et al., 2012). L'énergie des rayons X a été fixée à $14,4 \text{ KeV}$ en utilisant un monochromateur double cristal Si (111) ($\Delta E/E \approx 10^{-4}$). Le faisceau de haute intensité de rayons X arrivant sur l'échantillon provoque l'émission de photons de fluorescence X caractéristiques de chaque élément. Cette analyse est multi-élémentaire et induit peu de dommages sur le tissu. Le faisceau de rayons X incident est focalisé à une taille de spot de $5 \times 15 \mu\text{m}^2$ (verticale x horizontale). Le système optique permettant la focalisation est composé de deux miroir (courbure elliptique) en configuration de type Kirkpatrick-Baez (KB). Le temps d'intégration que nous avons utilisé était de 7 s/pixel sur ID18F et 1 s/pixel sur ID22. Les images des éléments ont ensuite été normalisées par l'intensité du flux incident. Le spectre de fluorescence X a été évalué avec le logiciel PyMca qui permet de calculer la concentration des éléments à l'intérieur d'un échantillon à partir du spectre de fluorescence X enregistré (Sole et al., 2007). Un échantillon de référence de foie de bœuf SRM1577b (national institute of standards and technology, NIST,

Gaithersburg, MD) a été utilisé pour calibrer les paramètres de l'expérience. Les concentrations du P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn et Mn ont été calculées en fonction de l'épaisseur de la coupe de tissu de 20 μm supposant une densité de la matrice de 1 g/cm^3 . Les coupes de tissus de rat satisfont aux critères de « tissu fin » et ne nécessitent donc pas de correction de matrice. Les cartes des éléments effectuées au synchrotron ont été alignées de façon manuelle sur un atlas stéréotaxique de cerveau de rat (Paxinos and Watson, 2004).

Du fait des contraintes de temps et d'accès à ce type de station expérimentale (5-6 similaires dans le monde capable de délivrer le flux de rayons X désiré) et de la longue durée des mesures (environ 7h/échantillon ou plus), seule une partie des animaux imagés en IRM a été analysée en synchrotron ; de plus nous nous sommes limités à deux types de champs de vue (FOV) : un large FOV recouvrant l'hippocampe entier et un FOV réduit centré sur la zone GD/CA3. Les concentrations, exprimées en ppm ($\mu\text{g}/\text{g}$ de masse sèche), ont été mesurées sur deux zones tracées manuellement : le GD/CA3 et la fissure hippocampique comme montré dans la **Figure 21**. La concentration en mM a été dérivée de la concentration en $\mu\text{g}/\text{g}$ tissu sec (ppm), en supposant une densité de matrice égale à celle de l'eau. Le soufre a été utilisé comme élément représentatif du taux de protéines du tissu (de Jonge et al., 2010). Toutes les concentrations ont donc été normalisées par celle du S afin de prendre en compte les variations d'épaisseur de coupe ou de quantité de protéines entre échantillons (de Jonge et al., 2010). Le nombre d'échantillons par éléments quantifiés au synchrotron est mentionné dans les résultats correspondants.

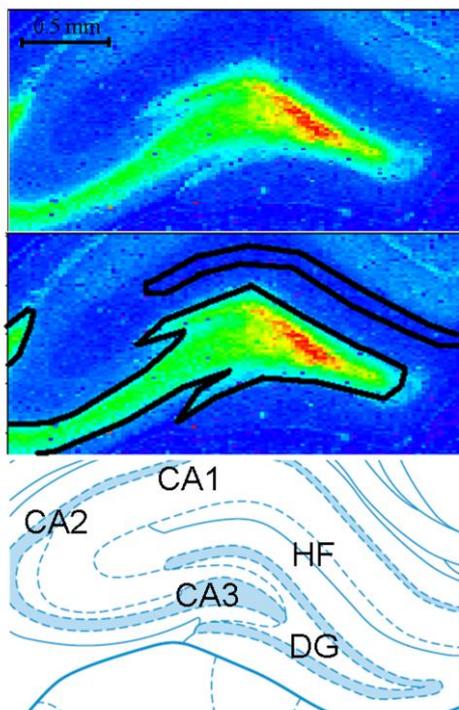


Figure 21 : Régions d'intérêt en imagerie synchrotron.

Les lignes noires correspondent aux ROI tracées manuellement : le GD/CA3 et la fissure hippocampique (FH) sur les cartes de distribution du Zn. Ces cartes sont utilisées comme référence anatomique. La correspondance avec l'atlas est représentée dans l'image du bas.

 Plus la couleur tend vers le rouge et plus le métal est concentré.

3.2.8. Analyses histologiques

Les sections adjacentes à celles analysées au synchrotron ont été utilisées pour les marquages d'immunofluorescence.

Les coupes de cerveau ont été décongelées, séchées à température ambiante puis cerclées avec un stylo hydrophobe. Elles ont ensuite été fixées au paraformaldéhyde à 4% (PFA) pendant 15 min. Trois lavages successifs par un tampon phosphate (PBS) + Tween 0,1% (PBST) ont été suivis par une incubation d'une nuit à 4°C dans une solution de blocage (bovine serum albumine (BSA) 3 %, tween 0,1 % dans du PBS 1X) contenant deux anticorps (Ac) primaires :

- anti-NeuN de souris (Ac monoclonal IgG1 dirigé contre les noyaux neuronaux, 1 mg/ml, Chemicon International) dilué à 1:1000.
- anti-GFAP de lapin (Ac polyclonal IgG dirigé contre la protéine acide fibrillaire gliale ou glial fibrillary acidic protein, Dako) dilué à 1:1000.

La GFAP est une protéine membranaire spécifiquement exprimée par les astrocytes et NeuN est une protéine nucléaire neuronale.

Après trois lavages au PBST, les coupes ont été incubées dans l'obscurité pendant 60 min à température ambiante dans la solution de blocage contenant les anticorps secondaires :

- Alexa 488 dirigé contre la souris (Alexa Fluor® 488 donkey, IgG (H+L), Molecular Probes, Invitrogen) dilué à 1:500.
- TRITC dirigé contre le lapin (TRITC-conjugated IgG (H+L) monkey, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) dilué à 1:500 pour une concentration de travail de 4 µg/mL.

Après trois lavages au PBST, les coupes sur lames ont été montées sous lamelles avec une solution de Hoechst (33258, 10 µg/mL), permettant de marquer les noyaux cellulaires et du milieu « Fluor guard », spécifique pour la conservation de la fluorescence (Scytek, Logan, USA).

3.2.9. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés comme suit : moyenne \pm déviation standard (DS). Les comparaisons suivantes ont été effectuées :

- Le contraste MEMRI entre les animaux IC et IP a été comparé en utilisant un test T non apparié.
- Les concentrations des éléments entre les animaux contrôles, IC et IP ont été comparées utilisant un test T non apparié.

Pour évaluer si la concentration du Mn étudiée par synchrotron est un facteur de prédiction du SNR de la MEMRI, le coefficient de corrélation de Pearson a été calculé.

Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

3.3. Résultats

3.3.1. Distribution du Mn dans l'hippocampe de rat après imagerie MEMRI

Vingt-quatre heures après l'injection IP de $MnCl_2$, les images IRM révèlent un excellent contraste mettant en avant la cytoarchitecture des régions cérébrales telles que l'hippocampe (GD/CA3 et CA1/2), la glande pituitaire, le cervelet et les bulbes olfactifs (BO), comme précédemment décrit dans la littérature (Aoki et al., 2004a) (Figure 22).

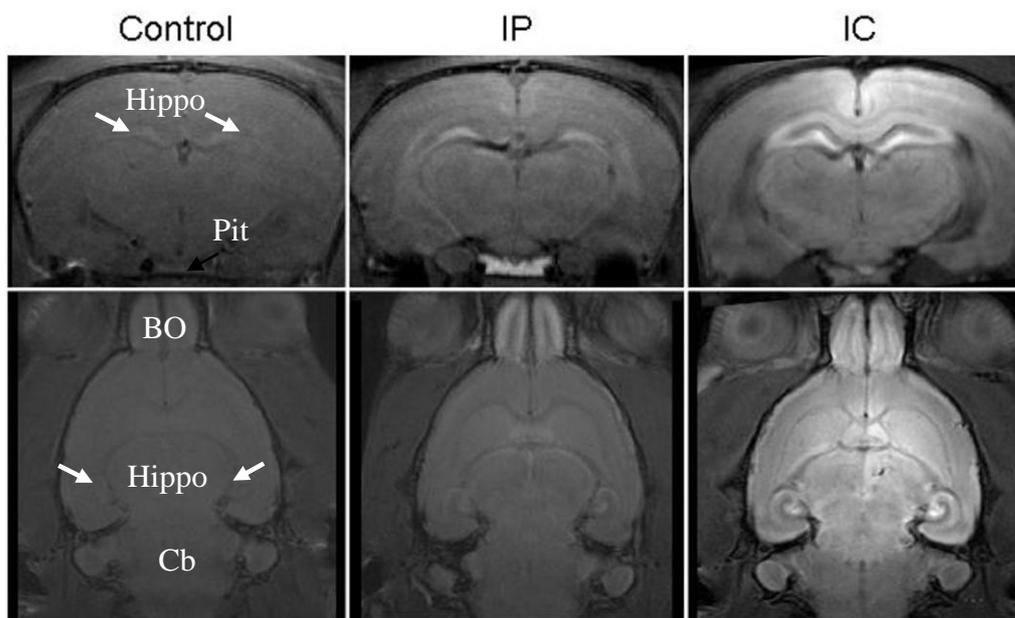


Figure 22 : Images MEMRI de rat

Images MEMRI coronales (haut) et sagittales (bas) d'hippocampe de rat 24h après l'injection de Mn : contrôle, IP ($MnCl_2$, 30 mg/Kg) et IC ($MnCl_2$, 10 μ L, 50 mM). Nous observons une augmentation du contraste après injection de Mn dans certaines structures cérébrales et principalement dans l'hippocampe. Ce contraste est renforcé après injection IC de Mn. BO : bulbe olfactif, Hippo : hippocampe, Cb : cervelet.

L'injection IC du Mn dans le GD droit augmente le contraste IRM dans le cerveau et particulièrement dans les hippocampes (Watanabe et al., 2004). Les contrastes MEMRI dans l'hippocampe, observés 24h après l'injection du $MnCl_2$, sont de $11,1 \pm 3,8$ dans les GD/CA3 ; $9,5 \pm 2,4$ dans les CA1/2, et $6,9 \pm 2,1$ dans la FH après l'injection IC de Mn et de $6,0 \pm 2,1$ dans les GD/CA3 ; $5,0 \pm 1,8$ dans les CA1/2, et $4,0 \pm 1,6$ dans la FH après injection IP de Mn. De plus, la variabilité du contraste MEMRI est en dessous de 20% pour toutes les aires et les voies d'injections étudiées, suggérant une bonne reproductibilité (Figure 23).

Après injection IP, le SNR est significativement augmenté dans toutes les régions d'intérêts (+81% dans les GD/CA3, +69% dans les CA1/2 et +56% dans la FH). Le SNR augmente d'avantage après une injection IC (+242% dans les GD/CA3, +204% dans les CA1/2 et +157% dans la FH). Dans l'ensemble, le plus grand contraste est observé dans la région du GD/CA3, et pour les deux voies d'injections (IP et IC).

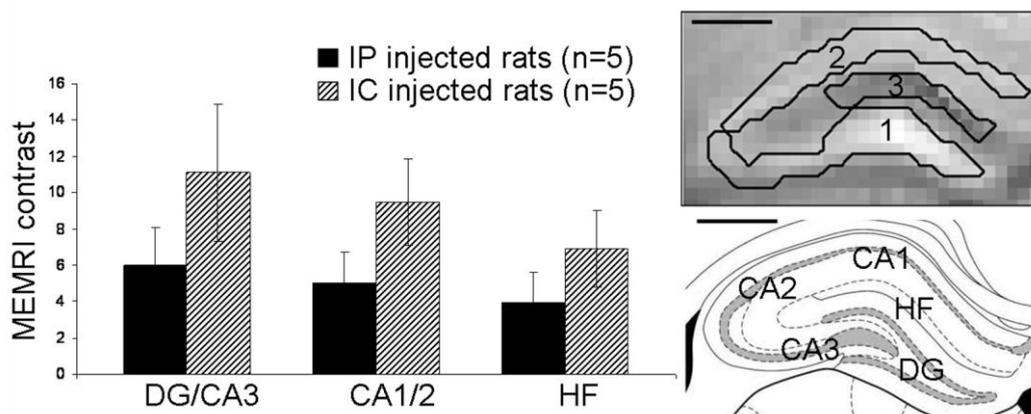


Figure 23 : Contrastes MEMRI dans l'hippocampe de rat pour les groupes contrôles, IP et IC.

Différences de SNR entre animaux injectés et contrôles (contraste MEMRI) dans les ROI représentées dans les images de droites : GD/CA3, CA1/2 et HF (moyenne \pm ET). Barre d'échelle = 1 mm.

Les images MEMRI obtenues chez les animaux contrôles, IP et IC et les cartes correspondantes obtenues au synchrotron du Mn, Ca, Zn et Fe sont représentées (**Figure 25**). Dans le groupe contrôle, le signal synchrotron du Mn est à peine observable et est principalement localisé dans la région du GD (**Figure 25**). La présence de Cr et Ni associés à d'intenses concentrations ponctuelles de Mn permet de les affecter à des contaminants, provenant vraisemblablement de la procédure de coupe des tissus (lames de rasoir acier). Une légère augmentation du signal du Mn est observée dans l'hippocampe 24h après injection IP. Des concentrations relativement importantes de Mn sont observées le long des fibres moussues de l'hilus jusqu'au CA3 contrairement aux animaux injectés en IP. La région DG/CA3 présente la plus forte concentration en Mn. En revanche, après injection IC, le Mn est à nouveau détecté dans le GD/CA3 mais se retrouve en très grande proportion dans la FH. La région du GD/CA3 est principalement composée de corps cellulaires neuronaux alors que la FH est composée d'astrocytes (**Figure 24**). Notons que l'injection IC de Mn mène à une hyper-densité du marquage GFAP au niveau de l'hilus du GD et dans la FH.

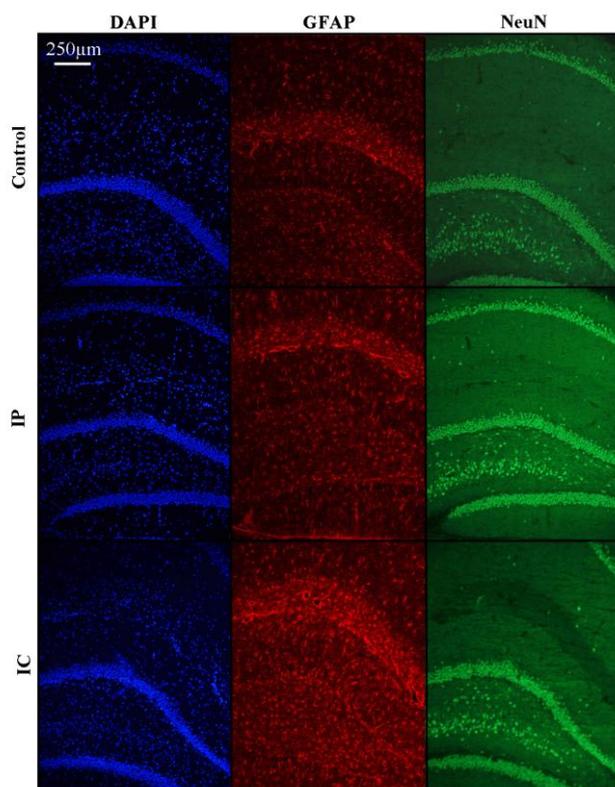


Figure 24 : Composition cellulaire de l'hippocampe

Immunofluorescence de l'hippocampe controlatéral de rat (épaisseur de coupe : 10 μ m), 24h après les injections de Mn dans les différentes conditions : contrôle, IP (MnCl₂, 30 mg/Kg) et IC (MnCl₂, 10 μ L, 50m M). Les noyaux ont été marqués avec du DAPI (bleu), les astrocytes avec la GFAP (rouge) et les neurones avec NeuN (vert). Nous observons que le GD et le CA3 sont essentiellement composés de corps cellulaires neuronaux alors que la FH est composée d'astrocytes. Après l'injection IC, nous observons une hyper densité de la GFAP au niveau du hilus et de la FH.

Dans l'ensemble, 24h après les injections de Mn (aussi bien en IP qu'en IC), les images synchrotron suggèrent une localisation du Mn à l'intérieur de l'hilus (couche cellulaire polymorphe) et le long des axones des cellules granulaires du GD (fibres moussues) jusqu'aux cellules pyramidales du *stratum lucidum*. La forte concentration du Mn dans la FH pour les animaux IC semble être localisée au niveau des astrocytes. Tous ces résultats sont en accord avec les observations d'Aoki et al. (Aoki et al., 2004a). Cependant, malgré la bonne résolution spatiale et la sensibilité de la technique synchrotron d'imagerie par fluorescence X, il est difficile de conclure si le Mn se distribue aussi bien dans les neurones que le long des axones connectant entre elles les différentes sous-structures de l'hippocampe ou s'il cible et s'accumule dans un type cellulaire particulier.

3.3.2. Concentrations de Mn dans l'hippocampe déterminées par synchrotron et IRM

La concentration de Mn dans les GD/CA3 est estimée par imagerie synchrotron à $2,5 \pm 1,6 \mu\text{g/g}$ (0,046 mM) pour le groupe contrôle, $5,0 \pm 2,4 \mu\text{g/g}$ (0,091 mM) pour le groupe IP et $25,1 \pm 9,2 \mu\text{g/g}$ (0,458 mM) pour le groupe IC. Une très forte concentration en Mn de $105,0 \pm 28,3 \mu\text{g/g}$ (1,913 mM) est trouvée dans la FH pour le groupe IC alors qu'elle est comprise entre $2,0 \pm 0,9$ et $3,0 \pm 2,7 \mu\text{g/g}$ (0,036-0,055 mM) pour les contrôles et le groupe IP respectivement (Tableau 6 et Tableau 7).

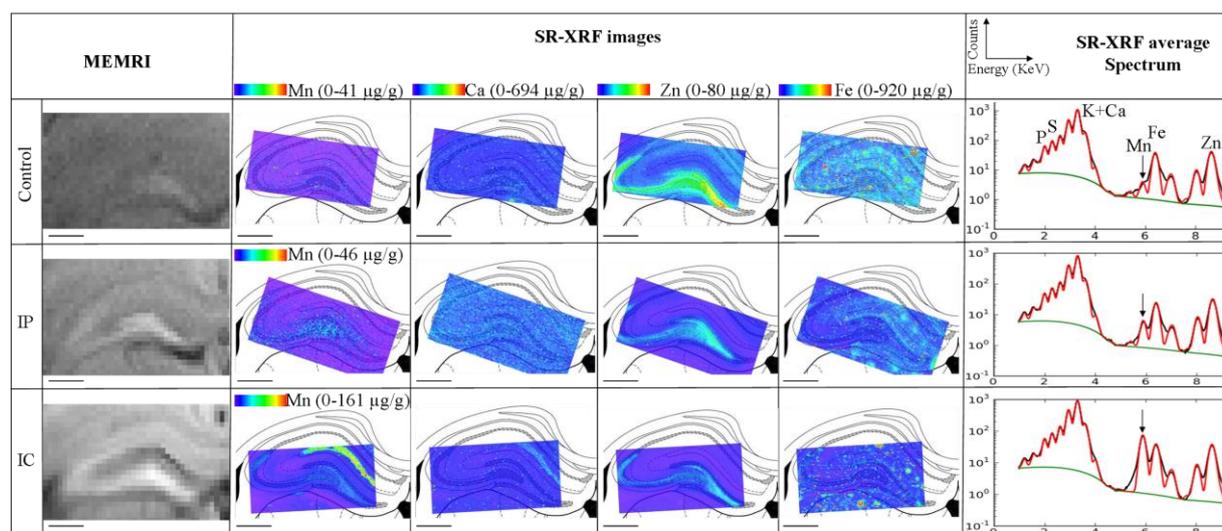


Figure 25 : Cartes de la distribution de métaux dans l'hippocampe obtenues par imagerie synchrotron.

Distribution des éléments en deux dimensions pour le manganèse, calcium, zinc et fer dans l'hippocampe controlatéral, 24h après injection du $MnCl_2$: contrôle, IP ($MnCl_2$, 30 mg/Kg) et IC ($MnCl_2$, 10 μ L, 50 mM). Les cartes synchrotron sont réalignées sur un atlas stéréotaxique (Paxinos and Watson, 2004). L'échelle de couleur est en microgramme d'élément par gramme de tissu sec pour chaque élément. Une barre de couleur est représentée pour chaque carte du Mn dans les différentes conditions d'injection. Les images MEMRI correspondantes sont représentées dans le tableau à gauche. La normalisation de la somme des spectres du GD/CA3 est représentée dans la droite du tableau, et les flèches montrent l'évolution des pics de Mn en fonction du type d'injection. Nous observons une augmentation de l'intensité du Mn dans les GD/CA3 qui dépend de la voie d'injection et un très fort taux de Mn le long de la FH après injection IC. L'intensité du Zn et du Fe est diminuée (dépend du type d'injection) et aucun changement n'est observé pour le Ca.

En utilisant les cartes T1 obtenues en IRM, une forte concentration de Mn est trouvée dans le côté ipsilatéral à l'injection au niveau du GD/CA3 (ipsi : $0,55 \pm 0,06$ mM ; contro : $0,30 \pm 0,10$ mM). La même chose est observée pour la région du CA1/2 (ipsi : $0,55 \pm 0,01$ mM ; contro : $0,35 \pm 0,13$). Concernant la FH, les concentrations de Mn sont de $0,48 \pm 0,01$ mM du côté injecté et de $0,37 \pm 0,14$ mM du côté controlatéral. Pour les rats contrôles, il y a une faible concentration de Mn dans toutes les régions : $0,03 \pm 0,01$ mM dans les GD/CA3 ; $0,03 \pm 0,01$ mM dans les CA1/2 et $0,03 \pm 0,01$ mM dans la FH pour les deux hémisphères.

3.3.3. Distribution et concentration du Zn, du Ca et du Fe

Sur la **Figure 25**, on voit que la distribution du Zn correspond au parcours des fibres moussues qui projettent des cellules granulaires à l'hilus et au CA3, et ce en accord avec la littérature (Haug, 1967). La carte du Fe montre d'intenses tâches ponctuelles qui peuvent être dues à des contaminations lors des coupes du cerveau (lames du

cryostat en acier) mais aussi au sang résiduel (les animaux n'ont pas été perfusés). Si nous excluons ces artefacts, la distribution du Fe correspond aux corps cellulaires du GD et de la corne d'Ammon. La distribution du Ca est diffuse et faible. Les concentrations de Zn ($46,9 \pm 4,4 \mu\text{g/g}$) et de Fe ($23,8 \pm 5,9 \mu\text{g/g}$) chez les animaux IP sont plus faibles que chez les animaux contrôles ($55,0 \pm 8,6 \mu\text{g/g}$ et $36,4 \pm 13,7 \mu\text{g/g}$, respectivement) dans la région du GD/CA3 (**Tableau 6**). L'injection IP de MnCl_2 ne modifie par contre pas les concentrations des éléments étudiés dans la FH (**Tableau 7**). Après injection IC de MnCl_2 , les concentrations de Zn ($40,5 \pm 4,6 \mu\text{g/g}$) et de Fe ($20,6 \pm 1,9 \mu\text{g/g}$) dans le GD/CA3 sont également plus faibles chez les animaux contrôles (**Tableau 7**). Dans la FH, la variabilité des résultats est plus forte probablement à cause du faible nombre d'échantillons. La concentration des autres éléments dans la FH ne varie pas après injection IC. Seule le Fe affiche une tendance à la baisse, mais non significative.

Métaux dans les CA3/DG	Contrôles ($\mu\text{g/g}$) (n=3)	IP (n=6)	IC (n=4)
P	6203,7 \pm 743,2	6023,0 \pm 326,3	6018,8 \pm 337,6
K	5599,9 \pm 520,9	5720,5 \pm 364,9	5078,4 \pm 78,1##
Ca	163,4 \pm 104,1	189,7 \pm 60,4	200,6 \pm 41,2
Fe	36,4 \pm 13,7	23,8 \pm 5,9*	20,6 \pm 1,9*
Cu	2,9 \pm 0,4	3,4 \pm 0,7	3,4 \pm 0,8
Zn	55,0 \pm 8,6	46,9 \pm 4,4*	40,5 \pm 4,6*
Mn	2,5 \pm 1,6	5,0 \pm 2,4	25,1 \pm 9,2**###

Tableau 6 : Concentrations du P, K, Ca, Fe, Cu, Zn et Mn dans la région du GD/CA3 controlatérale, obtenues par imagerie synchrotron.

Les concentrations sont exprimées en μg d'élément par g de tissu sec pour chaque voie d'injection du Mn (contrôle, IP et IC). n=nombre d'échantillons analysés par condition. IP et IC vs Contrôles : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. IC vs IP : ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$. (moyenne \pm DS).

Métaux dans la HF	Contrôles (µg/g) (n=3)	IP (n=3)	IC (n=2)
P	5870,0 ± 575,4	5771,0 ± 154,7	5692,0 ± 208,2
K	5545,0 ± 380,2	5556,0 ± 195,3	4949,7 ± 133,5
Ca	147,0 ± 102,4	130,5 ± 62,2	221,7 ± 19,3
Fe	30,2 ± 7,5	23,5 ± 4,0	25,3 ± 2,5
Cu	3,5 ± 0,7	3,9 ± 0,4	3,9 ± 0,1
Zn	17,3 ± 2,9	17,3 ± 1,7	15,4 ± 1,2
Mn	2,0 ± 0,9	3,0 ± 2,7	105,0 ± 28,3**##

Tableau 7 : Concentrations du P, K, Ca, Fe, Cu, Zn et Mn dans la FH controlatérale, obtenues par imagerie synchrotron.

Les concentrations sont exprimées en µg d'élément par g de tissu sec pour chaque voie d'injection du Mn (contrôle, IP et IC). n=nombre d'échantillons analysés par condition. IC vs Contrôles : ** p<0,01. IC vs IP : ## p < 0,01. (moyenne ± DS).

3.4. Discussion

Dans cette étude, nous précisons la distribution hippocampique du Mn après administration par les voies intra-péritonéale (IP) et intra-cérébrale (IC) en utilisant une combinaison unique de deux techniques d'imagerie : l'IRM et le synchrotron. Après injection IP, la distribution du Mn total dans l'hippocampe déterminée par synchrotron est en accord avec l'augmentation du signal observé en IRM pondérée T1. Après l'injection IC, nous observons (avec l'imagerie synchrotron) que les astrocytes situés dans la FH stockent de façon massive le Mn alors que cette zone correspond à un signal hypo-intense en IRM. Pour les deux voies d'injection, l'imagerie synchrotron indique aussi que le Mn a un effet négatif sur les concentrations de Zn et de Fe dans l'hippocampe, dans nos conditions expérimentales.

3.4.1. Concentrations de Mn dans l'hippocampe déterminées par synchrotron et IRM

Le manganèse est un élément essentiel fortement régulé et trouvé à de faibles doses dans les tissus tels ceux du système nerveux central (Aschner and Dorman, 2006). Bonilla et al. reportent une concentration de Mn comprise entre 1 et 4,2 $\mu\text{g/g}$ de tissu sec pour les hippocampes humains (Bonilla et al., 1982). Dans l'hippocampe de rat, les concentrations physiologiques de Mn sont estimées par synchrotron à $2,5 \pm 1,6$ $\mu\text{g/g}$ de tissu sec dans les GD/CA3 et à $2,0 \pm 0,9$ $\mu\text{g/g}$ de tissu sec dans la FH. Les valeurs expérimentales de la concentration de Mn dans l'hippocampe de rat sont rares. Kemp et Dansher reportent des concentrations de Mn de 3,8 $\mu\text{g/g}$ de tissu sec dans une coupe de tissu hippocampique non fixé de 1 mm d'épaisseur, en utilisant la spectroscopie d'émission de particule induites par rayon-X (Kemp and Dansher, 1979). Les mesures par ICP-MS sur des homogénats d'hippocampe montrent une teneur en Mn comprise entre 0,6 et 0,8 $\mu\text{g/g}$ de tissu hydraté (Tarohda et al., 2005; Bock et al., 2008b). Ces valeurs peuvent être converties en poids de tissu sec en supposant que le contenu en eau du tissu cérébral est de 80% (Barbier et al., 2005). Ce calcul conduit à des concentrations comprises entre 3 et 4,2 $\mu\text{g/g}$ de tissu sec. Ces mesures, obtenues sur les hippocampes entiers sont en accord avec nos résultats au niveau des régions GD/CA3 et FH.

Après injection de Mn, l'IRM et le synchrotron montrent une augmentation de la concentration de Mn dans l'hippocampe. D'un point de vue quantitatif, une bonne corrélation est obtenue entre l'augmentation du SNR (imagerie IRM pondérée T1) et

les concentrations de Mn déterminées par synchrotron dans la région du GD/CA3 ($r^2 = 0,93$; $p < 0,002$; **Figure 26**).

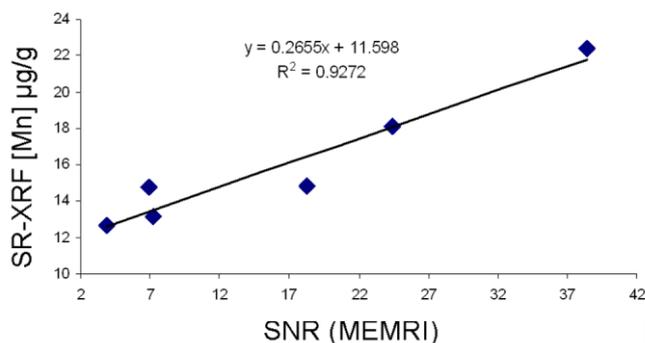


Figure 26 : SNR (MEMRI) en fonction de la concentration de Mn déterminée par imagerie synchrotron (SR-XRF).

Chaque point représente un animal. La droite représente un ajustement linéaire aux données.

L'injection IP induit une augmentation de la concentration de Mn dans les GD/CA3 (SNR: +81%, [Mn] = $5,0 \pm 2,4$ µg/g). La concentration de Mn est d'avantage augmentée après injection IC (SNR: +242%, [Mn] = $25,1 \pm 9,2$ µg/g). Bock *et al.* ont mesuré la concentration de Mn par ICP-MS dans des homogénats d'hippocampes de rat après injection intra-veineuse de $MnCl_2$ (30 mg/kg, 40 mM) (Bock *et al.*, 2008a). Ils rapportent une concentration de Mn de $1,8 \pm 0,3$ µg/g de tissu frais qui correspond approximativement à $9,0 \pm 1,5$ µg/g de tissu sec, en accord avec nos données obtenues après une injection IP (30 mg/kg, 100 mM). Bien que la MEMRI soit une méthode unique pour le suivi longitudinal en imagerie *in vivo* des connexions fonctionnelles et neuronales (voir pour revue Koretsky & Silva 2004), une injection intra-cérébrale est requise. Nous avons observé la distribution spatiale du Mn associée à sa concentration après injection intra-hippocampique de $MnCl_2$. L'observation d'une augmentation de 52 fois la concentration de Mn dans la FH n'a jamais été reportée. Cependant, après un examen attentif des images MEMRI, cette augmentation détectée par synchrotron correspond à un hyposignal en imagerie IRM pondérée T1. Cela peut être dû à une réduction du T2 liée à la forte concentration de Mn : la séquence pondérée T1 utilisée dans cette étude a un temps d'écho de 12 ms et est par conséquent sensible à la réduction du T2. L'utilisation des cartes T1, dans le but de quantifier les concentrations de Mn dans la FH, donne des valeurs pour le Mn comprises entre 0,26 et 1,20 mM dans la FH en utilisant une valeur théorique de relaxivité du Mn de $6,7mMol^{-1}.s^{-1}$. L'incertitude sur la valeur de la relaxivité du Mn dans les tissus (Silva *et al.*, 2004) peut expliquer ce large intervalle de concentrations en Mn. Les valeurs IRM restent comparables à celles déterminées par imagerie synchrotron : 105,0 µg/g de tissu sec après injection IC (c'est-à-dire 1,91 mM). Récemment, Schmitt *et al.* ont montré le transport unidirectionnel de l'ion Mn du

sang vers le LCR à travers les plexus choroïdes, reliant l'exposition systémique au Mn avec l'accumulation et la propagation du Mn dans le cerveau (Schmitt et al., 2011). Le travail présenté ici montre, de façon quantitative, que la prise de Mn dans les hippocampes, bien que supérieure aux valeurs physiologiques, reste dans des concentrations basses (de l'ordre d'une dizaine de ppm) et indique une haute sensibilité de la MEMRI. Les ions Mn^{2+} , connus pour entrer dans les cellules neuronales, peuvent se retrouver sequestrés dans les compartiments intracellulaires et se lier aux protéines. Ce comportement peut contribuer à l'augmentation de la relaxivité du Mn intracellulaires (Nordhøy et al., 2003; chapitre 5) et ainsi à augmenter la sensibilité de l'IRM au Mn dans le cerveau.

3.4.2. Distribution du Mn dans l'hippocampe de rat par imagerie MEMRI et synchrotron

D'un point de vue spatial, les deux techniques présentent une distribution du Mn dans l'hippocampe comparable, et ce malgré la très faible résolution spatiale de l'IRM. Après injection IP, les images synchrotrons montrent une distribution diffuse du Mn dans l'hilus du GD et suit les projections axonales (fibres moussues) jusqu'au CA3. Cette distribution du Mn est identique à celle du Zn détectée par synchrotron. Notons que les ions Zn^{2+} dans l'hippocampe sont essentiellement localisées dans les vésicules synaptiques des fibres moussues qui projettent sur le GD (Frederickson, 1989). Après injection IP, le niveau de Mn est plus fort dans les GD/CA3 que dans la FH. De plus, il semblerait y avoir une diminution du gradient de concentration du GD vers le CA3. Cela est en accord avec l'arrivée du Mn via les ventricules (Aoki et al., 2004a) puisque le GD est localisé à côté du troisième ventricule dorsal. Après injection IC, le Mn diffuse à travers l'interstitium et est donc disponible pour un grand nombre de structures hippocampiques. Les régions du GD et CA1 sont séparées par les cellules GFAP positives qui occupent la FH où les vaisseaux sanguins pénètrent dans l'hippocampe (Sievers et al., 1992). Ceci explique la forte concentration de Mn retrouvée dans la FH comparée à celles des autres régions telles que les GD/CA3 mais aussi avec les capacités précédemment décrites des astrocytes à accumuler le Mn dans le but de détoxifier le cerveau (Vezér et al., 2007). De plus, nous avons mis en évidence une hyper-densité du marquage GFAP (astroglie) dans la FH après injection IC de Mn ainsi que dans l'hilus du GD, comme rapporté précédemment (Vezér et al., 2007). S'il permet le rehaussement de la cytoarchitecture cérébrale, le Mn peut compromettre l'utilisation de la MEMRI pour l'imagerie des voies de connections cérébrales et pour l'imagerie fonctionnelle. Il est important de souligner le fait que, dans nos conditions expérimentales, les concentrations de Mn

ne sont pas suffisantes pour induire une mort neuronale, mais peuvent perturber le métabolisme cellulaire.

3.4.3. Comparaison des deux techniques

Il y a quelques limitations dans la comparaison des résultats entre les deux techniques utilisées dans cette étude. Avec l'IRM, les changements de concentrations de Mn ont été dérivés des signaux pondérés T1. Ces changements ne sont pas linéairement reliés à la concentration de Mn (effets T2 notamment) et dépendent de la relaxivité du Mn dans les tissus, relaxivité qui n'est pas clairement déterminée (Silva et al., 2004). En effet, la relaxivité peut être affectée par la forme moléculaire du Mn dans les tissus ce qui rend difficile la quantification du Mn dans les tissus. A l'inverse, l'émission de fluorescence X peut être considérée comme variant linéairement avec le nombre d'atomes analysés, les effets d'auto-absorption et d'émission secondaire étant négligées dans le cas des sections de tissus très minces comme utilisées dans cette étude (Janssens et al., 2000). De plus, l'IRM est sensible aux seuls ions Mn^{2+} et Mn^{3+} (Silva et al., 2004; Sotak et al., 2008) alors que l'imagerie synchrotron met en évidence le Mn total. Les signaux IRM ont été collectés *in vivo* à partir de coupes de tissu de 1mm d'épaisseur alors que les signaux synchrotrons ont été obtenus *post mortem* à partir de coupes congelées puis séchées de seulement 20 μm d'épaisseur. Le large volume analysé en IRM explique aussi, pour partie, la très bonne sensibilité de la MEMRI.

La reproductibilité des deux techniques est aussi différente. La variabilité du contraste des images pondérées T1 24h après injection de Mn est entre 13 et 20% pour les 3 régions hippocampiques, suggérant une bonne reproductibilité du protocole MEMRI. Concernant la technique synchrotron, les concentrations de Mn varient de 27 à 90%. Cette large variation peut être due à différents facteurs expérimentaux. Premièrement, nous supposons une densité et une épaisseur constante pour le tissu cérébral, alors que cette masse peut varier localement. En effet, les coupes sont déshydratées, l'épaisseur de ces dernières peut donc varier. Toutefois, les coupes ont toutes été préparées et analysées dans les mêmes conditions, les mesures relatives effectuées dans ce travail peuvent donc être comparées. Deuxièmement, le faible nombre d'animaux analysés avec le synchrotron, contribue fortement à ces larges variations. Cependant, étant donné la grande sensibilité et spécificité des mesures synchrotron, ainsi que les contraintes pratiques pour l'accès au synchrotron, le nombre d'échantillon moyen pour une étude est compris entre 1 et 5 sections de tissu par groupe.

3.4.4. Impact du Mn sur l'homéostasie du Ca, Fe et Zn dans l'hippocampe de rat étudié par imagerie synchrotron

Le manganèse est connu pour avoir une forte affinité avec le Ca, Fe et Zn (Aschner and Dorman, 2006; Aschner et al., 2006b). C'est un analogue du Ca qui entre dans les cellules via les canaux calciques voltage dépendant (Narita et al., 1990). Ce cation Ca^{2+} est indispensable à l'activité électrique cérébrale. Récemment, Eschenko et al. ont montré que l'administration systémique de MnCl_2 en MEMRI n'a pas de conséquences sur le comportement des rats et sur l'électrophysiologie/histopathologie de leur cerveau (Eschenko et al., 2010). Cette conclusion est confirmée par nos résultats montrant que le taux total de Ca (Ca lié) n'a pas été modifié ni par l'injection IP ni par l'IC. Toutefois il faut garder à l'esprit que le synchrotron donne la quantité totale de Ca à un moment précis (24h ici) et il n'exclut donc pas de possibles modifications locales et/ou transitoires de la concentration de Ca^{2+} libre que ne peut refléter les mesures synchrotron mais qui est plus facilement suivie à l'aide de sondes calciques fluorescentes. Comme mentionné ci-dessus, la distribution du Mn suit celle du Zn, un « marqueur » des fibres moussues (Nairismägi et al., 2006). Une forte expression du transporteur 3 du Zn (Zinc transporter 3, ZnT3) a été identifiée dans l'hippocampe, mais aussi dans le cortex (Shen et al., 2007). Il est tentant de spéculer que ZnT 3 puisse jouer un rôle dans la capture du Mn dans l'hippocampe et que le Mn pourrait entrer en compétition directe avec le Zn et donc séquestré dans des vésicules synaptiques le long des fibres moussues. A notre connaissance, une compétition entre le Zn et le Mn pour ce transporteur n'a jamais été décrite et des études complémentaires utilisant des animaux ZnT3 « knock-out » seraient nécessaires pour clarifier ce point. De plus, la résolution spatiale de l'imagerie synchrotron utilisée dans cette étude n'est pas appropriée pour identifier les cibles cellulaires et sub-cellulaires du Mn après une administration par voie systémique. Des études complémentaires combinant la microscopie électronique et l'imagerie nano-sonde synchrotron seront nécessaires pour l'identification des cibles intracellulaires du Mn.

Le fer et le manganèse sont chimiquement et biochimiquement similaires. Le Mn peut, de ce fait, interagir directement avec le Fe à une échelle cellulaire et sub-cellulaire et donc perturber l'homéostasie de ce dernier (Aschner, 2000). Nous avons trouvé une diminution du taux total du Fe pour les deux types d'injection IP et IC. Chua et al. ont montré que le Fe et le Mn sont tous les deux transportés par la Tf (Chua and Morgan, 1996). *In vitro*, un excès de Mn diminue l'activité de l'aconitase, une protéine régulatrice de l'équilibre du Fe. Ce phénomène mime un déficit de Fe via une augmentation de l'expression de la Tf (Zheng and Zhao, 2001; Kwik-Urbe et

al., 2003). Le Fe peut parfaitement entrer en compétition avec le Mn pour les sites de fixations de l'aconitase qui est grandement exprimée dans l'hippocampe (Huang et al., 2006).

En conclusion, nos résultats montrent une forte accumulation du Mn dans la FH après injection de Mn par la voie IC, reflétant son accumulation dans les astrocytes. Les deux types d'injections induisent une diminution du Fe et Zn suggérant une compétition spécifique du Mn avec ces métaux. De plus, le Ca total détecté par l'imagerie synchrotron n'est pas perturbé après injection IC de Mn à 100 mM (ceci n'excluant pas la possibilité d'une perturbation locale des pools de Ca^{2+} libre). Ces résultats montrent que le Mn, et donc la MEMRI, peut perturber l'homéostasie des métaux au sein du tissu nerveux et contribuer à altérer les fonctions cérébrales. La combinaison des techniques d'imagerie synchrotron et MEMRI a permis une meilleure compréhension de la distribution du Mn dans l'hippocampe après injection de MnCl_2 par voies IP et IC. La concentration de Mn déterminée par synchrotron montre que la forte sensibilité de la MEMRI peut être expliquée vraisemblablement par une localisation intracellulaire du Mn^{2+} et par la possibilité du Mn à être lié à des protéines ou des métabolites. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes d'accumulation et de transport du Mn, d'autres études ont été entreprises (Chapitre 4).

Chapitre 4 - Accumulation du manganèse dans les neurones et son impact sur la capacité de rétention calcique mitochondriale

4.1. INTRODUCTION	68
4.1.1. MANGANESE ET MITOCHONDRIE	68
4.1.2. MANGANESE ET CYTOPLASME / NOYAU	70
4.1.3. LOCALISATION DU MANGANESE DANS L'APPAREIL DE GOLGI	71
4.1.4. MANGANESE ET ADN / MICROTUBULES	71
4.1.5. OBJECTIFS DE L'ETUDE	71
4.2. MATERIELS ET METHODES	73
4.2.1. MISE EN CULTURE DES LIGNEES CELLULAIRES N2A ET PC12	73
4.2.2. CULTURE PRIMAIRE DE NEURONES HIPPOCAMPIQUES (NH)	77
4.2.3. PREPARATION DU MNCL ₂	77
4.2.4. TEST DE VIABILITE CELLULAIRE	77
4.2.5. CONCENTRATION EN MN DANS LES CELLULES N2A	79
4.2.6. IMAGERIE SYNCHROTRON DES N2A ET NH	81
4.2.7. IMPACT DU MN SUR LES EXTENSIONS NEURONALES ET LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE DES NH	82
4.2.8. IMPACT DU MN SUR LA CAPACITE DE RETENTION CALCIQUE MITOCHONDRIALE	85
4.2.9. LOCALISATION DU MN DANS LA CELLULE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	88
4.2.10. ANALYSES STATISTIQUES	89
4.3. RESULTATS	90
4.3.1. VIABILITE CELLULAIRE DES PC12, N2A ET NH	90
4.3.2. CONCENTRATION DU MN DANS LES CELLULES N2A	90
4.3.3. IMAGERIE SYNCHROTRON DES N2A ET NH	91
4.3.4. IMPACT DU MN SUR LES EXTENSIONS NEURONALES ET LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE DES NH	95
4.3.5. IMPACT DU MN SUR LA CAPACITE DE RETENTION CALCIQUE DES MPC12, MN2A ET MCR	98
4.3.6. LOCALISATION DU MN PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	101
4.4. DISCUSSION	103

- Daoust A., Bohic S., Collomb N., Saoudi Y., Andrieux A. and Barbier E. L.. **Subcellular distribution of Mn in neurons assessed by synchrotron X-ray Microprobe**, *Manuscript in preparation*.
- Daoust A., Bohic S. et Barbier E. L. **Distribution sub-cellulaire du Mn dans les neurones évaluée par imagerie synchrotron**. RITS 2011, Rennes (France).
- Daoust A., Bohic S., Barbier E. L. **Subcellular distribution of Mn in neurons assessed by synchrotron X-ray Microprobe**. ISMRM 2011, Montréal (Canada).

4.1. Introduction

Nous avons précédemment montré (chapitre 3) la distribution du Mn dans l'hippocampe après injection de MnCl₂ par voies IP et IC chez le rat. Nos résultats nous ont permis de répondre à certaines questions, cependant, la résolution des images synchrotron et IRM ne nous ont pas permis d'étudier les cibles sub-cellulaire du Mn. De ce fait, nous avons entrepris une nouvelle étude dans le but de mieux comprendre les mécanismes d'accumulation et de transport du Mn à l'échelle sub-cellulaire.

Quelques travaux ont été réalisés pour déterminer la concentration cellulaire de Mn après ajout de l'ion dans le milieu de culture (Prohaska, 1987; Wedler et al., 1994; Carmona et al., 2008); mais à notre connaissance, la distribution du Mn à l'échelle sub-cellulaire dans des cultures primaires de neurones n'a pas été encore rapportée. Ci-dessous, nous décrivons les différents organites cellulaires dans lesquels le Mn est susceptible d'être localisé.

4.1.1. Manganèse et mitochondrie

Les mitochondries sont essentielles pour la production d'ATP et pour la signalisation cellulaire comme l'apoptose (Lenaz et al., 2006). Les données cliniques et expérimentales suggèrent que la neurotoxicité du Mn induit un dysfonctionnement mitochondrial menant à l'altération du métabolisme énergétique cérébral voire à une perte totale d'énergie (Malecki, 2001; Malthankar et al., 2004; Zwingmann et al., 2004). La principale voie de toxicité du Mn passerait alors par les mitochondries. Toutefois, la distribution du Mn n'est pas limitée à la mitochondrie et peut couvrir l'ensemble des organites cellulaires (Morello et al., 2008).

4.1.1.1 Chaîne respiratoire

Plusieurs études ont démontré la présence de manganèse dans la mitochondrie et son effet toxique au niveau de la chaîne respiratoire (Gunter and Puskin, 1972; Liccione and Maines, 1988; Malecki, 2001). Zhang et al. ont observé l'effet du MnCl₂ sur les fonctions mitochondriales (Zhang et al., 2003). Ils ont étudié trois groupes de rats ayant reçus une dose de MnCl₂ par voie intra-péritonéale (groupe 1 = 7,5 mg/kg ; groupe 2 = 15 mg/kg et groupe 3 = 30 mg/kg de MnCl₂). Les mitochondries du cerveau des rats ont ensuite été isolées par centrifugation différentielle et l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale a été mesurée. Ils observent une diminution dose dépendante de l'activité de la chaîne respiratoire au niveau des différents complexes (I, II, III et IV). Plus le manganèse est présent à de fortes concentrations et

plus la chaîne respiratoire est inhibée. Husain et al. ont montré une diminution de l'activité de la SDH (succinate déshydrogénase) qui représente le complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale (Husain et al., 1976). Cela a été observé dans les gonades de rats mâles et femelles après une seule injection de sulfate de manganèse (MnSO_4) par voie IP. Galvani et al. ont montré l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire dans un modèle de « pseudo neurone » produisant des catécholamines, les PC12 (Galvani et al., 1995).

Ces données indiquent que le manganèse inhibe le transfert d'électron mitochondrial. Il y aurait alors rupture du cycle énergétique générant la mort cellulaire par apoptose.

4.1.1.2 Pore de transition de perméabilité mitochondriale

Une des deux phases effectrices de l'apoptose passe par l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) (Halestrap et al., 2002).

Le mPTP est situé au niveau de la membrane interne mitochondriale. L'inducteur principal de l'ouverture du mPTP est le Ca^{2+} intra-cellulaire en excès. Dans ce cas, cet excès de Ca^{2+} provoque la transition de perméabilité se caractérisant par un gonflement de la mitochondrie. En situation expérimentale, il y a alors entrée de sucrose et libération de Ca^{2+} dans la mitochondrie. Cette transition de perméabilité correspond à une augmentation de la perméabilité aux composés osmotiques d'un poids inférieur à 1500 Da (Halestrap et al., 2002; Devun, 2008) (**Figure 27**).

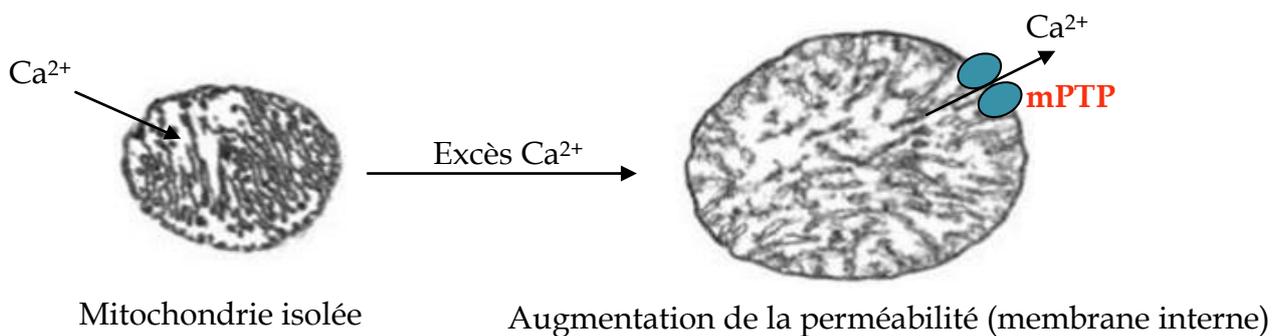


Figure 27 : Gonflement mitochondrial après ajout de calcium (microscopie électronique).

La transition de perméabilité induite par l'addition de calcium entraîne un gonflement des mitochondries isolées. Le Ca^{2+} en excès est relargué via le mPTP (extrait de Devun, 2008).

Lorsque l'ouverture du mPTP entraîne des lésions irréversibles de la perméabilité membranaire mitochondriale, le potentiel transmembranaire mitochondrial diminue, la matrice mitochondriale gonfle et un stress oxydatif se met en place. De ce fait, les

molécules pro-apoptotiques sont libérées dans le cytosol, comme le cytochrome c, l'apoptosis inducing factor (AIF) et les caspases 2, 3 et 9, qui initient le processus de dégradation cellulaire (Ito et al., 2006).

L'ion Mn, analogue du Ca^{2+} , pourrait activer l'ouverture du mPTP. Cependant, peu de données expérimentales sont disponibles dans la littérature. Quelques articles rapportent l'effet du Mn sur le mPTP des mitochondries astrocytaires. En effet, Rao Rama et al. ont montré que le manganèse induit un gonflement astrocytaire provoquant une réaction inflammatoire (Rao Rama et al., 2007). En ajoutant un inhibiteur spécifique du mPTP, la cyclosporine A, ils ont observé une diminution du volume des astrocytes de 90%. Le Mn pourrait alors induire l'ouverture du mPTP. Cette ouverture serait expliquée par le stress oxydatif provoqué par l'ion Mn^{2+} en excès (cf. chapitre 1, p1). Gonzalez et al. ont démontré qu'une exposition chronique au Mn génère un stress oxydatif et induit l'ouverture du mPTP dans les astrocytes (Gonzalez et al., 2008). Selon les auteurs :

- Le Mn se concentre dans la mitochondrie et induit la dépolarisation de la membrane mitochondriale par libération du cytochrome c dans le cytoplasme.
- Le Mn induit la production d'effecteurs apoptotiques : caspases 3, 7 et 6
- Le Mn déséquilibre la balance mort/survie des protéines de la famille des Bcl-2 en faveur de l'apoptose des astrocytes.

4.1.2. Manganèse et cytoplasme / noyau

Le Mn est un cofacteur essentiel d'enzymes telles que les polymérases ADN ou ARN. Kalia et al. ont étudié différents types cellulaires dont les Z310 (cellules épithéliales de la barrière choroïdale), les RBE4 (cellules endothéliales de la BHE) les N27 (neurones dopaminergiques) et les PC12 (pseudo neurones produisant des catécholamines) (Kalia et al., 2008). Après incubation avec 100mM de ^{54}Mn pendant 24h dans le milieu de culture, ils ont constaté que les pseudo-neurones et neurones accumulent plus de Mn que les cellules Z310 et RBE4. Cela peut être dû à un problème d'efflux du Mn des neurones, c'est-à-dire à une lacune de transporteur pour cet ion métallique. Ces mêmes travaux ont montré une localisation préférentielle du manganèse au niveau du noyau et du cytoplasme des N27 et PC12 (27% dans le noyau et 69% dans le cytoplasme pour les PC12) mais très peu dans les mitochondries et microsomes (centrifugation différentielle) (Kalia et al. 2008). Ces résultats contredisent les publications précédentes montrant une accumulation du Mn principalement dans la mitochondrie (Gunter and Puskin, 1972; Liccione and Maines, 1988) ; toutefois il faut noter que la méthode d'isolation des organites par

ultracentrifugations successives peut entraîner une redistribution des éléments constitutifs de la cellule et donc du Mn.

La capacité du Mn à interagir avec les nucléotides (ADN, ARN et ribosome) a été démontrée *in vitro* (Jouve et al., 1975; Vogtherr and Limmer, 1998). Pour finir, la pirin (protéine nucléaire fixant le Fe) pourrait jouer un rôle dans la localisation du Mn dans le noyau, en effet, le Mn pourrait remplacer le cofacteur de cette protéine : le Fe²⁺ (Pang et al., 2004). De plus, la présence du Mn dans le noyau et nucléole a été démontrée par Morello et al. en imagerie par microscopie électronique couplée à la spectroscopie en perte d'énergie (Morello et al., 2008).

4.1.3. Localisation du manganèse dans l'appareil de golgi

Le Mn est un cofacteur essentiel pour les enzymes de l'appareil de golgi telles que les décarboxylases et les kinases (Missiaen et al., 2004). L'appareil de golgi comporte une pompe Ca²⁺/Mn²⁺ appelé SERCA pour « secretory pathway Ca²⁺ -transport ATPases » jouant un rôle essentiel dans l'homéostasie du Ca²⁺ et du Mn²⁺ (Van Baelen et al., 2004).

Carmona et al. ont montré par imagerie de fluorescence X (Synchrotron ESRF à Grenoble) la présence de Mn dans l'appareil de golgi de cellules PC12 incubées avec une dose sub-toxique de 100 µM ou 300 µM de Mn²⁺. Pour localiser précisément l'intensité du signal du Mn, un marquage du golgi et du réticulum endoplasmique (RE) a été effectué par transduction d'un baculovirus portant une protéine spécifique fluorescente (Carmona et al., 2008). Mukhopadhyay et al. ont étudié l'influence du Mn sur une glycoprotéine présente dans l'appareil de golgi (« cis-Golgi glycoprotein Golgi phosphoprotein » de 130 KDa, GPP130). Cette dernière serait rapidement dégradée en présence de Mn (Mukhopadhyay et al., 2010).

4.1.4. Manganèse et ADN / microtubules

Des cultures primaires de neurones striataux de rat (E17) ont été étudiées par Malecki (Malecki, 2001). Après exposition ou non à 5 µM de MnCl₂ pendant 48h, les auteurs ont constaté une fragmentation de l'ADN pour les neurones exposés ainsi qu'une dégradation de la protéine associée aux microtubules (MAP-2). Il pourrait alors y avoir une dégradation des microtubules.

4.1.5. Objectifs de l'étude

Dans l'étude décrite au chapitre 3, nous avons déterminé la concentration et la distribution du Mn dans l'hippocampe de rat après injection de Mn notamment en utilisant la microfluorescence X synchrotron. Cependant, nous n'avons pas pu

observer la distribution sub-cellulaire du Mn. Pour ces raisons, nous avons utilisé une nanosonde synchrotron, afin de cartographier par fluorescence X la distribution sub-cellulaire du Mn et d'en déterminer la concentration dans des neurones hippocampiques et des pseudo-neurones après traitement avec du MnCl₂. Par la suite, nous avons quantifié l'influence du Mn sur le nombre et la taille des extensions neuronales et sur la vitesse de déplacement mitochondrial. Pour finir, nous avons évalué l'effet du manganèse sur la cinétique d'ouverture du mPTP en mesurant la capacité de rétention calcique (CRC) de mitochondries isolées en présence et en absence de MnCl₂.

4.2. Matériels et Méthodes

Nous présentons dans cette partie toutes les méthodes utilisées pour l'étude de l'impact du Mn sur les neurones (ou modèle de neurones). Un plan récapitulatif de l'étude est donné **Figure 28**.

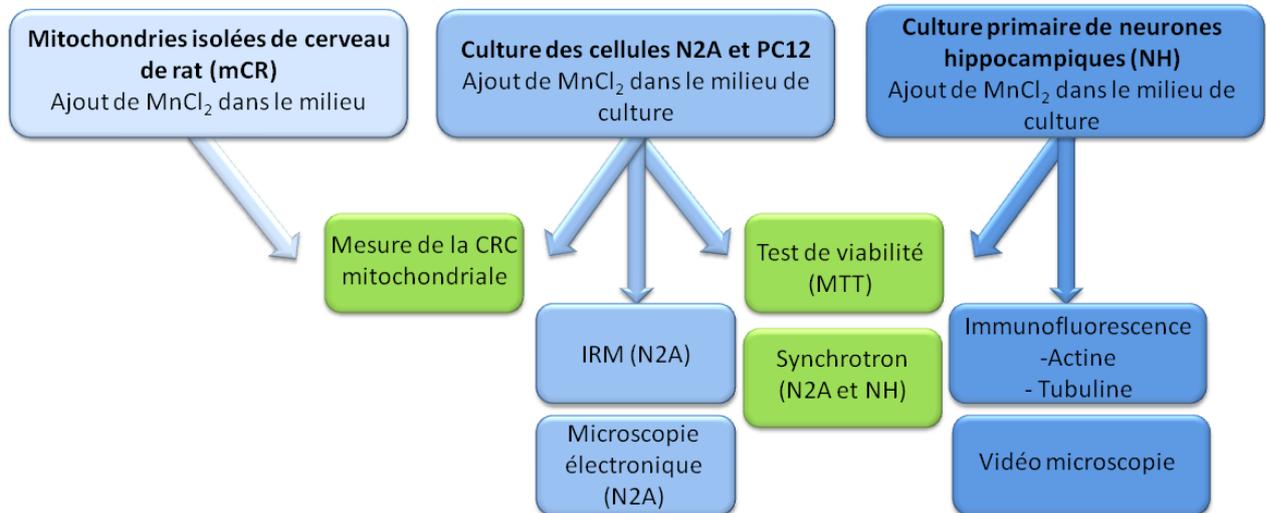


Figure 28 : Schéma récapitulatif de la méthodologie utilisée pour l'étude de l'impact du Mn sur les cellules (N2A, PC12 et NH) et sur les mitochondries.

L'étude a été effectuée à partir de trois matériaux biologiques différents : les NH, les cellules N2A et PC12 et les mitochondries extraites de cerveau de rat (mCR). Nous avons dans un premier temps déterminé la toxicité du Mn par un test de viabilité sur les N2A, PC12 et NH. Puis les cellules N2A et NH ont été imagées au synchrotron (les PC12 ont déjà fait l'objet d'une étude, voir Carmona et al., 2008). La capacité de rétention calcique a été déterminée pour les mCR et les mitochondries des cellules PC12 et N2A. Des expériences préliminaires d'IRM et de microscopie électronique ont été initiées sur les cellules N2A. Pour finir, des marquages d'immunofluorescence ainsi que de la vidéo microscopie ont été effectués sur les NH.

4.2.1. Mise en culture des lignées cellulaires N2A et PC12

4.2.1.1 Lignée cellulaire PC12

La lignée cellulaire PC12, récemment renouvelée par l'ATCC (CRL-1721, ATCC, Manassas, VA, USA) a été isolée à partir de phéochromocytomes de rats c'est-à-dire de tumeurs des médullosurrénales et de la chaîne sympathique (chaîne de ganglions nerveux située de chaque côté de la colonne vertébrale). Cette lignée a la capacité de se différencier en pseudo-neurones produisant des catécholamines (adrénaline, noradrénaline, norépinéphrine) dont la dopamine. Or, nous savons que le Mn s'accumule dans le striatum riche en cellules dopaminergiques (manganisme). Le manganèse oxydant la dopamine, les PC12 ont été très étudiées dans la littérature

pour leur relation toxicité/manganèse/syndrômes parkinsoniens. Les PC12 servent donc de modèle cellulaire dopaminergique afin d'étudier l'influence du manganèse.

4.2.1.2 Lignée cellulaire N2A

Cette lignée cellulaire (CCL-131, ATCC, Manassas, VA, USA) provient de neuroblastes de souris, c'est-à-dire de tumeurs du système nerveux sympathique. Cette lignée a la capacité de se différencier en pseudo-neurones produisant, contrairement aux PC12, de l'acétylcholine estérase et de la tubuline (ainsi que d'autres protéines microtubulaires) (Olmsted et al., 1970). Les N2A n'ont jamais été étudiées dans le contexte du Mn. Etant donnée leur importante production de microtubules, ces cellules pourraient nous permettre de mieux comprendre le transport de manganèse. De plus, la différence entre les deux lignées cellulaires utilisées permet de comparer la sensibilité au MnCl₂.

4.2.1.3 Milieu de culture et mise en différenciation

Les différentes compositions des milieux de culture pour les PC12 et N2A sont résumées dans les **Tableau 8 et Tableau 9** ci-dessous :

	cellules	PC12	PC12 différenciation
Milieu complet	Milieu de base	RPMI 1X (1640 medium avec 4500 mg/L D-Glucose, 2 mM glutamine, Invitrogen, France)	RPMI 1X (1640 medium avec 4500 mg/L D-Glucose, 2 mM glutamine, Invitrogen, France)
	SVF	Sérum de veau fœtal 5% (Invitrogen, France)	Sérum de veau fœtal 5% (Invitrogen, France)
	SC	Sérum de cheval décomplémenté 10% (Invitrogen, France)	Sérum de cheval décomplémenté 10% (Invitrogen, France)
	PS	Penicilline/Streptomycine 100 U/mL (Invitrogen, France)	Penicilline/Streptomycine 100 U/mL (Invitrogen, France)
	NGF		Nerve growth factor-7S 100 ng/mL (from mouse submaxillary, Sigma-Aldrich, France)

Tableau 8 : Milieu de culture pour les cellules PC12

	cellules	N2A	N2A différenciation
Milieu complet	Milieu de base	DMEM 1X (avec GlutaMAX, 4500 mg/L D-Glucose, pyruvate de sodium, Invitrogen, France)	DMEM 1X (avec GlutaMAX, 4500 mg/L D-Glucose, pyruvate de sodium, Invitrogen, France)
	SVF	Sérum de veau fœtal 10% (Invitrogen, France)	Sérum de veau fœtal 0,1% (Invitrogen, France)
	PS	Penicilline/Streptomycine 100 U/mL (Invitrogen, France)	Penicilline/Streptomycine 100 U/mL (Invitrogen, France)
	NEAA	Non essentiel amino acide 1% (Invitrogen, France)	Non essentiel amino acide 1% (Invitrogen, France)
	AR		Acide rétinoïque 5 µM (98% powder, Sigma-Aldrich, France)

Tableau 9 : Milieu de culture pour les cellules N2A

Les milieux DMEM et RPMI sont des milieux essentiels minimums, ce sont des milieux de base, contenant essentiellement des sels minéraux pour réguler la pression osmotique, des acides aminés essentiels et non essentiels, des vitamines et un indicateur de pH (rouge de phénol). Le SVF décomplémenté apporte des protéines, de nombreux facteurs de croissance, notamment des substances cyto stimulantes qui activent la division cellulaire. Sa décomplémentation permet l'inactivation du complément (pouvant être toxique pour les cellules). Elle est réalisée par chauffage 30 min à 56 °C. Le sérum de cheval (SC) présente une concentration protéinique supérieure à celle du SVF, mais contient cependant moins d'oligo-éléments. Il sert par conséquent souvent d'additif de milieux de culture, et s'est avéré particulièrement adapté pour la culture de cellules neuronales.

Le mélange Pénicilline/Streptomycine est composé respectivement d'un antibiotique et d'un antifongique.

Les NEAA sont des acides aminés non essentiels, ils permettent une stimulation de la croissance cellulaire ainsi qu'une prolongation de leur viabilité.

Les milieux complets sont filtrés stérilement (pore de 20 µm) et conservés à 4°C.

La différenciation permet aux cellules cancéreuses de se différencier en pseudo neurones.

Différenciation des PC12

Il a été montré que les cellules PC12 possèdent des récepteurs au nerve growth factor (NGF) (Greene and Tischler, 1976). La différenciation est alors initiée par ajout d'une solution de NGF 100 ng/ml au milieu de culture complet (**Tableau 8**). Le NGF est une protéine permettant la croissance de neurites chez les PC12 en se liant aux récepteurs TrkA et p75^{NTR}. Les cellules ainsi différenciées produisent beaucoup de catécholamines et principalement de la dopamine.

Différentiation des N2A

L'Acide Rétinoïque (AR) à 10 mmol/L est ajouté au milieu de culture complet (Tableau 9). L'AR est un métabolite « tout trans » dérivé de la vitamine A permettant la différenciation cellulaire en se fixant au récepteur RAR des N2A.

4.2.1.4 Conditions de culture

Toutes les manipulations ont été réalisées sous un poste de sécurité microbiologique à flux laminaire (PSM II). Les lignées cellulaires ont été mises en culture dans des boîtes de Pétri classiques en plastique de 100 mm de diamètre sans traitement préalable. Le milieu de culture a été changé tous les deux jours afin d'éliminer les cellules mortes et de renouveler les éléments nutritifs essentiels pour le développement cellulaire. Les cellules ont été incubées dans une étuve à 37 °C en atmosphère chargée en oxygène (95 %) car les cellules sont aérobies strictes et en dioxyde de carbone (5 %) pour le maintien en milieu quasi physiologique (P=5,3KPa). Le CO₂ forme un système tampon avec le HCO₃⁻ du milieu et permet ainsi un maintien du pH de la culture entre 7,2-7,3 (attesté par le rouge de phénol).

4.2.1.5 Entretien cellulaire

Les N2A et PC12 ont été congelées respectivement à P6 et P1 en 50 cryotubes en début de thèse afin de toujours travailler sur le même passage cellulaire et éviter toute dérive du génotype cellulaire.

Un « passage » est effectué lorsque les cellules en culture sont à confluence, permettant d'entretenir la lignée et de produire un grand nombre de boîtes en culture. La particularité des cellules cancéreuses est de pouvoir être passée indéfiniment (dans la limite de la dérive du génotype ~60 passages), contrairement aux cultures primaires de neurones par exemple. Après rinçage au PBS, les cellules sont dissociées par action de la trypsine qui, en détruisant certaines liaisons protéiques, brisent les adhésions cellulaires. Cette enzyme est active à 37 °C et est toxique si elle est laissée plus de 10 min sur les cellules ; son action est alors inhibée par ajout de SVF. Les cellules sont ensuite centrifugées (5 min à 5000 trs/min), le culot est repris dans du milieu complet et les cellules sont remises en culture à raison de :

- 2,4.10⁴ cellules N2A/cm²

- 3,6.10³ cellules PC12/cm²

4.2.2. Culture primaire de neurones hippocampiques (NH)

4.2.2.1 Mise en culture

La mise en culture des neurones hippocampiques (NH) a été effectuée à partir d'embryons de souris à E=18,5. Pour cela, les souris gestantes ont été euthanasiées 2 jours avant la mise bas par dislocation cervicale et les embryons ont immédiatement été récupérés. La suite du travail a été effectuée sous un PSM. Les cerveaux des embryons ont été prélevés, et les hippocampes disséqués sous loupe binoculaire. Après dissociation mécanique des hippocampes, les neurones ont été mis en culture pendant 2h dans un milieu stérile spécifique (composé de DMEM, 1% Glutamax, 10% de SVF et 1% PS). Puis le milieu a été remplacé par une solution sans sérum ni PS contenant du B27 appelée milieu Neurobasal complet (Neurobasal, 1% Glutamax, 2% B27 sans sérum). Le milieu de culture n'est pas renouvelé afin de ne pas perturber la croissance neuronale.

4.2.1.2 Développement neuronal

Tout comme les lignées cellulaires PC12 et N2A, toutes les manipulations des NH ont été effectuées sous un PSM et les neurones ont été incubés dans une étuve à 37°C. Les boîtes de Pétri et les lamelles dans lesquelles ont été cultivées les neurones ont été traitées au préalable à la poly-lysine (1mg/mL Poly-L-Lysine hydrobromide, Sigma-Aldrich). Ce polymère peut effectuer des liaisons avec la silice des surfaces en verre, et avec les groupements phosphates de l'ADN, permettant ainsi une meilleure adhérence des cellules aux surfaces en verre.

4.2.3. Préparation du MnCl₂

Une solution de MnCl₂ 1M (MnCl₂-4H₂O, M1787, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a été stérilisée par filtration sur membrane de 0,2 µm de diamètre puis directement diluée dans le milieu de culture.

Les doses de MnCl₂ décrites par la suite ont été choisies à partir de plusieurs articles dont ceux de Xu et al., 2009 pour les neurones hippocampiques et de Carmona et al., 2008 pour les PC12 et N2A.

4.2.4. Test de viabilité cellulaire

Le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium, M2128, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) est une méthode rapide de numération des cellules vivantes. L'anneau de sel de tétrazolium du MTT (jaune) est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes,

formant un précipité de couleur violette. La densité optique du précipité formé est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes qu'il contient.

Le $MnCl_2$ est ajouté aux doses suivantes sur les différents types cellulaires :

	PC12	N2A	NH
Doses $MnCl_2$ (μM)	0	0	0
	100	200	20
	300	500	50
	600	800	100
	1000	1500	150
	2000		

24h après contact au Mn, une solution de MTT à 5 mg/mL et PBS 1X (avec Ca^{2+} et Mg^{2+}) est préparée puis filtrée (membrane de 0,2 μm de diamètre). La solution finale de MTT à 0,5 mg/mL dans le milieu complet est ajoutée et laissée au contact des cellules pendant 2h à 37 °C. La solution de MTT a ensuite été remplacée par du diméthylsulfoxyde (DMSO) pure, permettant la lyse cellulaire et la libération du précipité violet formé dans les mitochondries. Les cellules non décollées de la boîte sont détachées à l'aide d'un râteau. 200 μL de chaque lysat ont été déposés dans une plaque 96 puits permettant la lecture de la densité optique au spectrophotomètre (Pherastar plus, BMG Labtech, Germany) à une longueur d'onde de 519 nm. Une absorbance inférieure à 0,7 est nécessaire pour le respect de la loi de Beer Lambert, au cas échéant, la solution a été diluée.

Exploitation des résultats :

Les valeurs de densité optique des échantillons ont été soustraites aux valeurs des « blancs » effectuée sur du DMSO pur. Le pourcentage de viabilité cellulaire est calculé en fonction des doses de Mn déposées dans le milieu (contrôle = 100%). Une droite de corrélation a été réalisée et la dose létale induisant 50% de mort cellulaire (DL50) a été calculée grâce à l'équation de la droite.

4.2.5. Concentration en Mn dans les cellules N2A

4.2.5.1 IRM *in vitro*

Nous avons souhaité mesurer les concentrations de manganèse présent dans un lysat cellulaire grâce à l'imagerie IRM. Ces expériences sont toutefois préliminaires et ont été effectuées uniquement sur les cellules N2A.

24h après contact au Mn, les cellules N2A ont été rincées deux fois puis trypsinées et centrifugées. Le culot cellulaire a ensuite été lysé par du HCl 50 mM dans le but de libérer le Mn intracellulaire. La solution finale est étudiée sur un IRM horizontal 7T (Avance III, Bruker, Ettlingen, Germany). Le protocole de mise en place des antennes est précédemment décrit dans le chapitre 3. Le tube, placé dans un support plastique a été déposé au centre de l'aimant (là où le champ magnétique est le plus homogène). Les mesures de T1 ont été obtenues à l'aide d'une séquence d'inversion récupération décrites ci-dessous (

Figure 29).

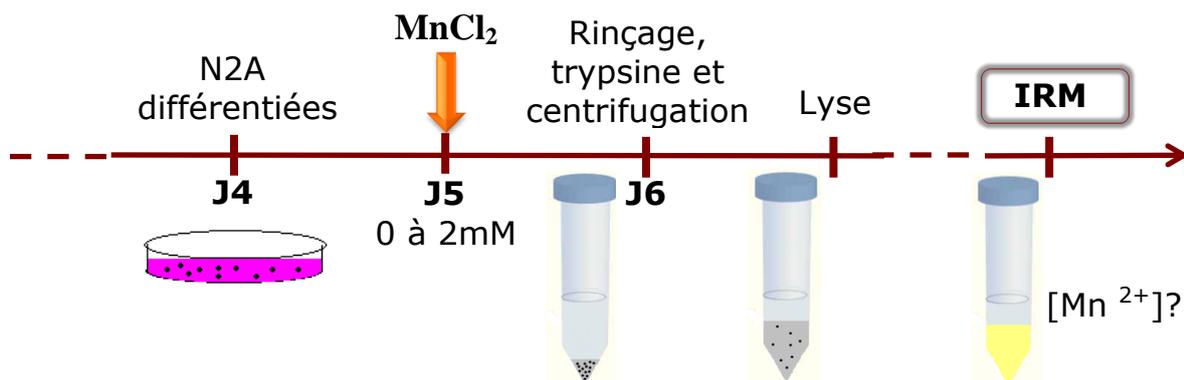


Figure 29 : Protocole de quantification de la concentration de Mn par IRM sur des cellules N2A.

Le Mn est ajouté au milieu de culture des cellules N2A différenciées à J5. 24h après, le culot cellulaire a été récupéré, rincé et lysé afin de récupérer le milieu intracellulaire. La concentration de Mn a ensuite été déterminée par IRM.

4.2.5.2 Calcul de la relaxivité r1 du manganèse

La relaxivité (r1) du Mn est dépendante du champ magnétique auquel nous travaillons. C'est pourquoi nous avons calculé la valeur du r1 sur l'imageur à 7 Teslas. Pour cela, une série de tubes contenant des solutions à différentes concentrations de Mn (diluées dans l'eau) ont été passés dans l'IRM 7T. Les concentrations étudiées étaient de 0 μM ; 0,001 μM ; 0,01 μM ; 0,05 μM ; 0,1 μM et 1000 μM . La séquence d'inversion récupération permet d'obtenir la relaxation longitudinale d'un échantillon et d'en déduire le temps de relaxation T₁. Pour cela, la

séquence a été paramétrée de la façon suivante : temps de répétition (TR) égale à $5 \times T_1$, 10 points de temps d'inversion (le 10^{ème} étant au moins égal à la valeur du TR), nombre de points = 1024 et un temps d'acquisition de 20 ms.

Suite à un ajustement des données, le temps de relaxation T_1 a été obtenu. La valeur du T_1 est acceptable lorsque celle-ci est encadrée par les 9 autres points de temps d'inversion (Figure 30). A la suite de cela, la variation de la vitesse de relaxation longitudinale (seconde⁻¹) a été calculée comme suit : $\Delta R_1 = (1/T_1) - (1/T_{1\text{eau}})$, avec $T_{1\text{eau}} = 2,87\text{s}$ et exprimée en fonction de la concentration de Mn dans le tube (Figure 30). La relaxivité est égale à la pente de la droite, c'est-à-dire $6,77 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 30).

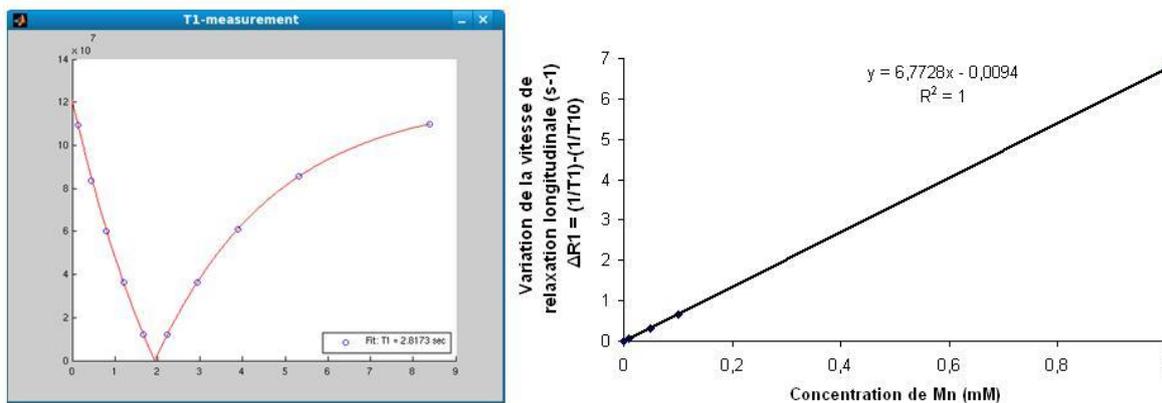


Figure 30 : Calcul de la relaxivité r1.

- A. Mesure du temps de relaxation T_1 d'un échantillon d'eau. Le T_1 est ici égal à 2,82 ms.
- B. Variation de la vitesse de relaxation longitudinale ($\Delta R_1 = (1/T_1) - (1/T_{1\text{eau}})$, avec $T_{1\text{eau}} = 2,87\text{s}$) en fonction de la concentration de Mn contenue dans les tubes. La relaxivité (r1) est égale à la pente de la droite, c'est-à-dire $6,77 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

4.2.5.3 Analyse des données IRM obtenues sur les cellules N2A

Les données IRM sont analysées en utilisant un logiciel développé par l'équipe dans l'environnement Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA), appelé « magnetic resonance spectroscopy », permettant, dans notre cas, d'obtenir le temps de relaxation T_1 . La concentration de Mn (mM) a été déterminée en utilisant l'équation suivante :

$$1/T_{1\text{Mn}} = 1/T_{1\text{eau}} + r_1[\text{Mn}]$$

où le temps de relaxation $T_{1\text{eau}} = 2,87\text{s}$ et la relaxivité calculée précédemment est de $r_1 = 6,77 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, en accord avec la littérature (Silva et al., 2004).

4.2.6. Imagerie synchrotron des N2A et NH

Cette étude a été réalisée à partir des N2A et NH car Carmona et al. ont déjà étudié par imagerie synchrotron les cellules PC12 après traitement au Mn (Carmona et al., 2008).

4.2.6.1 Préparation des échantillons

Les cellules N2A et les NH ont été cultivées directement sur des fenêtres en nitrure de silicium préalablement stérilisées par des bains successifs d'alcool et d'eau stérile. Après séchage durant une nuit, les lamelles ont été traitées avec de la gélatine 2% (pour les N2A) ou de la poly-L-lysine 0,01 % (pour les NH) puis rincées et séchées durant la nuit. Les N2A sont mise en culture à 5.10^3 cellules et les NH à 5.10^4 . Après 4 jours de culture les cellules N2A sont mises en différenciation et le $MnCl_2$ est ajouté 24h après. Pour les NH, le $MnCl_2$ est ajouté au milieu 3 jours après la mise en culture. Pour les deux types cellulaires, 24h après contact au Mn, les supports sont rincés puis rapidement cryofixés en les plongeant rapidement dans un bain d'isopentane (-160 °C) refroidi par l'azote liquide. Les échantillons sont ensuite lyophilisés sous-vide à basse température (-65°C) et sont stockés à température ambiante dans un environnement sec avant les analyses synchrotron (**Figure 31**).

4.2.6.2 Analyse synchrotron

Les expériences ont été réalisées au « European Synchrotron Radiation Facility » (ESRF) de Grenoble sur les stations ID22NI et ID21 (Bohic et al., 2012). L'énergie des rayons X a été fixée à 17 KeV sur la nanosonde ID22NI et à 7,2 KeV (énergie maximale disponible sur la ligne basse énergie ID21). Le faisceau de haute intensité de rayon X qui arrive sur l'échantillon provoque l'émission de photons de fluorescence X caractéristique de chaque élément. Les analyses de la fluorescence des rayons X est effectuée par des analyses multi-élémentaires en scannant rapidement l'échantillon (300 ms/pixel). Cette technique induit très peu de dommage radiatifs sur les cellules lyophilisées. Le faisceau de fluorescence X correspondait à un spot de $100 \times 100 \text{ nm}^2$ (verticale x horizontale) avec un système de miroir Kirkpatrick-Baez (KB). Les images des éléments ont ensuite été normalisées avec le flux incident. Le spectre de fluorescence X a été évalué avec le logiciel PyMca qui permet de calculer par la méthode des paramètres fondamentaux la concentration des éléments à l'intérieur d'un échantillon à partir du spectre de fluorescence X enregistré (Sole et al., 2007). Un échantillon de référence de foie de bœuf SRM1577b (pastille de 100 μm d'épaisseur) dont les concentrations sont certifiées (NIST, Gaithersburg, MD) a été utilisé pour calibrer les paramètres de l'expérience. Les concentrations en P, S, K, Ca,

Fe, Cu, Zn et Mn ont été calculées en fonction de l'épaisseur moyenne d'une cellule (2 μm) et en supposant une densité de la matrice de 1 g/cm^3 . Les cultures de cellules rentrent dans les critères de « tissu fin » et ne nécessitent donc pas de correction de matrice. Les noyaux des cellules ont été délimités manuellement grâce à la carte du phosphore (élément présent en forte concentration dans le noyau). Les concentrations exprimées en ppm ($\mu\text{g}/\text{g}$ de matière sèche) ont été déterminées à partir de régions d'intérêt tracées manuellement sur l'intégralité du corps cellulaire (Tableau 10 et Tableau 11). La concentration en mM a été dérivée de la concentration en ppm, en assumant que la densité de la matrice est égale à celle de l'eau.

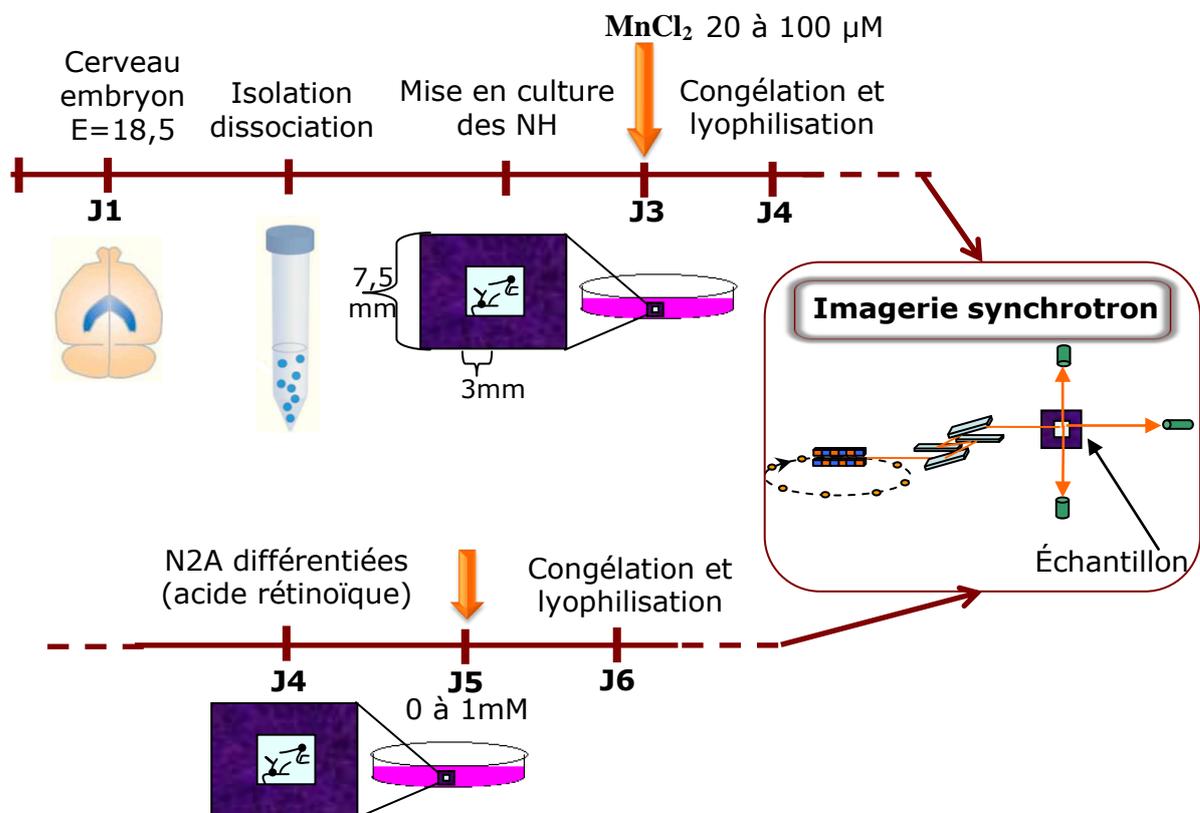


Figure 31 : Schéma résumant le protocole de préparation des échantillons cellulaires N2A et HN pour les analyses synchrotron.

4.2.7. Impact du Mn sur les extensions neuronales et la dynamique mitochondriale des NH

La technique de mise en culture décrite ci-dessus a été utilisée pour ces expériences. Les NH ont été mis en culture sur des lamelles pour les expériences d'immunofluorescence. Après 2 (J2) ou 7 jours (J7) de culture, les neurones sont mis au contact de différentes concentrations de Mn : 0, 50 et 100 μM . En effet, 2 jours après leur mise en culture, les neurones ont commencé à développer un réseau

dendritique quantifiable (c'est-à-dire peu dense). 7 jours après la mise en culture, le réseau est plus mature et le développement neuronal a pu être observé.

4.2.7.1 Marquage immunofluorescent de l'actine et de la tubuline

24h après le traitement au $MnCl_2$, les NH ont été fixés et perméabilisés pendant 1 heure dans une solution de PFA 3,7% ; triton 0,1%, glutaraldéhyde 0,5% diluée dans du PBS 1X (tous les produits proviennent de Sigma-Aldrich, France). Les lamelles ont ensuite été rincées 6 fois dans du PBS et incubées dans une solution de $NaBH_4$ (1mg/ml dans du PBS) pendant 10 min. Après 3 rinçages dans du PBS et 3 rinçages dans du PBS-Triton 0,1% (PBST), l'actine fibrillaire des neurones (actine-F) a été marquée (pendant 30 min) par une sonde phalloïdine couplée au fluorophore Alexa 546, diluée au 1/200^e dans du PBST (Life technologies, France). Après plusieurs rinçages au PBST, la tubuline a été marquée pendant 30 min par un anticorps primaire monoclonal de souris anti-tubuline $\alpha 3a1$ (dilution de 1/5000^e dans du PBST, (Erck et al., 2005) puis pendant 30 min par un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'Alexa 488 (diluée au 1/500^e dans du PBST ; Invitrogen, France). Pour finir, après 3 rinçages dans du PBST, les noyaux ont été marqués par incubation dans une solution de Hoescht pendant 2 min (1/ 2000^e dans du PBST ; Sigma Aldrich, France) qui est un intercalant de l'ADN. Les lamelles ont été rincées rapidement dans de l'eau distillée, séchées puis montées sur lame avec du milieu de montage pour fluorescence (Dako, France).

4.2.7.2 Observation des lames

Les lames ont été observées sur un microscope Axioskop Zeiss (Carl Zeiss, Inc., 444 Le Pecq, France) avec un objectif 40x à immersion et une camera photométrique Coolsnap ES (Roper Scientific, Trenton, NJ, USA) contrôlée par Métavue (Universal Imaging Corp., USA).

Dans le but d'avoir une image globale de la population des NH de chaque lamelle, nous les avons scannées une à une avec un microscope Leica DMI6000 (Leica, France), un objectif 40x à sec et une caméra EMCCD Quantum (Roper Scientific, Trenton, NJ, USA) utilisant le module « scan slide » du logiciel Métamorph software (Universal Imaging Corp., USA).

Chaque image est composée de 150 ± 5 vignettes, acquises de manière automatique. A partir de ces acquisitions, certaines caractéristiques morphologiques neuronales ont pu être quantifiées avec le logiciel Métamorph, selon les différentes concentrations en $MnCl_2$:

- le nombre d'extension par neurone (axones + neurites ; nombre total de neurones ~ 60)

- la taille des extensions par neurone (axone+neurites)

Les résultats ont été exprimés en moyenne +/- SEM, et ont été validés par un test paramétrique de Student.

4.2.7.3 Impact du manganèse sur la dynamique mitochondriale

La technique de mise en culture décrite ci-dessus a été utilisée pour ces expériences. Les NH ont été ensemencés dans des boîtes en verre (IWAKI, Dutscher, France) traitées à la poly-L-lysine à raison de 1 hippocampe/boîte (1 hémisphère, ~10⁶ de neurones). Après 48h de culture, les NH ont été mis au contact de différentes concentrations en MnCl₂: 0, 50 et 100 µM.

24h après le traitement, le milieu de culture a été remplacé par une sonde fluorescente rouge (20 nM, dilué dans le milieu de culture ; MitoTracker® Red CMXRos ; Life technologies, France). Cette sonde est utilisée pour marquer les mitochondries des cellules vivantes sans altérer la dynamique mitochondriale dans cette étude et son accumulation est dépendante du potentiel de membrane. Après 5 min à 37 °C, le milieu contenant la sonde est remplacé par du milieu de culture pour le temps de l'expérience. Les NH ont ensuite été placés à l'intérieur d'une plateforme de vidéo microscopie équipée d'un incubateur régulant la température et le niveau de CO₂. Les NH ont été observés avec un microscope inversé Axiovert 200M (Carl Zeiss, France) utilisant un objectif x100 à immersion. Des images en contraste de phase ont été acquises toutes les secondes pendant 1 ou 2 min suivie d'acquisition en fluorescence.

Analyses des données :

Les images en contraste de phase ont permis de contrôler la culture pendant l'expérience et de donner des informations générales concernant la morphologie neuronale, le trafic et le nombre de vésicules dans le neurone. Le marquage fluorescent a permis d'observer et de quantifier les caractéristiques mitochondriales telles que leur nombre et leur vitesse de déplacement à l'aide du logiciel Métamorph.

4.2.8. Impact du Mn sur la capacité de rétention calcique mitochondriale

Toutes les techniques suivantes ont été réalisées à l'Institut des Neurosciences de Grenoble (GIN) excepté le dosage de la CRC, qui a été effectué au Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée (LBFA) de Grenoble en collaboration avec Cécile Batandier. Les expériences ont été réalisées sur des cellules N2A et PC12 et sur des mitochondries isolées de cerveau de rat. Ces expériences n'ont pas pu être réalisées sur des NH. En effet leur préparation est délicate, dépendante du nombre d'embryons disponible et donne une quantité de neurones insuffisante.

4.2.8.1 Mesure de la capacité de rétention calcique (CRC) mitochondriale

Ce test est utilisé afin de mesurer la capacité de rétention calcique des mitochondries c'est-à-dire la quantité de calcium nécessaire pour induire l'ouverture du mPTP (voir principe p.69). Le calcium est apporté sous forme de petites quantités (5 μmol) ajoutées régulièrement dans le milieu placé sous agitation.

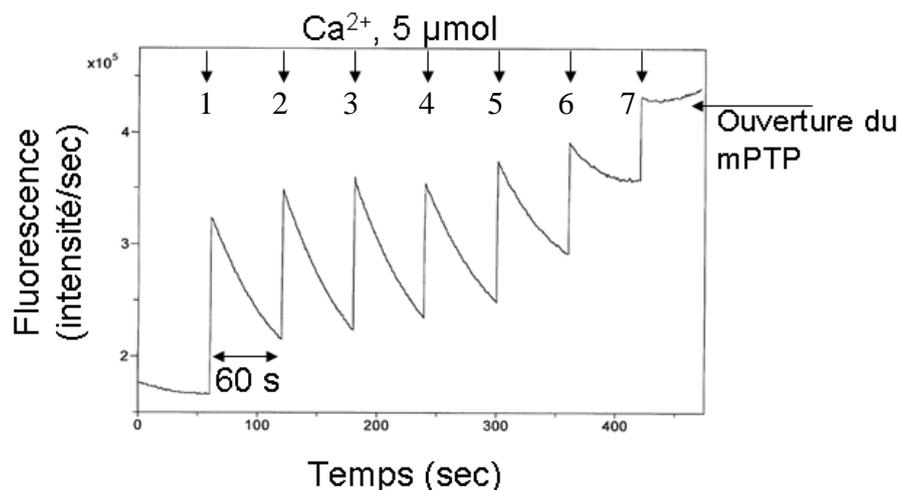


Figure 32 : Exemple de l'ouverture du mPTP (cellules N2A).

Le calcium (5 μmol) est ajouté toutes les minutes dans le milieu extracellulaire. Le Ca^{2+} se fixe à la sonde calcique induisant un pic de fluorescence puis le Ca^{2+} pénètre dans la mitochondrie induisant une diminution de la fluorescence. Après ajout de Ca^{2+} (7 doses dans cet exemple, soit 35 μmol), la fluorescence reste élevée et constante correspondant au relargage du Ca^{2+} par la mitochondrie.

L'ouverture du mPTP est visualisable grâce à une sonde calcique qui est un indicateur de la présence de calcium extra-mitochondrial. Après injection de Ca^{2+} dans le milieu, un pic de fluorescence apparaît, correspondant à la liaison entre le calcium et la sonde, puis le calcium rentre dans les mitochondries. Pour ce faire, le

calcium se décroche de la sonde, ce qui se traduit par une lente diminution de la fluorescence. Ceci est répété plusieurs fois, jusqu'à ce que la fluorescence continue d'augmenter au moins 60 secondes après la dernière injection de calcium. Cela signifie que le calcium retenu dans les mitochondries est relargué dans le milieu extra-mitochondrial : le pore de transition de perméabilité mitochondrial est ouvert. La quantité ajoutée de calcium nécessaire pour déclencher la transition de perméabilité mitochondriale permet d'obtenir la capacité de rétention calcique mitochondriale (**Figure 32**).

4.2.8.2 Mitochondries issues des lignées cellulaires PC12 et N2A

Préparation des cellules

Les lignées cellulaires PC12 ou N2A ont été mises en culture jusqu'à atteindre 80% de confluence. Après décollement par l'action de la trypsine, les cellules ont été centrifugées 5 min à 1500 g et remises en suspension dans du tampon « CRC » (Sucrose 250mM, Tris-Mops 10mM, Pi 1mM, pH=7,4), de manière à obtenir un nombre de cellules précis :

- 2.10⁶ cellules/mL pour les PC12 ;
- 10⁶ cellules/mL pour les N2A.

Les cellules ont été perméabilisées avec une solution de digitonine 0,25 g/L (50%, M = 1229,31 g/mol, diluée dans du DMSO, Sigma-Aldrich, France), permettant ainsi l'accès aux mitochondries des cellules PC12 (mPC12) et N2A (mN2A).

Mesure de la CRC

Du succinate 5 mM pH = 7,3 (Sodium succinate dibasic hexahydrate, M = 270,1g/mol, dilué dans de l'eau, Sigma-Aldrich, France) est additionné comme substrat de la chaîne respiratoire mitochondriale et du calcium green® 0,25 µM (Calcium Green™-5N, Hexapotassium Salt, cell impermeant M = 1192,19g/mol, dilué dans de l'eau, Molecular Probe, France) comme la sonde calcique. La suspension cellulaire est laissée 2 min à 30 °C sous agitation permettant ainsi la perméabilisation et l'homogénéité cellulaire.

5 µmol de calcium (dilué dans du tampon CRC, 99%, Sigma-Aldrich, France) a été ajouté toutes les minutes jusqu'à ouverture du mPTP. La fluorescence a été mesurée par un spectrofluorimètre (Photon Technology International, PTI). Les longueurs d'ondes ont été réglées sur 506 nm pour l'excitation et 530 nm pour l'émission.

Ces expériences de mesure de capacité de rétention calcique mitochondriale ont été réalisées en absence, et en présence de différentes concentrations de MnCl_2 :

- 0 à 40 μM de MnCl_2 pour les PC12 ;
- 0 à 30 μM de MnCl_2 pour les N2A.

Un inhibiteur spécifique de l'ouverture du mPTP, la cyclosporine-A 1 μM (CSA, CHU Grenoble) a été testé en absence ou en présence de 20 μM de MnCl_2 .

4.2.8.3 Mitochondries isolées de cerveau de rat

Isolement des mitochondries

10 rats de souche Sprague Dawley, (200g) ont été utilisés. L'animal est légèrement anesthésié à l'isoflurane 5% dans l'air, puis rapidement euthanasié par décapitation. Le cerveau a été prélevé et placé dans du tampon MSHE à 4°C (Mannitol 225mM, Sucrose 75mM, Hepes 10mM, EGTA 1 mM, pH 7,4). Le cervelet, les méninges et les vaisseaux sanguins ont été enlevés.

Une première étape de lacération a été réalisée par découpe du cerveau à l'aide de ciseaux dans une solution de MSHE-BSA 1g/L. La deuxième étape a consisté en une homogénéisation du tissu à l'aide d'un Potter (500 tours/minute, 10 allers-retours).

L'homogénat obtenu a subi un processus de centrifugations différentielles à 4°C composé d'une centrifugation lente (2000 g, 4 min, 4 °C), afin d'éliminer les débris cellulaires, puis de trois centrifugations rapides (12000 g, 10 min, 4 °C) pour ne garder que les mitochondries dans le culot. Lors de la deuxième centrifugation rapide, une solution de digitonine 0,2 g/L (50%, M = 1229,31 g/mol, diluée dans du DMSO, Sigma-Aldrich, France) est ajoutée dans le tube de centrifugation afin de perméabiliser les synaptosomes, et ainsi laisser libre accès aux mitochondries synaptosomales.

Au terme de ces centrifugations, le culot contenant les mitochondries de cerveau de rat (mCR) a été repris dans du tampon MSHE-BSA 1 g/L à 4 °C.

Un dosage des protéines de la suspension mitochondriale a été effectué avec la technique de Bradford (Quick start Bradford protein assay kit, Bio Rad, France) en plaque de 96 puits permettant d'effectuer la suite à partir de 0,5 g/L de mitochondries. L'absorbance des échantillons a été mesurée grâce à un spectrophotomètre (PHERAstar FS, BMG LABTECH).

Mesure de la CRC

La technique décrite précédemment (§ 4.2.8.2.) a été utilisée pour déterminer la CRC (succinate 5 mM et calcium green® 0,25 μM). Des fractions de 10 μM de calcium

(dilué dans du tampon CRC, 99%, Sigma-Aldrich, France) ont été ajoutées toutes les minutes jusqu'à ouverture du mPTP.

Ces expériences de mesure de capacité de rétention calcique mitochondriale ont été réalisées en absence, et en présence de différentes concentrations de MnCl_2 : 0 à 250 μM de MnCl_2 .

L'inhibiteur de référence du mPTP, la cyclosporine-A 1 μM (CSA, CHU Grenoble) a été testé en absence ou en présence de 1 et 50 μM de MnCl_2 .

4.2.8.4 Analyses des données de la CRC

Le nombre de pics (NP) nécessaire pour obtenir l'ouverture du mPTP a été comptabilisé. Le NP en présence de Mn a été soustraite au NP contrôle d'un même échantillon. Cette soustraction a ensuite été additionnée à la moyenne des SNP contrôles et multipliée par la concentration de calcium en μM (5 μM pour les cellules et 10 μM pour les cerveaux de rats). Le résultat est alors exprimé en μM de calcium nécessaire pour induire l'ouverture du mPTP en fonction de la dose de Mn.

4.2.9. Localisation du Mn dans la cellule par microscopie électronique

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Karin Pernet-Gallay (plateforme de microscopie électronique, GIN, Grenoble) et avec Pierre Henri Jouneau, (LEMMA, CEA, Grenoble).

Les cellules N2A ont été cultivées pendant 4 jours puis mises en différenciation le 5^{ème} jour. Le Mn 800 μM est ajouté au milieu de culture à J5. 24h après, les cellules N2A ont été fixées avec une solution de PFA 2%, glutaraldéhyde 0,2% (diluée dans du PB 0,1 M, pH 7,3) pendant 2h. Les cellules sont ensuite détachées mécaniquement (à l'aide d'un râteau « plastic cell scraper »), centrifugées à 1200 rpm pendant 5 min et intégrée dans de la gélatine 10%. Le bloc cellulaire est ensuite coupé en pièce de 1 mm^3 , cryoprotégé pendant 4h dans du sucrose 2,3 M puis congelé dans de l'azote liquide. Des coupes ultra fines de 40 nm ont été réalisées à -120°C avec un ultra-cryomicrotome (Leica-Reichert) et récupérées dans une solution de sucrose 2,3 M et méthylcellulose 2%. Les coupes ont été regardées à 80 kV avec un microscope 1200EX JEOL TEM et les images ont été acquises avec une caméra digitale (Veleta, SIS, Olympus).

4.2.10. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés comme suit : moyenne \pm déviation standard (DS). Les comparaisons suivantes ont été effectuées :

- Les concentrations des éléments entre les cellules N2A contrôles et traitées (200, 800 μ M) ont été comparées utilisant un test T non apparié.
- Les concentrations des éléments entre les NH contrôles et traitées (20, 100 μ M) ont été comparées utilisant un test T non apparié.
- Le nombre d'extension et leur longueur entre les NH contrôles et traitées (20, 50, 100 μ M) ont été comparées utilisant un test T non apparié.
- La vitesse nombre de déassement des mitochondries entre les NH contrôles et traitées (50, 100 μ M) ont été comparées utilisant un test T non apparié.
- La CRC entre les mPC12, mN2A ou mCR contrôles et les mPC12, mN2A ou mCR traités au Mn ont été comparées utilisant un test T non apparié.

Pour évaluer si la longueur des extensions neuronales est un facteur de prédiction du nombre d'objets mobiles ou du nombre de mitochondries, le coefficient de corrélation de Pearson a été calculé.

Le même test a été effectué pour évaluer si la concentration de Mn est un facteur de prédiction de l'ouverture du mPTP.

Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

4.3. Résultats

4.3.1. Viabilité cellulaire des PC12, N2A et NH

La DL50 a été obtenue par un test de viabilité au MTT, 24h après contact au Mn. Elle est de 922 μM de Mn pour les PC12, 628 μM de Mn pour les N2A et de 90 μM pour les NH (**Figure 33**).

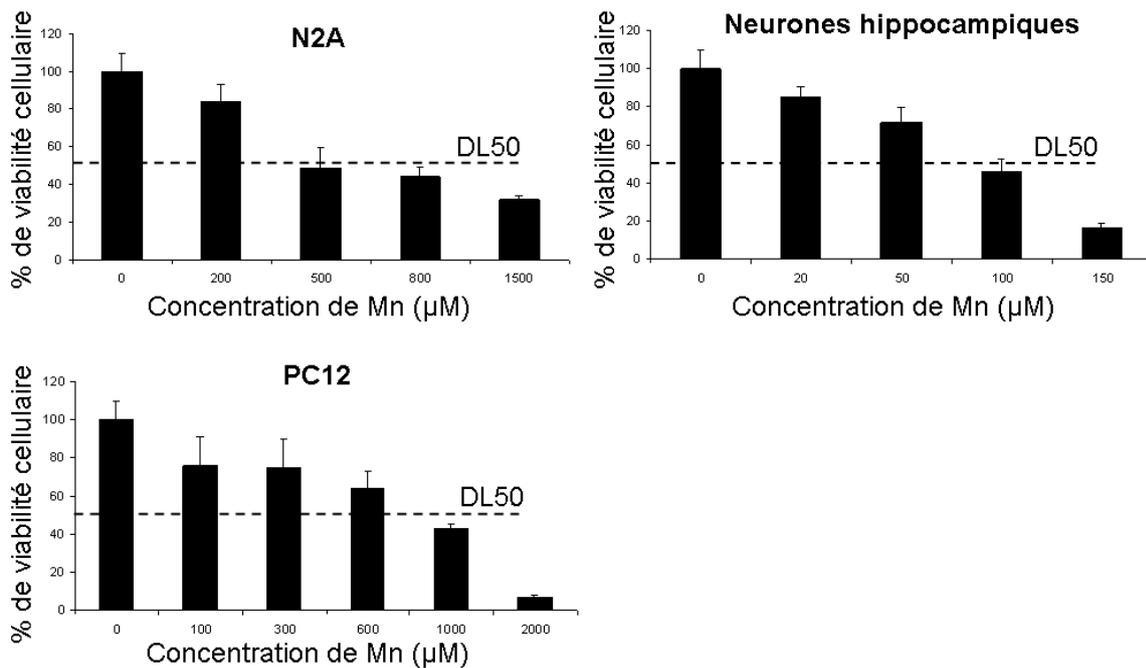


Figure 33 : Test de viabilité des cellules N2A, PC12 et des NH exposées à différentes concentrations de Mn.

La ligne pointillée noire correspond à la dose létale de Mn induisant 50% de mort cellulaire (DL50). $DL50_{N2A}=628 \mu\text{M}$; $DL50_{PC12}=922 \mu\text{M}$; $DL50_{NH}=90 \mu\text{M}$.

4.3.2. Concentration du Mn dans les cellules N2A

Nous observons une augmentation de la concentration de Mn par cellule N2A en fonction de la concentration de Mn déposée dans le milieu de culture (**Figure 34**). A partir de 2 mM de Mn dans le milieu, nous observons un plateau correspondant à ~ 3 mM de Mn par cellule. En prenant en compte seulement la phase linéaire de 0 à 2 mM de Mn dans le milieu ($r^2=0,99$), nous en déterminons l'équation de la droite suivante : $y= 1,61x + 0,16$. La DL50 déterminé précédemment, étant de 628 μM de Mn, nous calculons une concentration de 1,18 mM de Mn par cellule.

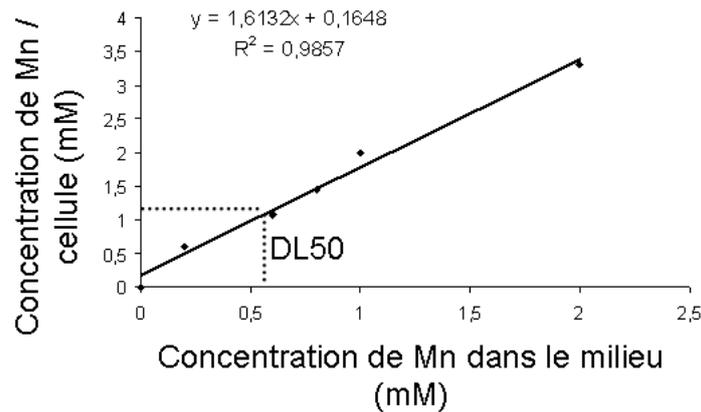


Figure 34 : Concentration de Mn dans les cellules N2A déterminée par IRM

Concentration de Mn par cellule N2A en fonction de la concentration de Mn déposée dans le milieu de culture. La droite représente un ajustement linéaire aux données. La DL50 étant de 0,63 mM, nous calculons, grâce à l'équation de la droite, une concentration de 1,18 mM de Mn par cellule.

4.3.3. Imagerie synchrotron des N2A et NH

Distribution et concentration du Mn dans les N2A et NH

Dans les cellules N2A et les NH contrôles, le signal de fluorescence X du Mn est à peine observable (**Figures 35 et 36**). Une augmentation du signal du Mn est observé 24h après ajout de Mn au milieu de culture à des doses « sub-toxiques » (20 μ M pour les NH et 600 μ M pour les N2A), et se trouve particulièrement localisé dans les régions péri-nucléaires. A des doses toxiques de Mn (100 μ M pour les NH et 1000 μ M de Mn pour les N2A), la distribution du Mn est très diffuse dans le cytoplasme avec, néanmoins, une localisation plus intense au niveau de la région péri-nucléaire.

Des concentrations relativement importantes de Mn sont observées dans les NH. Elles sont estimées par imagerie synchrotron à $3,4 \pm 1,0 \mu\text{g/g}$ (0,062 mM) pour les NH contrôles, $49,9 \pm 7,8 \mu\text{g/g}$ (0,909 mM) pour les NH traitées avec 20 μ M de Mn et $161,0 \pm 13,3 \mu\text{g/g}$ (2,933 mM) pour les NH traitées avec 100 μ M de Mn (Tableau 10). Des concentrations encore plus importantes sont observées dans les cellules N2A par imagerie synchrotron. Les concentrations sont de $24,1 \pm 1,8 \mu\text{g/g}$ (0,440 mM) pour les N2A contrôles, $627,5 \pm 149,1 \mu\text{g/g}$ (11,430 mM) pour les N2A traitées avec 600 μ M de Mn et $1515,9 \pm 109,6 \mu\text{g/g}$ (27,612 mM) pour les N2A traitées avec 1000 μ M de Mn (Tableau 11).

Distribution et concentration du calcium, zinc, fer dans les N2A et NH

Dans un premier temps, nous observons que le P et le Zn sont localisés principalement dans le noyau, en accord avec les données de la littérature (Ortega et al., 2009) (**Figures 35 et 36**). En présence d'une dose toxique de Mn, la distribution de ces deux éléments devient granulaire et inhomogène.

La distribution du Ca est difficilement détectable pour les cellules N2A et NH contrôles. A des doses sub-toxiques de Mn, la distribution du Ca est localisée dans les régions péri-nucléaires riches en Mn. A doses toxiques de Mn, la distribution du Ca est plus diffuse dans le cytoplasme et garde une localisation préférentielle dans les régions péri-nucléaire. Pour les deux types cellulaires NH et N2A, nous observons une augmentation significative de la concentration de Ca total après ajout de Mn (doses sub-toxique et toxique) (**Tableaux 10 et 11**).

Dans les NH et N2A contrôles, le Fe est distribué de façon granulaire dans les régions cytoplasmiques. En présence de Mn, le Fe semble redistribué dans les régions riches en Mn aussi bien pour les doses sub-toxiques que toxiques. Les concentrations indiquent une diminution du Fe total dans les NH après ajout de Mn à des doses sub-toxiques. Inversement, nous observons une forte augmentation du Fe total dans les N2A après ajout de Mn à des doses sub-toxiques et toxiques (**Tableaux 10 et 11**). Toutefois, les résultats concernant les N2A sont préliminaires et doivent être confirmés.

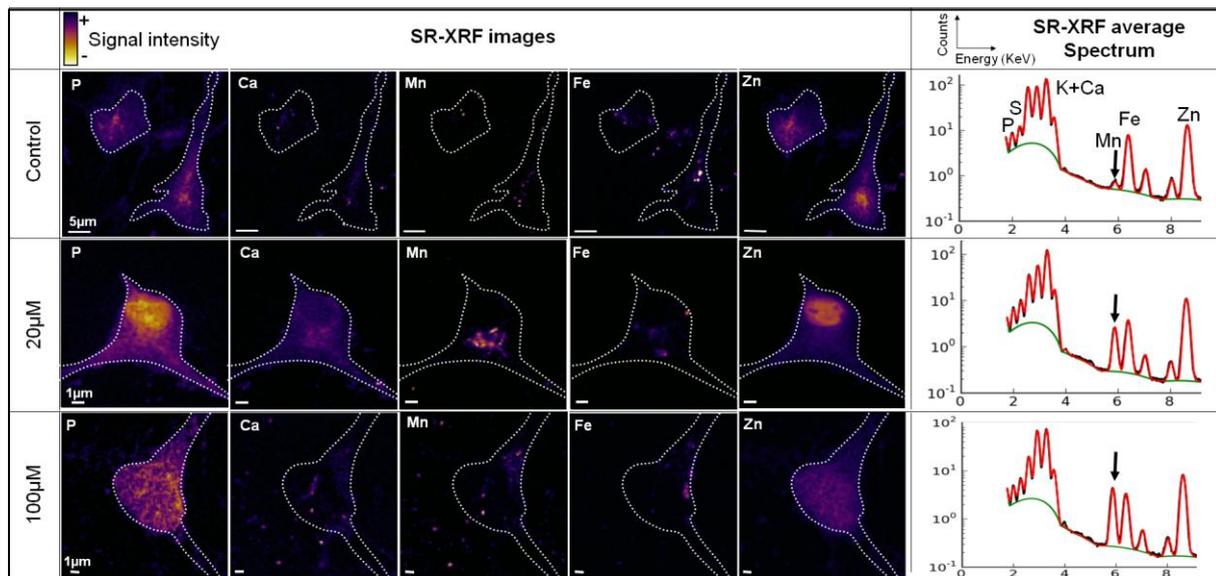


Figure 35: Cartes de la distribution de métaux dans les NH obtenues par imagerie synchrotron.

Distribution des éléments en deux dimensions pour le phosphore, calcium, manganèse, fer et zinc dans les neurones hippocampiques, 24h après traitement au Mn (contrôles, 20 μ M et 100 μ M). Les images ont été acquises sur la station ID22NI nanosonde avec une énergie d'excitation des photons X incidents de 17 KeV. Le contour des cellules est tracé manuellement en pointillé blanc. La normalisation de la somme des spectres est représentée dans la droite du tableau et les flèches montrent l'évolution des pics de Mn en fonction du type de traitement au Mn. Nous observons une augmentation de l'intensité du Ca et du Fe et aucun changement pour le Zn.

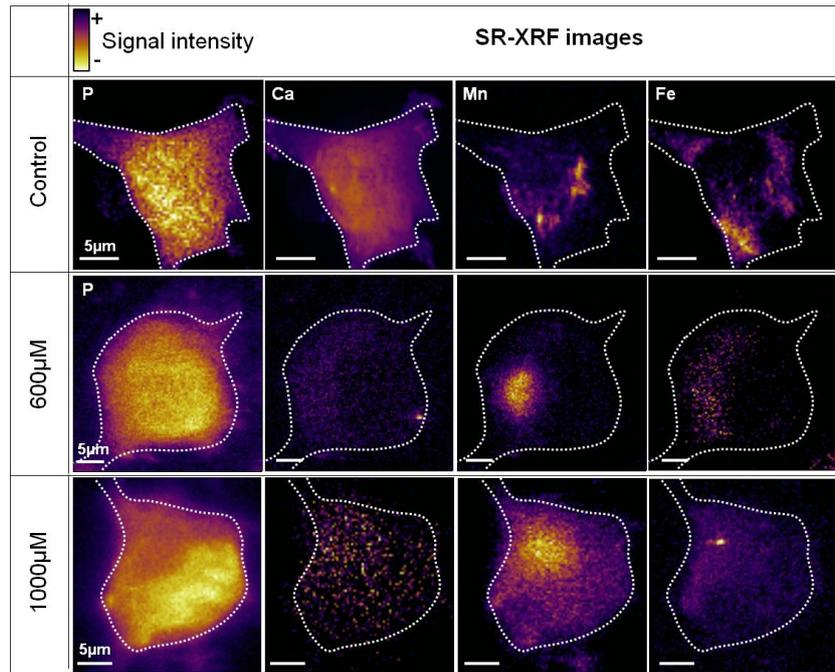


Figure 36 : Cartes de la distribution de métaux dans les N2A obtenues par imagerie synchrotron.

Distribution des éléments en deux dimensions pour le manganèse, calcium, fer et zinc dans les cellules N2A, 24h après traitement au Mn (contrôles, 600 μM et 1000 μM). Les images ont été acquises sur la station de microscopie X ID21 avec une énergie d'excitation de 7,2 KeV (au dessus du seuil d'excitation du fer) et donc ne permettant pas d'accéder aux raies d'émission du zinc. Le contour des cellules est tracé manuellement en pointillé blanc. L'échelle de couleur est en microgramme d'élément par gramme de tissu sec pour chaque élément. Une barre de couleur est représentée pour chaque carte du Mn dans les différentes conditions.

Metals in HN	Control (µg/g) (n=18)	20µM (n=11)	100µM (n=15)
P	19432,2 ± 936,7	24089,5 ± 1534,5**	22214,7 ± 768,0*
K	15285,4 ± 715,1	17103,5 ± 1022,5	17625,8 ± 558,2*
Ca	31,2 ± 6,0	99,6 ± 13,4***	101,6 ± 12,8***
Fe	85,2 ± 5,4	62,3 ± 5,3**	79,2 ± 5,9
Cu	5,0 ± 0,6	3,6 ± 0,4	3,8 ± 0,2
Zn	109,3 ± 5,4	119,1 ± 4,5	116,6 ± 3,9
Mn	3,4 ± 1,0	49,9 ± 7,8***	161,0 ± 13,3***###

Tableau 10 : Concentrations du P, K, Ca, Fe, Cu, Zn et Mn dans les neurones hippocampiques, obtenues par imagerie synchrotron.

Les concentrations sont exprimées en µg d'élément par g de tissu sec pour chaque traitement (contrôle, 20 µM et 100 µM de Mn). n=nombre de cellules analysés par condition. 20µM et 100 µM vs Contrôles : * p < 0,05; ** p < 0,01 ; ***p < 0,001. 20 µM vs 100 µM : ### p < 0,001. (moyenne ± DS).

Metals in N2A	Control (µg/g) (n=8)	600µM (n=3)	1000µM (n=6)
Ca	149,8 ± 23,5	1251,9 ± 235,9***	1358,3 ± 261,4***
Fe	55,9 ± 2,2	187,2 ± 21,7***	599,0 ± 112,9***#
Mn	24,1 ± 1,8	627,5 ± 149,1***	1515,9 ± 109,6***##

Tableau 11 : Concentrations du Ca, Fe, Mn dans les cellules N2A, obtenues par imagerie synchrotron.

Les concentrations sont exprimées en µg d'élément par g de tissu sec pour chaque traitement (contrôle, 600 µM et 1000 µM de Mn). n=nombre de cellules analysés par condition. 600 µM et 1000 µM vs Contrôles : ***p < 0,001. 600 µM vs 1000 µM : # p < 0,05 ; ## p < 0,01. (moyenne ± DS).

4.3.4. Impact du Mn sur les extensions neuronales et la dynamique mitochondriale des NH

Comme montré dans la **Figure 37**, l'immunomarquage révèle une altération des neurones en présence de 50 et 100 μM de Mn. A ces concentrations, les neurones présentent un marquage tubulaire granuleux et épais au niveau des extensions. De plus, nous observons un raccourcissement des extensions neuronales, chaque extrémité étant caractérisée par un amas d'actine.

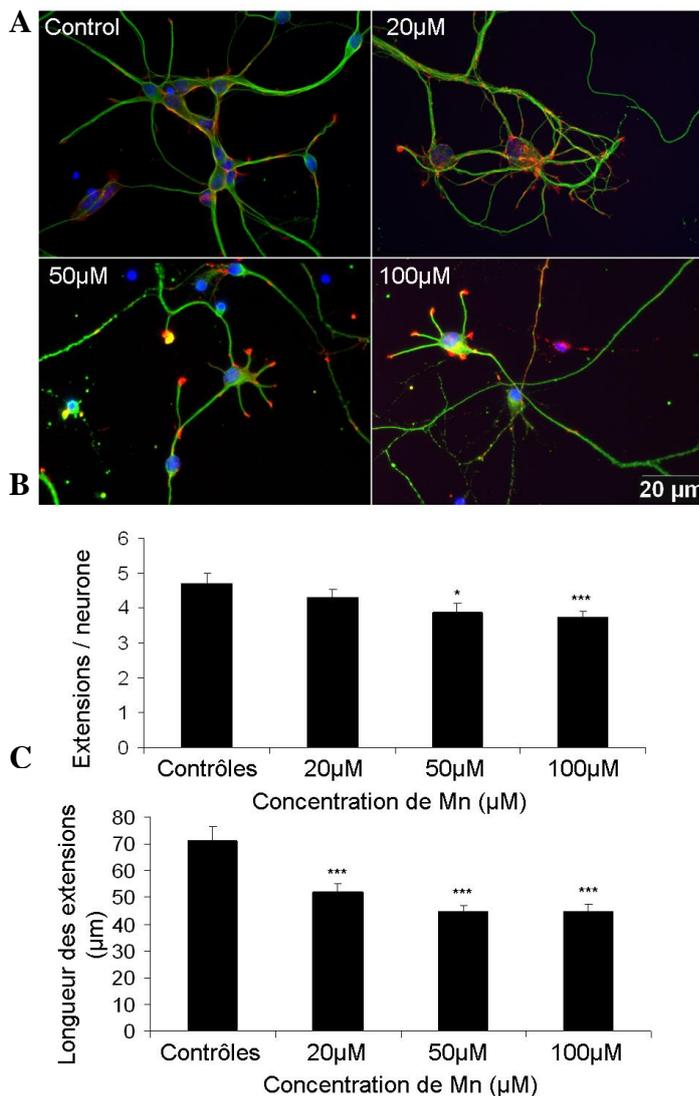


Figure 37: Impact du Mn sur la morphologie des NH.

L'immunomarquage a été effectué sur des NH à J3, 24h après contact au Mn (J4).

A. Immunofluorescence des NH après différentes expositions au Mn (contrôle, 20, 50 et 100 μM). Actine fibrillaire (rouge), tubuline (vert) et noyaux (bleu). Nous observons une diminution de la taille des extensions.

B. Quantification du nombre d'extensions par neurone (neurites + axones) à partir des immunomarquages, en fonction de la concentration de Mn (contrôle, 20, 50 et 100 μM).

C. Quantification de la longueur des extensions (neurites + axones) à partir des immunomarquages en fonction de la concentration de Mn (contrôle, 20, 50 et 100 μM).

n = 60 par condition, *p < 0,05 ; ***p < 0,001 (moyenne \pm SEM).

Le nombre d'extensions (neurites + axones) par neurone et la longueur des extensions ont été quantifiées à partir des immunomarquages. Nous observons une diminution du nombre d'extensions par neurone à partir de 50 μM de Mn. Le nombre d'extensions est de $4,7 \pm 0,3$ pour les contrôles, $4,3 \pm 0,2$; $3,9 \pm 0,2$ et $3,7 \pm 0,2$ pour les traitements à 20, 50 et 100 μM de Mn respectivement.

A partir des acquisitions en contraste de phase, nous avons dénombré la longueur des extensions sur la première image de la vidéo. Les objets mobiles, c'est-à-dire le nombre de vésicules et de mitochondries en mouvement dans l'espace intracellulaire, présent dans les extensions dénombrées a été rapporté. Une bonne corrélation est obtenue entre le nombre d'objets mobiles et la somme de la longueur des extensions ($r^2 = 0,66$; $p < 0,05$; **Figure 38**). Nous avons montré précédemment que la longueur des extensions est diminuée en présence de Mn. Nous retrouvons ce résultat, en effet, la somme de la longueur des extensions est plus faible dans le groupe traité avec 100 μM de Mn que dans le groupe contrôle, permettant ainsi de distinguer les différents niveaux de Mn sur le graphique. Etant donné que le nombre d'objets mobiles est proportionnel à la longueur des extensions en présence ou non de Mn, on peut conclure qu'il n'y a pas de perturbation du nombre d'objet mobile.

Le nombre de mitochondrie a été compté ainsi que la longueur de l'extension correspondante. Une bonne corrélation est obtenue entre le nombre de mitochondries et la longueur de l'extension dans les NH pour toutes les conditions ($r^2 = 0,58$; $p < 0,0001$; **Figure 38**). Ces résultats indiquent qu'il n'y a pas de perturbation du nombre de mitochondries après exposition au Mn.

Pour finir, nous avons déterminé la vitesse de déplacement des mitochondries par vidéo-microscopie en fluorescence. La vitesse est significativement diminuée en présence de 50 et 100 μM de Mn. Elle est de $1,9 \pm 0,03$ $\mu\text{m}/\text{sec}$ pour les contrôles et de $1,2 \pm 0,04$ μm et $1,4 \pm 0,05$ $\mu\text{m}/\text{sec}$ en présence de 50 et 100 μM de Mn respectivement (**Figure 38**). La distance parcourue par la mitochondrie à partir d'un point d'origine (choix manuel et aléatoire) a été calculée. Cette distance diminue en fonction de la concentration de Mn. Elle est de $397,9 \pm 0,5$ μm pour les contrôles, $331,6 \pm 0,3$ μm pour les NH traités avec 50 μM et de Mn et $244,9 \pm 0,007$ μm pour les NH traités avec 100 μM de Mn (données non montrées).

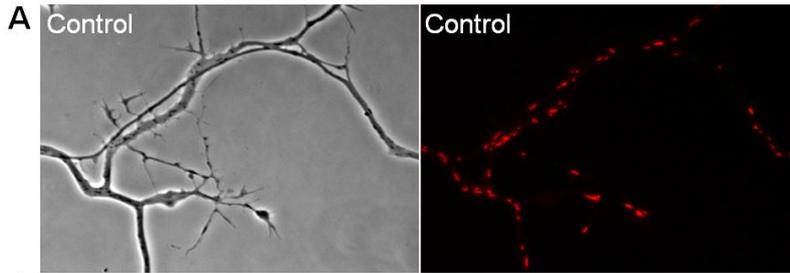
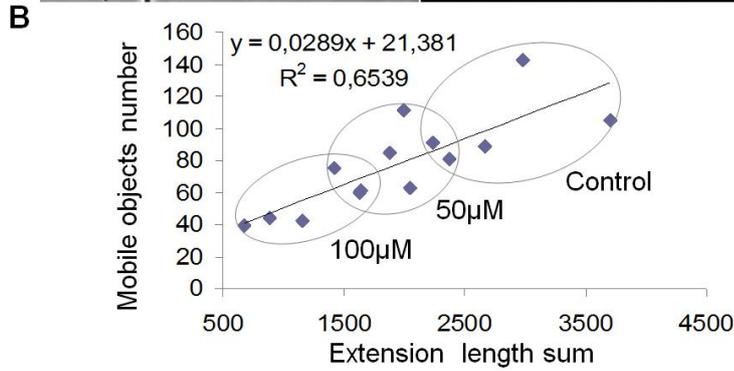
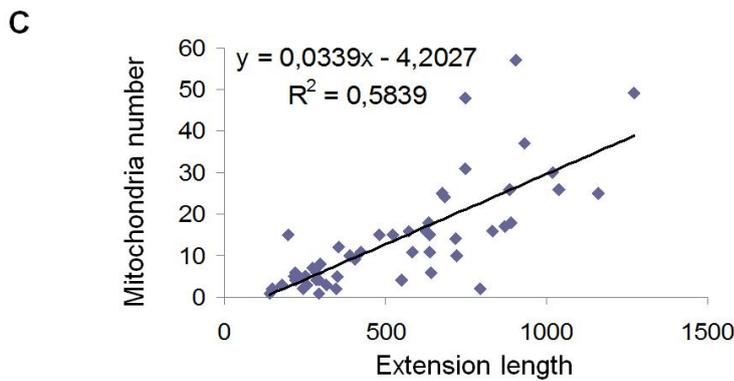


Figure 38 : Impact du Mn sur le nombre et la dynamique mitochondriale.

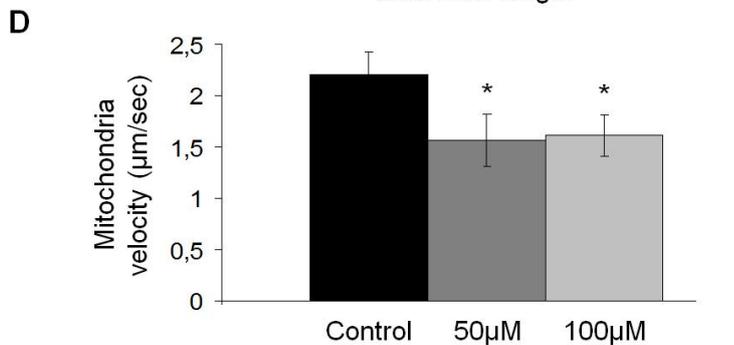
La vidéo microscopie a été effectuée sur des NH à J3, 24h après contact au Mn (J4).



A. premier plan des images de vidéo microscopie des NH contrôles. Les images du même NH de gauche et de droite ont été acquises respectivement en contraste de phase et en fluorescence. Les mitochondries ont été marquées avec une sonde fluorescente rouge.



B. Nombre d'objets mobiles (mitochondries + vésicules) en fonction de la somme de la longueur des extensions. Chaque point représente un neurone différent (13 en tout). Le trait représente la droite de régression.



C. Nombre de mitochondries en fonction de la longueur des extensions. Chaque point représente une extension analysée.

D. Vitesse de déplacement des mitochondries en présence ou non de Mn. Contrôles n=31, 50 µM=28, 100 µM=29. *p<0,05 (moyenne ± SEM).

4.3.5. Impact du Mn sur la capacité de rétention calcique des mPC12, mN2A et mCR

Dans toutes les études nous observons une différence de profil de l'évolution de la fluorescence en fonction du temps. Les spectres contrôles sont lisses alors que les spectres de fluorescence en présence de Mn sont bruités. Ceci est en parti du à une différence d'échelle étant plus petite en présence de Mn. Il a tout de même été possible de déterminer la SNP nécessaire pour l'ouverture du mPTP.

4.3.5.1 CRC des mPC12 et mN2A

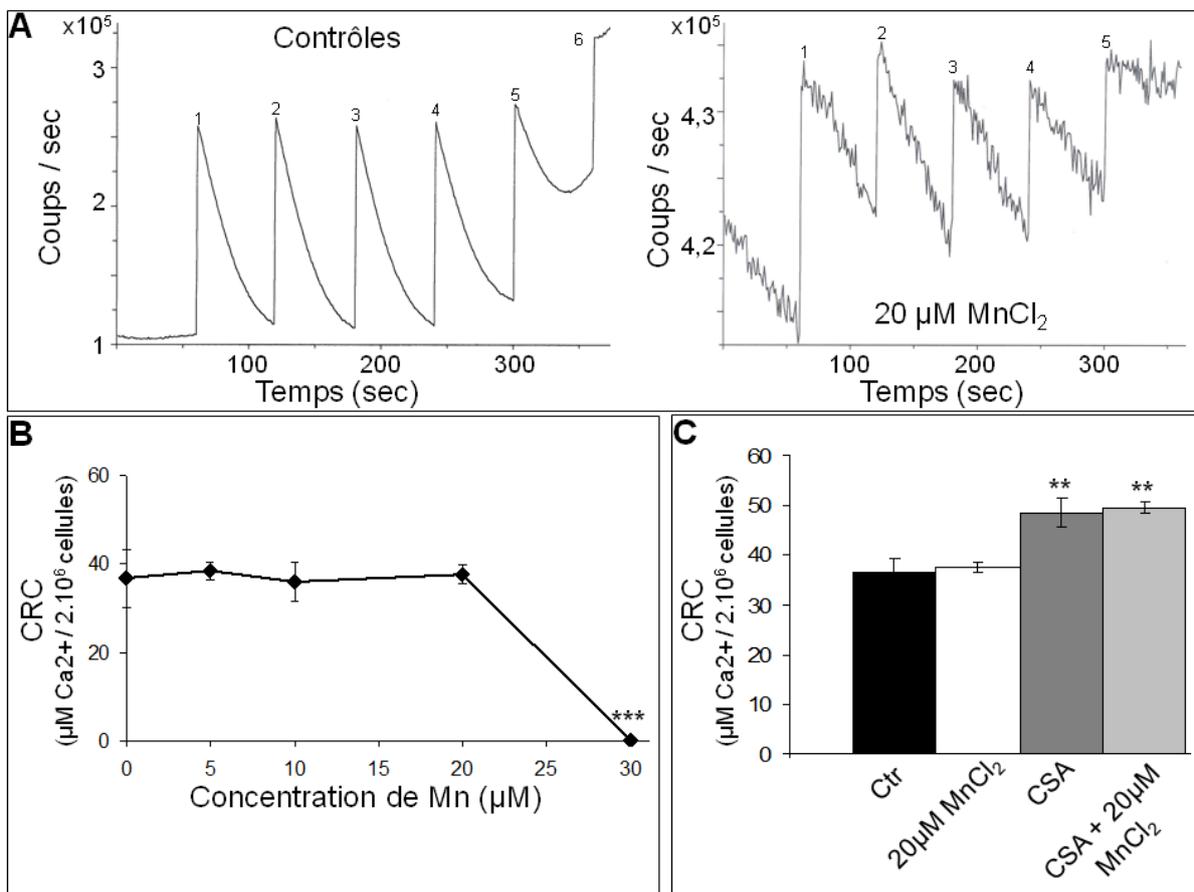


Figure 39 : Capacité de rétention calcique (CRC) mitochondriale sur des cellules PC12, en présence et en absence de MnCl₂.

A. Evolution de la fluorescence calcique en fonction du temps des mitochondries contrôles et en présence de 20μM de Mn. Le nombre de pics diminue avec le Mn et le profil des pics est moins net (échelle plus petite).

B. CRC en fonction de la concentration en Mn. Elle ne change pas en présence de 0 à 20 μM de Mn puis la CRC est diminuée drastiquement en présence de 30 μM de Mn dans le milieu extra-mitochondriale.

C. CRC en présence d'un inhibiteur de l'ouverture du mPTP, la cyclosporine-A (CSA, 1μM) avec ou sans Mn.

n= 8 expériences ; **p<0,01.

Pour les PC12, la CRC ne varie pas en présence de Mn jusqu'à 20 μ M (Contrôles : 36,7 \pm 2,7 μ M de Ca²⁺ ; 20 μ M de Mn : 37,5 \pm 1,0 μ M de Ca²⁺) (**Figure 39**). Concernant les cellules N2A, la CRC baisse significativement à partir de 5 μ M de Mn (Contrôles : 52,7 \pm 4,1 μ M de Ca²⁺ ; 5 μ M de Mn : 43,4 \pm 1,9 μ M de Ca²⁺) jusqu'à et 30 μ M (37,2 \pm 2,4 μ M de Ca²⁺) de Mn (**Figure 40**).

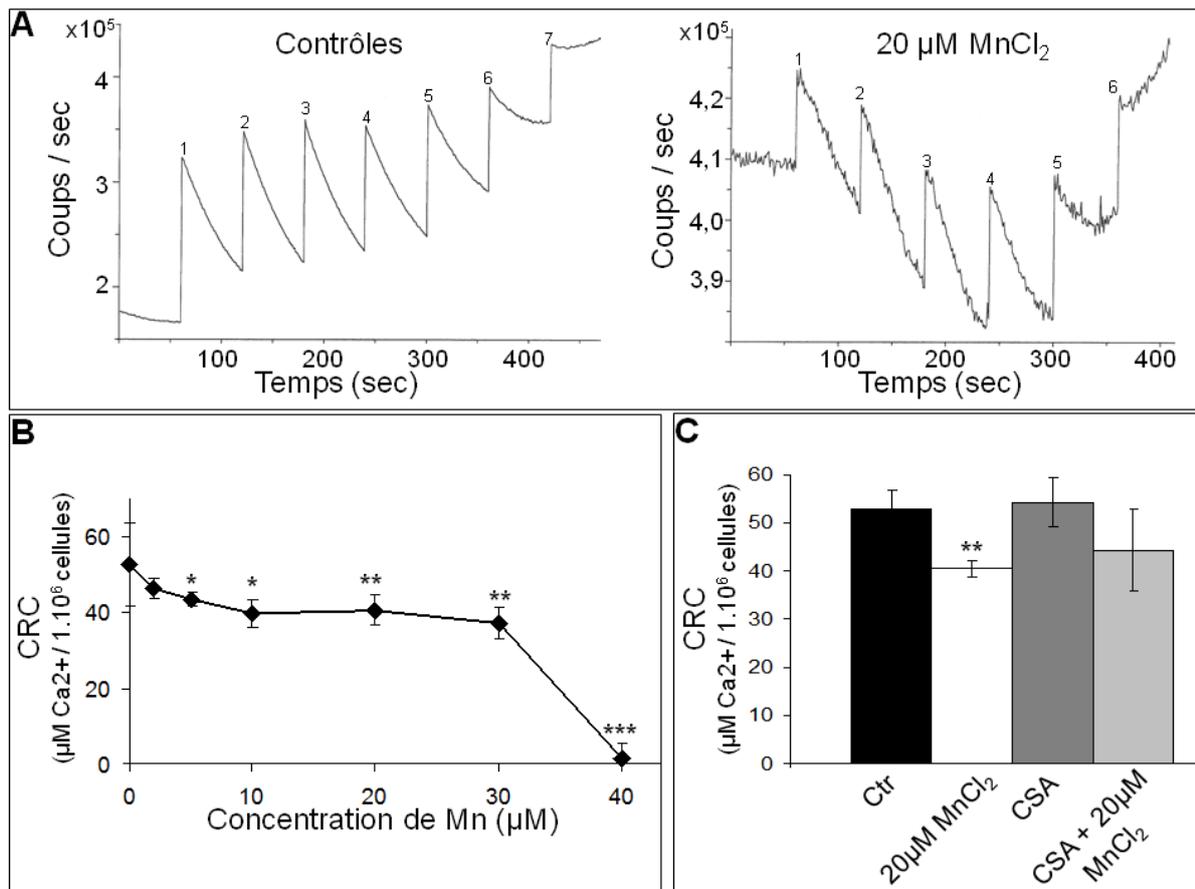


Figure 40 : Capacité de rétention calcique (CRC) mitochondriale à partir des cellules N2A, en présence et en absence de MnCl₂.

A. Evolution de la fluorescence calcique en fonction du temps des mitochondries contrôles et en présence de 20 μ M de Mn. Le nombre de pics diminue avec le Mn et le profil des pics est moins net (échelle plus petite).

B. CRC en fonction de la concentration en Mn. Elle diminue en présence de Mn dans le milieu extra-mitochondriale.

C. CRC en présence d'un inhibiteur de l'ouverture du mPTP, la cyclosporine-A (CSA, 1 μ M) avec ou sans Mn.

n= 8 expériences ; *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

A 30 μM de Mn pour les PC12 et à 40 μM pour les N2A, la CRC est proche de zéro : le mPTP s'ouvre spontanément. Nous constatons que la CRC n'est pas proportionnelle à la concentration de Mn dans le milieu extra-cellulaire aussi bien pour les PC12 ($p=0,34$) que pour les N2A ($p=0,10$).

L'action d'un inhibiteur du mPTP, la CSA, induit une augmentation de la CRC pour les PC12 ($48,7 \pm 2,8 \mu\text{M}$ de Ca^{2+}) par rapport aux contrôles ($36,7 \pm 2,7 \mu\text{M}$ de Ca^{2+}). A contrario, aucune action de cet inhibiteur n'est observée chez les N2A ($54,4 \pm 5,1 \mu\text{M}$ de Ca^{2+}) par rapport aux contrôles ($52,7 \pm 4,1 \mu\text{M}$ de Ca^{2+}). L'ajout de 20 μM de Mn en plus de la CSA ne modifie pas l'effet inhibiteur de la CSA pour les PC12 ($49,7 \pm 1,2 \mu\text{M}$ de Ca^{2+}). Par contre, cet ajout de Mn + CSA sur les N2A induit une diminution non significative de la CRC ($44,4 \pm 8,4 \mu\text{M}$ de Ca^{2+}) par rapport à la valeur moyenne de la CRC en présence de CSA.

4.3.5.2 Mitochondries extraites de tissu cérébral de rat

Nous observons que la CRC est proportionnelle à la concentration de Mn ($p<0,001$) (**Figure 41**). Elle diminue de façon linéaire de 5 à 150 μM de Mn et est nulle pour 200 μM de Mn. Pour une concentration de 50 μM de Mn, la CRC est de $61,1 \pm 5,6 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} alors qu'elle est de $78,8 \pm 2,2 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} pour les contrôles. L'inhibiteur CSA provoque une augmentation significative de la CRC ($102,6 \pm 2,5 \mu\text{M}$ de Ca^{2+}) qui n'est pas modifiée par l'ajout de 50 μM de Mn ($101,1 \pm 2,1 \mu\text{M}$ de Ca^{2+}).

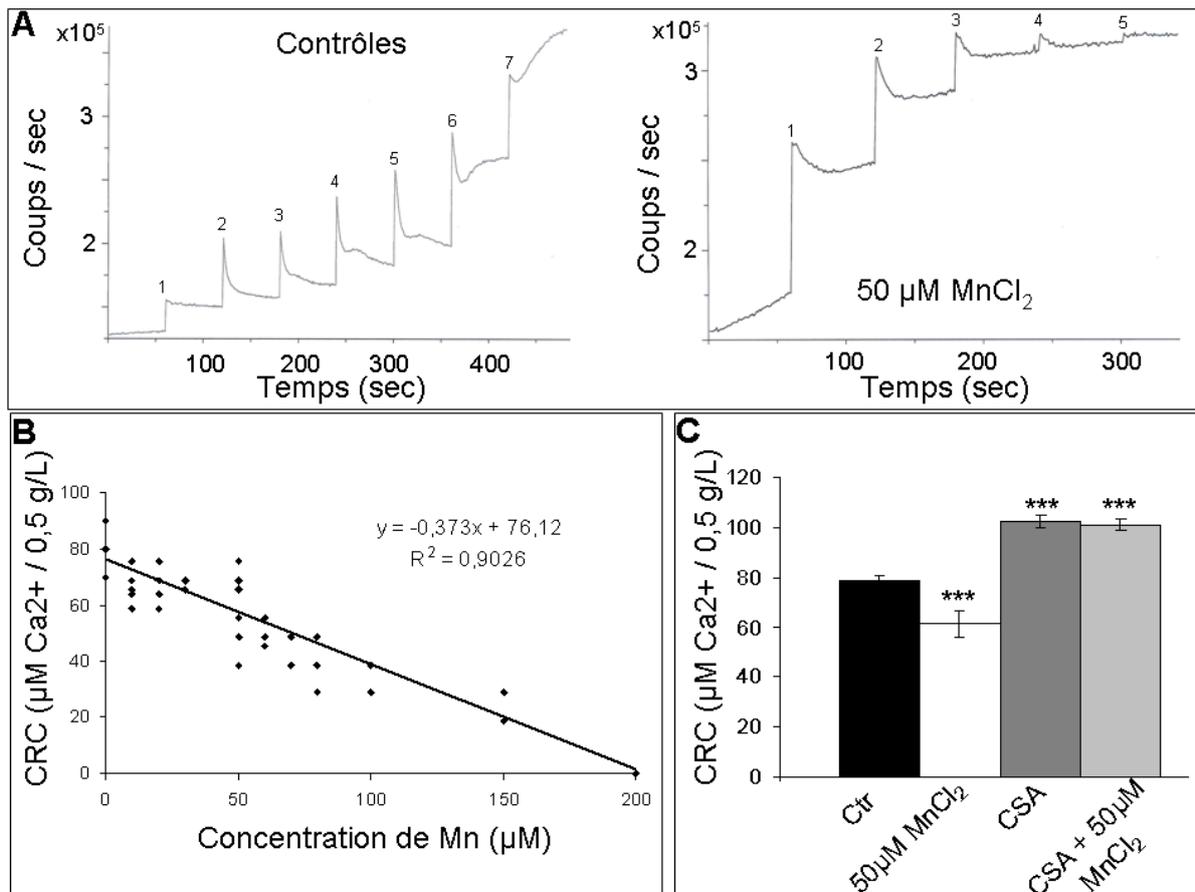


Figure 41 : Capacité de rétention calcique (CRC) mitochondriale à partir de tissu cérébral de rat, en présence et en absence de MnCl₂.

A. Evolution de la fluorescence calcique en fonction du temps des mitochondries contrôles et en présence de 50μM de Mn. Le nombre de pics diminue avec le Mn et le profil des pics est moins net.

B. La CRC en fonction de la concentration en Mn. Elle diminue proportionnellement à l'augmentation de Mn dans le milieu extra-mitochondrial. $p=0,0004$.

C. CRC en présence d'un inhibiteur de l'ouverture du mPTP, la cyclosporine-A (CSA, 1μM) avec ou sans Mn.

$n=10$ rats ; *** $p<0,001$.

4.3.6. Localisation du Mn par microscopie électronique

A ce jour nous ne sommes pas arrivés à localiser le Mn dans les cellules par microscopie électronique. Nous avons tout de même observé un gonflement des mitochondries en présence d'une dose sub-toxique de Mn (600 μM) dans les N2A et l'AG ne semble pas endommagé (**Figure 42**).

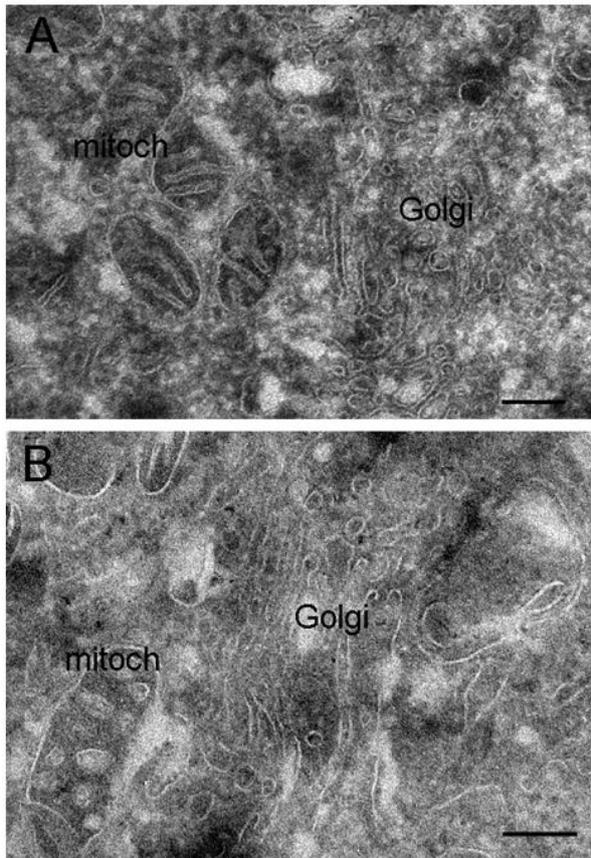


Figure 42 : Microscopie électronique des cellules N2A.

A. N2A contrôle. Nous pouvons voir l'AG et les mitochondries intactes.

B. N2A en présence de 600μM de Mn. L'AG est intacte alors que les crêtes des mitochondries sont larges, reflétant un gonflement mitochondriale.

Barre d'échelle=200 nm.

4.4. Discussion

Dans cette étude, nous précisons la distribution sub-cellulaire du Mn après ajout de cet ion dans les milieux de culture des cellules N2A et des NH primaires en utilisant l'imagerie synchrotron. La distribution du Mn est très localisée à dose sub-toxique (<DL50) et diffuse à dose toxique (>DL50). Pour les deux doses, l'imagerie synchrotron indique que le Mn a un effet sur le Ca et le Fe total dans nos conditions expérimentales. Les N2A et NH accumulent le Mn. En présence de 20 et 100 μM de Mn dans le milieu des NH, nous trouvons 50 et 161 $\mu\text{g/g}$ de Mn respectivement, dans le cytoplasme. Les organites cellulaires sont donc exposés à de fortes concentrations de Mn. Par la suite, nous avons étudié l'impact du Mn sur le phénotype neuronal (NH), la capacité de rétention calcique mitochondriale (mPC12, mN2A et mCR), le nombre et la vitesse de déplacement des mitochondries (NH). Les mesures de CRC montrent une induction de l'ouverture du mPTP par le Mn, favorisant la mort cellulaire. Nous avons observé une mort mitochondriale entre 20 et 200 μM de Mn et une incidence sur le transport mitochondrial dès 50 μM alors que les cellules ne meurent pas en totalité (DL50). Pour finir, une diminution du nombre et de la longueur des extensions par neurones a été mise en évidence à des doses sub-toxiques et toxiques de Mn.

Dose toxique de Mn (>DL50)

Nous avons déterminé la concentration de Mn induisant 50% de mortalité cellulaire ($\text{DL50}_{\text{N2A}}=628 \mu\text{M}$; $\text{DL50}_{\text{PC12}}=922 \mu\text{M}$ et $\text{DL50}_{\text{NH}}=90 \mu\text{M}$). Hernández et al ont déterminé la DL50 (5 jours après exposition au MnCl_2) de neurones granulaires du cervelet à deux stades de croissance : stade J1 (période de différenciation, début de production des neurites) et stade J6 (maturité cellulaire, réseau) (Hernández et al., 2011). A J1, le traitement au Mn commence et dure 5 jours, la DL50 est alors de $\sim 27 \mu\text{M}$. A J6, le traitement au Mn commence et dure 5 jours, la DL50 des neurones granulaires est de $\sim 60 \mu\text{M}$. Xu et al. obtiennent une $\text{DL50} = 200 \mu\text{M}$ de Mn sur des cultures primaires de neurones corticaux (neurones à J7, 48h après contact au Mn) (Xu et al., 2009). Aucune donnée de la littérature ne montre la DL50 des NH pour le Mn. Giordano et al. ont montré qu'une co-incubation de NH avec des astrocytes de cortex de rat préalablement exposés à du Mn n'entraînait pas de modification de viabilité des NH (Giordano et al., 2009).

Nous avons déterminé une DL50 de 90 μM (J4, 24h après contact au Mn) correspondant à la gamme de concentrations des DL50 des neurones corticaux et granulaires décrites dans la littérature. Concernant les cellules PC12, Roth et al. ont obtenu une $\text{DL50} = 600 \mu\text{M}$ de Mn, 24h après contact au Mn (Roth et al., 2000).

Carmona et al. n'indiquent pas la DL50 pour les PC12 mais à partir des valeurs rapportées (24h d'exposition entre 0 et 2 mM de Mn, DL75 = 300 μ M) nous pouvons estimer celle-ci à \sim 680 μ M (Carmona et al., 2009). Ces concentrations sont inférieures à celles que nous avons trouvées (922 μ M), toutefois, elles peuvent varier en fonction de différents paramètres tels que la concentration de cellules, la préparation du MnCl₂ et la technique utilisée pour le comptage cellulaire.

Peu de données de la littérature décrivent la DL50 des cellules N2A pour le Mn, cependant la valeur trouvée (628 μ M) semble cohérente avec celle des cellules PC12. Higashi et al. montrent une survie de 60% des cellules N2A 24h après ajout de 200 μ M de Mn dans le milieu (Higashi et al., 2004). Ces résultats suggèrent une DL50 à \sim 300 μ M de Mn, en dessous de la valeur que nous avons obtenue. Toutefois, ces expériences ont été effectuées sur des N2A non différenciées, en boîtes 96 puits, ce qui peut changer la capacité des cellules à accumuler le Mn. En extrapolant les résultats obtenus par Chtourou et al. sur la toxicité du Mn, nous déterminons une DL50 de \sim 800 μ M (Chtourou et al., 2011).

Nous pouvons également mentionner que les différents sous-clones à partir desquels les travaux ont été réalisés (PC12 et N2A) peuvent présenter des différences pouvant expliquer une variabilité des résultats obtenus entre les différents travaux. Nous constatons que les doses toxiques de Mn dépendent du type cellulaire. Les cultures primaires de neurones sont plus sensibles au Mn que les lignées cellulaires classiquement utilisées pour l'étude de la toxicité du Mn. Concernant les astrocytes (cortex de rat), il est intéressant de voir que Giordano et al. rapportent une DL50 de \sim 1000 μ M (Giordano et al., 2009). Ceci est à mettre en relation avec nos observations de séquestration du Mn dans les astrocytes de la FH, correspondant à une concentration de \sim 1900 μ M de Mn (cf. chapitre 3). Ces données font un lien intéressant entre ce qui est observé *in vivo* et *in vitro* sur des cultures primaires de cellules cérébrales.

Concentration du Mn dans les N2A et NH déterminées par synchrotron

Le Mn est trouvé à de faibles concentrations dans les tissus du système nerveux central (Aschner et Dorman, 2006). Notre précédente étude montre, dans l'hippocampe de rat, des concentrations physiologiques de Mn estimées par synchrotron à $2,5 \pm 1,6$ μ g/g de tissu sec dans les GD/CA3 et $2,0 \pm 0,9$ μ g/g de tissu sec dans la FH (Daoust et al., *in press*). Au niveau du modèle cellulaire N2A et des NH qui font l'objet de ce chapitre, les concentrations physiologiques de Mn obtenues dans notre étude sont de $24,1 \pm 1,8$ μ g/g de matière sèche de N2A et de $3,4 \pm 1,0$ μ g/g de matière sèche de NH. La concentration physiologique de Mn est par conséquent très élevée dans les cellules N2A. Les valeurs expérimentales de la concentration de

Mn dans les cellules sont rares. Carmona et al. rapportent des concentrations inférieures à 3 µg/g de matière sèche de cellules PC12 (Carmona et al., 2009).

Il est intéressant de noter les différences d'expression de la Mn-SOD (enzyme mitochondriale) étant de 1,43 unités/mg de protéine pour les N2A et de 0,4 unités/mg de protéine pour les NH (Cheng and Mattson, 1995; Chtourou et al., 2011). Cette différence peut expliquer, en partie, nos mesures de concentration en Mn 8 fois plus élevées dans les N2A que dans les NH.

Après addition de Mn dans le milieu de culture, la concentration intracellulaire de Mn augmente dans les cellules N2A et les NH. Pour les NH, l'ajout d'une dose sub-toxique (<DL50) augmente la concentration intracellulaire de Mn (50 ± 26 µg/g de matière sèche). La concentration de Mn est d'avantage augmentée après traitement à une dose toxique (161 ± 52 µg/g de matière sèche). Il en est de même pour les cellules N2A (dose sub-toxique : $627,5 \pm 149,1$ µg/g de matière sèche ; dose toxique : $1515,9 \pm 109,6$ µg/g de matière sèche). Les concentrations de Mn trouvées dans le modèle cellulaire sont largement plus élevées que dans les NH (+840% pour la dose toxique de Mn) montrant une meilleure capacité des N2A (cellules cancéreuses) à accumuler le Mn. Carmona et al. ont rapporté une concentration de 75 ± 45 µg/g de Mn dans les cellules PC12 24h après traitement au Mn par une dose sub-toxique de 300µM (Carmona et al., 2009). Cette concentration rapportée est 25 fois plus élevée que dans les contrôles alors que nous trouvons 26 fois plus pour les N2A et 16 fois plus pour les NH pour une dose sub-toxique. Ces données montrent que l'accumulation du Mn dépend du type cellulaire. Cette accumulation peut être due aux transporteurs de métaux présents au niveau de la membrane plasmique des cellules et, de ce fait, aux capacités d'efflux et d'influx du métal par les cellules.

Nos résultats précédents (chapitre 3), indiquent une concentration de 25 µg/g de Mn dans le CA3/DG après injection IC. Après ajout de 20 µM de Mn dans le milieu de culture des NH, nous observons deux fois plus de Mn, c'est-à-dire 50 µg/g de Mn. Nous pouvons alors supposer que les neurones sont exposés à ~10 µM de Mn suite à l'injection IC de Mn chez le rat. Cette dose est largement inférieure à la DL50 des NH (DL50 = 90 µM)

Distribution du Mn dans les N2A et NH

D'un point de vue spatial, le Mn est localisé dans le cytoplasme pour les deux types cellulaire étudiés. Après une dose sub-toxique (20µM pour les NH et 600µM pour les N2A), le Mn se retrouve accumulé dans une zone restreinte en périnucléaire. Par contre, après une dose toxique (100µM pour les NH et 1000µM pour les N2A), le Mn est plus diffus dans le cytoplasme, laissant penser à une exposition plus forte au Mn des différents organites cellulaires tels que le réticulum endoplasmique (RE),

l'appareil de golgi (AG), les mitochondries et surtout le cytosol dans son ensemble. Carmona et al. ont précédemment montré, avec la même technique, une localisation péri-nucléaire du Mn, particulièrement dans l'AG des cellules PC12 après traitement à des doses sub-toxiques de Mn (300 μ M, DL50=680 μ M) (Carmona et al., 2009). L'AG et le RE joueraient donc un rôle dans la détoxification du Mn, c'est-à-dire qu'il favoriserait l'efflux du Mn de la cellule (Culotta et al., 2005). Nous pouvons supposer qu'une fois ces systèmes saturés, le Mn se répartit dans le cytoplasme cellulaire induisant ainsi une toxicité au niveau du noyau et des mitochondries (cf. introduction, p68).

Impact du Mn sur l'homéostasie du Ca et du Fe dans les N2A et NH

Le Mn est connu pour avoir une forte similitude avec le Ca et le Fe (Aschner et Dorman, 2006). Nos travaux montrent une augmentation de la quantité totale de Ca dans les NH et les N2A exposés au Mn, en accord avec Xu et al qui ont précédemment montré une augmentation intracellulaire de Ca après contact au Mn dans les neurones corticaux (Xu et al., 2009).

Le Fe et le Mn sont chimiquement et biochimiquement similaires. Le Mn peut, de ce fait, interagir directement avec le Fe à une échelle cellulaire et sub-cellulaire et donc perturber l'homéostasie du Fe (Aschner et al., 2000 ; Carmona et al., 2009 ; Daoust et al., 2012). Nous avons montré une diminution du Fe dans les NH en accord avec nos travaux effectués sur l'hippocampe de rat (Chapitre 3 – Distribution du Mn dans l'hippocampe). De la même façon, Carmona et al. ont montré une diminution du Fe dans les cellules PC12 après contact de Mn. A l'inverse, nous avons observé une augmentation de la concentration en Fe pour les N2A. Une accumulation de cet ion dans les N2A a précédemment été montrée par Abreo et al. après une exposition à l'aluminium ayant un impact plus important sur le dysfonctionnement cellulaire que le Mn (Lai et al., 1982; Abreo et al., 1999).

Impact du Mn sur la CRC mitochondriale

Nous avons étudié l'impact du Mn sur la capacité de rétention calcique mitochondriale des mPC12, mN2A et mCR. Dans un premier temps, nous avons observé un tracé de fluorescence « bruité » en présence de Mn, dans toutes les expériences effectuées. Le fabricant indique que la sonde calcique fluorescente utilisée a une affinité pour le Mn comparable à celle du Ca. Nous pouvons supposer que le Ca et le Mn entrent en compétition dans le milieu extracellulaire induisant ainsi une perturbation de la fluorescence (Bernardi et al., 1992).

Nos résultats montrent une activation de l'ouverture du mPTP par le Mn pour les mN2A et les mCR. 20 μ M de Mn diminue la CRC de 20% pour les mN2A ($p = 0,08$), et 50 μ M de Mn diminue la CRC de 25% pour les mCR ($p = 0,000004$).

Il est connu que la mitochondrie joue un rôle critique dans l'initiation de la mort cellulaire. Un des éléments majeurs à l'origine de ce processus est le mPTP, qui s'ouvre en présence de fortes concentrations de Ca, ouverture favorisée par la présence d'un stress oxydant (Crompton, 1999; Halestrap et al., 2002). Bernardi et al. ont montré que le Mn²⁺ agit comme un inhibiteur du mPTP (Bernardi et al., 1992). Ces données vont à l'encontre de nos résultats qui montrent que le Mn est un inducteur du mPTP. Toutefois, les résultats de Bernardi et al. ont été obtenus à partir de mitochondrie extraites de foie. Il a été montré que le Mn, à des concentrations physiologiques est un ion essentiel au fonctionnement de l'enzyme anti-oxydante, la SOD-2 mitochondriale. Ceci suggère que le Mn soit un inhibiteur du mPTP, c'est-à-dire qu'il protège les cellules contre le stress oxydant (Chang et Kosman, 1989). Paradoxalement, à de plus fortes concentrations (entre 5 et 40 μ M pour les mN2A et entre 10 et 200 μ M pour les mCR), le Mn induit un stress oxydant pouvant activer l'ouverture du mPTP (Chapitre 1, Malecki, 2001). L'ouverture du mPTP est sensible au stress oxydant. A l'inverse, il a été montré que cette ouverture induit la production de ROS au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Batandier et al., 2004). Pour finir, il a été montré que le complexe I est directement altéré en présence de Mn (Zhang et al., 2003). Le processus d'ouverture du mPTP peut, par conséquent, être représenté par une boucle auto-entretenu avec la création d'un stress oxydant par le Mn, l'ouverture facilitée du mPTP, la production de ROS, l'altération de la chaîne respiratoire, la libération des facteurs apoptotiques menant à la mort cellulaire (**Figure 43**).

La mort mitochondriale a été observée pour des concentrations de Mn de 30 μ M pour les mPC12, 40 μ M pour les mN2A et 200 μ M pour les mCR. Ces concentrations ne peuvent cependant pas être directement comparées car nous avons utilisé des quantités différentes de cellules et donc de mitochondries (2.10⁶ cellules PC12/mL ; 1.10⁶ cellules N2A/mL et 0,5 g de protéines/L de mCR). De plus, le nombre de mitochondries par cellule varie selon le type cellulaire et l'activité de la cellule. Les N2A semblent avoir plus de mitochondries que les PC12. Il serait utile de doser la citrate synthase qui est un reflet de la concentration mitochondriale des cellules afin de pouvoir comparer nos résultats.

Les doses toxiques mitochondriales sont plus faibles que les DL50 (~800 μ M).

Concernant les mPC12, le Mn n'influe pas l'ouverture du mPTP jusqu'à une dose toxique de 30 μ M. Ces mitochondries présentent sans doute un système de détoxification du Mn différent des mN2A et des mCR. En effet, nous avons montré

que la DL50 est plus élevée pour les PC12, ce qui suggère un potentiel d'accumulation ou de détoxification du Mn plus élevé chez les PC12 que les N2A. Ces données montrent que le Mn est un inducteur du mPTP et que son action sur la CRC mitochondriale diffère selon les types cellulaires.

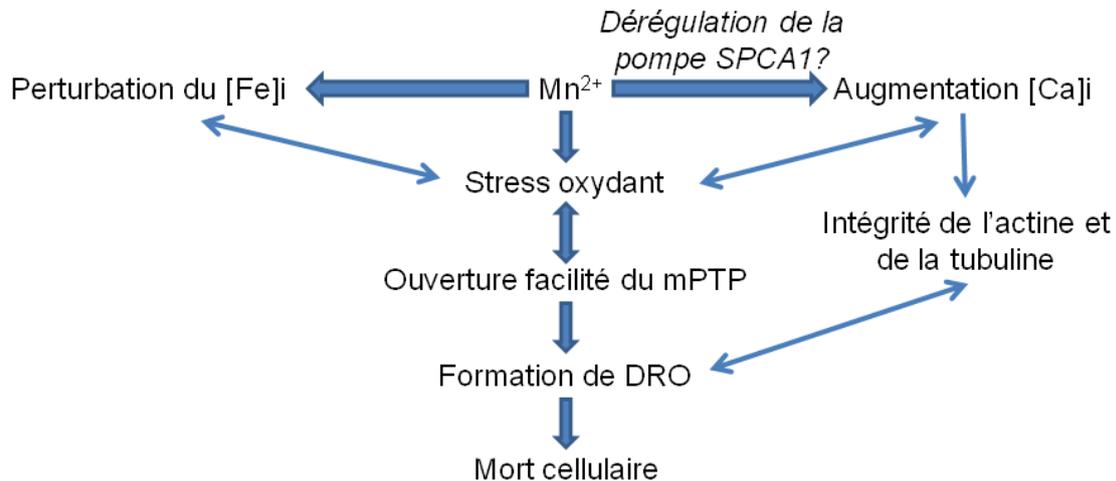


Figure 43 : Schéma récapitulatif des effets d'un excès de Mn sur la physiologie cellulaire. En excès, le Mn induit un stress oxydant et l'ouverture du mPTP favorisant la mort cellulaire. Nous avons observé une perturbation du Fe et du Ca total, susceptible de mener également à la mort cellulaire.

Impact du Mn sur les mitochondries et la morphologie neuronale

Un effet dose a été observé sur l'intégrité neuronale par des marquages immunologique de l'actine et de la tubuline. En effet, nous avons observé une diminution de la taille et de la longueur des extensions neuronales. Ces données sont en désaccord avec les travaux de Giordano et al. sur les NH et de Lein et al. sur les PC12 (Giordano et al., 2009 ; Lein et al., 2000). Toutefois, les résultats ne peuvent pas être directement comparés car les NH proviennent d'embryon de rat et non de souris et les PC12 sont des cellules cancéreuses.

Le nombre de mitochondries ne semble pas être influencé par la présence de Mn, cependant leur vitesse de déplacement est ralentie. Nous savons que les déplacements mitochondriaux sont liés au réseau microtubulaire. Par conséquent le Mn peut induire un problème microtubulaire et/ou mitochondriale. Bhattachary et al., ont montré, *in vitro*, que le magnésium (0,5 mM) induit des changements de la structure de la tubuline (polymérisation). Cet effet est magnésium dépendant et ne peut être remplacé que par le Mn (forte affinité du Mn pour la tubuline). Il est donc possible que le Mn joue un rôle dans la conformation de la tubuline, menant, à forte concentration, à sa dépolymérisation (Buttlaire et al., 1979). La dépolymérisation de

la tubuline peut être également due à un effet indirect du Mn, par exemple via la cascade apoptotique mitochondriale.

Aucun travail n'a étudié l'impact du Mn sur le réseau d'actine. Il est cependant possible que le Mn induise une perturbation de l'actine, limitant ainsi la taille des extensions cellulaires. En effet, tout comme pour la tubuline, l'actine G est associée à un cation divalent tel que le Ca ou le Mg. Le Mn pourrait alors remplacer l'un de ces ions.

Mn et stress oxydant

Kowara et al. ont montré que le stress oxydant augmente la concentration de Ca intracellulaire. En effet, le stress oxydant induit par la troncature de DPYSL3 (joue un rôle dans la différenciation neuronale, la pousse axonale et la régénération neuronale) est totalement dépendante de la concentration extracellulaire de Ca. De plus, la troncature de la calpaïne médiée par DPYSL3 peut avoir un impact sur son interaction avec l'actine et leur assemblage et sur l'intégrité du cône de croissance (Kowara et al., 2006). D'autres études appuient ces données en montrant le lien entre la destruction de l'actine, le stress oxydant et l'altération de la concentration de Ca cytosolique (Tiago et al., 2011 ; Vimard et al., 2011).

Il a été montré que le Mn et le Ca sont des cofacteurs importants pour la régulation des activités cellulaires telles que les cascades de signalisations, le processus de transport de protéines, le trafic membranaire et la différenciation neuronale (Ye et al., 2007; Chua and Tang, 2008; Yin et al., 2008). La "secretory pathway Ca-ATPase" (SPCA1) est une pompe trouvée dans les membranes de l'AG, essentielle pour la régulation de l'homéostasie du Ca et du Mn. Sepúlveda et al. ont montré que la suppression de cette pompe dans les cellules N2A induit une diminution de la taille des neurites et des axones et une perturbation de l'homéostasie du Ca (Sepúlveda et al., 2009). La suppression partielle de l'expression de la pompe SPCA1 induit les mêmes effets sur les NH que pour les N2A alors qu'une suppression totale induit une mort cellulaire des NH. Plus généralement, un stress de l'AG et du RE résulte en une insuffisance des pompes Ca, menant à une réponse de stress oxydant par la cellule (Shull et al., 2011).

Nous pouvons supposer que le Mn, à des doses sub-toxiques est accumulé dans l'AG et régulé grâce à la pompe SPCA1. A dose toxique (>DL50), le Mn induit sans doute une dérégulation de la pompe SPCA1 menant à une perturbation de l'homéostasie du Ca et du Mn. Dans les deux cas, l'excès de Mn induirait une dérégulation de la différenciation neuronale, d'où une diminution de la taille des neurites. Il y a donc un lien étroit entre l'augmentation de calcium intracellulaire déterminée par synchrotron, l'induction de la transition de perméabilité mitochondriale et le

ralentissement de la vitesse de déplacement mitochondriale en réponse à un stress oxydatif généré par le Mn, menant à la mort cellulaire. Les principaux résultats sont résumés dans la **Figure 43**.

Perspectives

Afin de compléter les données obtenues après imagerie SR-XRF, il serait intéressant de mesurer la concentration intracellulaire de Ca par imagerie calcique (sonde Fura-2 par exemple) après contact au Mn pour les cellules étudiées. Mais aussi de déterminer les organites cibles soit par microscopie électronique soit par des techniques de biologie moléculaire (transduction).

De plus, il serait intéressant de mesurer l'effet du Mn sur des microfilaments de tubuline et/ou d'actine *in vitro*. En effet, le Mn est transporté le long des microtubules. Les études MEMRI permettent de caractériser l'état fonctionnel cérébral. Si le Mn, à fortes doses, induit la dépolymérisation des microtubules et/ou de l'actine, cela peut compromettre les résultats obtenus en MEMRI. Il serait aussi intéressant de différencier les axones et les neurites par marquage immunofluorescent afin de déterminer si la diminution des extensions induite par le Mn touche les axones, les neurites ou les deux.

Pour finir, il serait intéressant d'effectuer les mêmes expériences à partir de co-culture astrocytes/neurones. En effet, *in vivo*, il est connu que les astrocytes accumulent le Mn (détoxification du cerveau). Les concentrations de Mn trouvées dans les neurones, en présence de cellules gliales, seront sûrement plus faibles et la toxicité du Mn serait sans doute diminuée. En effet, *in vivo*, après injection IC de Mn, nous trouvons une concentration plus faible de Mn (460 μM) que dans les NH (3000 μM).

En conclusion, nos résultats montrent une distribution du Mn dans la région péri-nucléaire pour des doses sub-toxiques (<DL50) et une distribution diffuse dans le cytoplasme et le noyau à des doses toxiques (>DL50). Les deux types de traitements au Mn induisent une augmentation de Ca total et une perturbation du Fe total ce qui suggère une compétition du Mn avec ces métaux. De plus, le Mn induit une perturbation du déplacement mitochondrial ainsi qu'une diminution des extensions neuronales suggérant une perturbation du réseau microtubulaire. L'ouverture du mPTP est accélérée en présence de Mn montrant le potentiel du Mn à induire un stress oxydatif menant à la mort neuronale. La combinaison des différentes techniques synchrotrons, immunofluorescence et CRC a permis une meilleure compréhension du comportement du Mn à l'échelle sub-cellulaire.

Chapitre 5 - Impact du Mn sur le métabolisme hippocampique, analyses par résonance magnétique nucléaire haute résolution à angle magique (RMN-HRMAS)

5.1. INTRODUCTION	112
5.1.1. RMN HRMAS DU PROTON	113
5.2. MATERIELS ET METHODES	122
5.2.1. ANIMAUX ET GROUPES	122
5.2.2. PREPARATION DU $MnCl_2$	122
5.2.3. CHIRURGIE ET INJECTION DU TRACEUR PAR VOIE INTRACEREBRALE	122
5.2.4. IRM <i>IN VIVO</i>	122
5.2.5. PRELEVEMENT DES HIPPOCAMPE	122
5.2.6. ANALYSES <i>EX VIVO</i> PAR RMN HRMAS DU PROTON	124
5.2.7. ANALYSES EN RMN DU LIQUIDE <i>IN VITRO</i>	125
5.2.8. ANALYSE DES DONNEES IRM	126
5.2.9. STATISTIQUES	126
5.3. RESULTATS	127
5.3.1. DISTRIBUTION DU MN DANS L'HIPPOCAMPE DE RAT APRES MEMRI	127
5.3.2. EFFET DU MN SUR LES SPECTRES HRMAS DE L'HIPPOCAMPE	127
5.3.3. IMPACT DU MN SUR LE METABOLISME HIPPOCAMPIQUE	133
5.4. DISCUSSION	138
5.4.1. DETECTION INDIRECTE DU MN DANS LES BIOPSIES	138
5.4.2. IMPACT DU MN SUR LE METABOLISME	140

- A. Daoust, E. L. Barbier, S. Bohic, S. Maunoir-Regimba and F. Fauvelle. Effect of manganese chloride on rat hippocampus metabolism studied by proton HRMAS NMR. SFRMBM 2012, Marseille (France).
- A. Daoust, E. L. Barbier, S. Bohic, S. Maunoir-Regimba and F. Fauvelle. Effect of manganese on rat hippocampus metabolism studied by proton HRMAS NMR. ESMRMB 2012, Lisbonne (Portugal).

5.1. Introduction

Après avoir précisé la localisation cellulaire (hippocampe) et sub-cellulaire (neurones hippocampiques) du Mn, nous étudions, dans ce chapitre, l'impact du Mn sur le métabolisme cérébral hippocampique.

Nous rappelons que le manganèse est neurotoxique à forte dose, provoquant le manganisme (voir chapitre 1, p.10). Les principaux effets rapportés dans la littérature sont rappelés dans la revue de Quintanar (Quintanar, 2008) et concernent notamment :

- le dysfonctionnement mitochondrial menant à la perte d'énergie cellulaire ;
- l'activation des protéases et la mort par apoptose ;
- l'altération des neurotransmetteurs et l'excitotoxicité ;
- l'oxydation engendrée par le Mn (notamment sur la dopamine) ;
- plus globalement, la perturbation du métabolisme cérébral.

Au niveau mitochondrial, le manganèse affecte l'activité des enzymes du cycle de Krebs telles que la citrate synthase et la malate déshydrogénase (Malthankar et al., 2004). Les enzymes de la glycolyse seraient aussi perturbées, telles que l'hexokinase, la pyruvate kinase, la lactate déshydrogénase. De plus, plusieurs études ont rapporté l'altération du niveau de neurotransmetteurs tels que la dopamine, la glutamine et l'acide γ -amino-butérique (GABA) notamment au niveau des cellules astrocytaires (Erikson and Aschner, 2003; Fitsanakis and Aschner, 2005; Fitsanakis et al., 2006). La concentration extracellulaire d'acides aminés tels que l'aspartate, le glutamate et la taurine, et la concentration de métaux tels que le Zn, le Cu et le Mn sont régulés par les astrocytes. Des études sur des cultures primaires d'astrocytes exposées au Mn suggèrent qu'il y aurait une diminution de la capture de glutamate, ce qui augmenterait l'effet excitotoxique du glutamate sur les neurones. De plus, la diminution de la capture de glutamate a été associée avec une diminution de l'expression du gène du transporteur glutamate/aspartate (GLAST) dans des astrocytes exposés au Mn. D'autres études ont montré qu'une réduction de la capture de glutamate par les astrocytes pourrait être une conséquence de la formation de ROS (Erikson and Aschner, 2003).

La plupart des travaux étudiant l'impact du manganèse sur le métabolisme ont été effectués à partir de lignées cellulaires et/ou culture primaire astrocytaires. Cependant peu d'études ont employé des cultures primaires neuronales et/ou des tissus cérébraux *ex vivo* suite à un traitement au $MnCl_2$. Zwingmann et al. ont étudié le métabolisme du glucose marqué au ^{13}C par RMN liquide ^{13}C sur des cultures primaires de neurones et d'astrocytes après un traitement à 100 μM de $MnCl_2$

(Zwingmann et al., 2003) ; et sur du tissu de cerveau de rat (globus pallidus et cortex frontal) après injection en IP de $MnCl_2$ (50 mg/Kg/jour) pendant 4 jours (Zwingmann et al., 2004, 2004) ou après injection IP (2mg/Kg/jour) pendant 21 jours (Bagga and Patel, 2012). Cependant, à ce jour, très peu de travaux ont étudié le métabolisme général (acides aminé, NT, marqueur de mort neuronal...) cellulaire dans le tissu cérébral après une exposition au Mn.

L'objectif de cette étude est de déterminer l'impact du Mn, à des concentrations utilisées lors des expériences MEMRI de tract-tracing (c'est-à-dire une seule injection d'une solution de $MnCl_2$ en intra-cérébral), sur le métabolisme neuronal et astrocytaire. Pour cela, nous avons établi une collaboration avec Florence Fauvelle, du laboratoire de RMN de l'IRBA-CRSSA, avec qui ces travaux ont été effectués. Le métabolisme du tissu cérébral suite à l'injection de Mn a alors été étudié par spectroscopie RMN haute résolution à l'angle magique (RMN-HRMAS).

Nous exposerons dans un premier temps quelques notions de RMN-HRMAS puis de biochimie afin d'aider à la compréhension des résultats de cette étude.

5.1.1. RMN HRMAS du proton

5.1.1.1 Principe

Dans un liquide, l'environnement autour d'une molécule est en moyenne isotrope c'est-à-dire que son environnement est le même dans toutes les directions de l'espace. En effet, les mouvements moléculaires sont très rapides par rapport aux variations des interactions affectant les spins nucléaires et la molécule observée adopte toutes les directions de l'espace (Bon, 2007). A l'inverse, les solides sont anisotropes puisque les mouvements moléculaires sont ralentis voire inexistant. De ce fait, diverses interactions, moyennées dans les liquides, s'expriment dans les solides, tels que le couplage dipolaire ou l'anisotropie de déplacement chimique, résultant en un élargissement des pics du spectre, qui peut devenir inobservable. Ces interactions sont pour la plupart dépendantes d'un facteur $(3 \cdot \cos^2(\Theta) - 1)$, Θ angle par rapport au champ principal B_0 .

L'angle magique est l'angle Θ permettant d'imposer la condition suivante :

$$3 \cdot \cos^2(\Theta) - 1 = 0$$

Il est donc de $54,7^\circ$.

La rotation rapide de l'échantillon (de l'ordre du kHz) permet d'imposer une orientation moyenne des spins nucléaires à l'angle magique par rapport au champ

magnétique B_0 . La vitesse de rotation doit être de l'ordre de l'interaction, et peut donc être très élevée dans certains solides (des dizaines de KHz). Ainsi, la rotation rapide à l'angle magique conduit à un rétrécissement des pics et donc à une amélioration de la résolution fréquentielle. Cette technique de « Magic Angle Spinning » est connue depuis longtemps pour les solides, particulièrement pour les hétéronoyaux (^{13}C Cross Polarization-MAS NMR).

La RMN-HRMAS est plus récente et dérive de cette technique MAS des solides. Elle s'adresse plutôt à des échantillons mous, dans lesquels le mouvement des molécules existe : c'est la RMN des échantillons hétérogènes. Les tissus biologiques sont donc particulièrement concernés. Dans ces échantillons, la principale cause d'élargissement est l'inhomogénéité de susceptibilité magnétique, et il a été montré que cette interaction pouvait se modéliser par une interaction proportionnelle à $3.\cos^2(\Theta) - 1$ (Lippens et al., 2001). D'autre part, c'est une interaction faible qui ne nécessite pas une rotation rapide (par rapport aux solides), quelques milliers de Hz sont suffisants.

Ainsi, il est possible de réaliser un spectre RMN-HRMAS proton de biopsie qui possède une résolution fréquentielle équivalente à un spectre RMN-HRMAS d'extrait.

En conclusion, la RMN-HRMAS permet l'analyse d'un échantillon biologique brut *post mortem* de petite taille (10-15 mg), sans étape de préparation donc sans perte de matière, de façon rapide et reproductible. Cela permet notamment de cibler des structures cérébrales de petite taille : c'est cet avantage qui a été exploité dans ce travail.

5.1.1.2 Applications

Les expériences de RMN-HRMAS haute résolution du proton (^1H) permettent de détecter les métabolites solubles (acides aminés, métabolites du cycle de Krebs, métabolisme énergétique...) et de rechercher de nouveaux métabolites (Viant et al., 2005). C'est la technique la plus sensible en spectroscopie notamment pour les études du métabolisme tumoral (Wright et al., 2010). Elle permet de différencier les types de tumeurs (astrocytome de grade II, gliomes, glioblastomes, métastases, méningiomes et lymphomes) chez l'homme (Spratlin et al., 2009). La RMN-HRMAS est aussi utilisée en recherche pré-clinique (rongeur) pour l'étude de thérapies comme par exemple un traitement au Scyllo-inositol qui pourrait protéger l'organisme contre la toxicité des plaques $\text{A}\beta$ dans la maladie d'Alzheimer (Choi et al., 2010).

5.1.2. Analyse des données RMN-HRMAS

Les spectres RMN-HRMAS du proton sont constitués d'un très grand nombre de composantes spectrales superposées, et de pics très larges dus aux lipides et macromolécules présents dans le tissu intact. Leur quantification est complexe et le recours à des algorithmes de quantification semi-automatique est nécessaire. C'est pourquoi nos données RMN-HRMAS ont été quantifiées avec l'algorithme QUEST inclus dans le logiciel jMRUI (Java-based version of the Magnetic Resonance User Interface (Graveron-Demilly et al., 1993), <http://www.mrui.uab.es/mrui/>). Ce logiciel était dédié à l'origine au traitement des données issues de la spectroscopie *in vivo*, et il a été adapté à la problématique HRMAS. La procédure de traitement du signal est rapidement décrite ci-dessous et de façon plus détaillée dans l'article de Rabeson et al. (Rabeson et al., 2008). Ce logiciel utilise une approche semi-paramétrique du signal temporel (Ratiney et al., 2004). La composante paramétrique est générée en combinant (linéairement) des signaux simulés d'une base de métabolites. Les signaux ont été simulés avec le module NMRSCOPE de jMRUI à partir des systèmes de spins connus (Govindaraju et al., 2000) et à partir des paramètres d'acquisitions expérimentaux (temps d'échantillonnage, amortissement). 23 signaux de métabolites ont été inclus dans la base. La simulation a été effectuée pour un champ de 9,4T avec un facteur d'amortissement de 2 Hz (**Figure 44**). Les attributions des signaux des spectres ont été établies à partir des données de la littérature (Govindaraju et al., 2000).

Avant l'étape même de quantification, une étape importante de pré-traitement des données est réalisée : les signaux sont phasés et la région d'intérêt, comprise entre 0,5 et 4,5 ppm, est filtrée (procédure appelée « ER-filter » pour « extraction and reduction of the spectral bandwidth ») (Cavassila et al., 1997).

Les pics très larges de lipides et de macromolécules, qui distordent la ligne de base, sont gérés par le module subtract-QUEST (Ratiney et al., 2004), à partir des premiers points du signal.

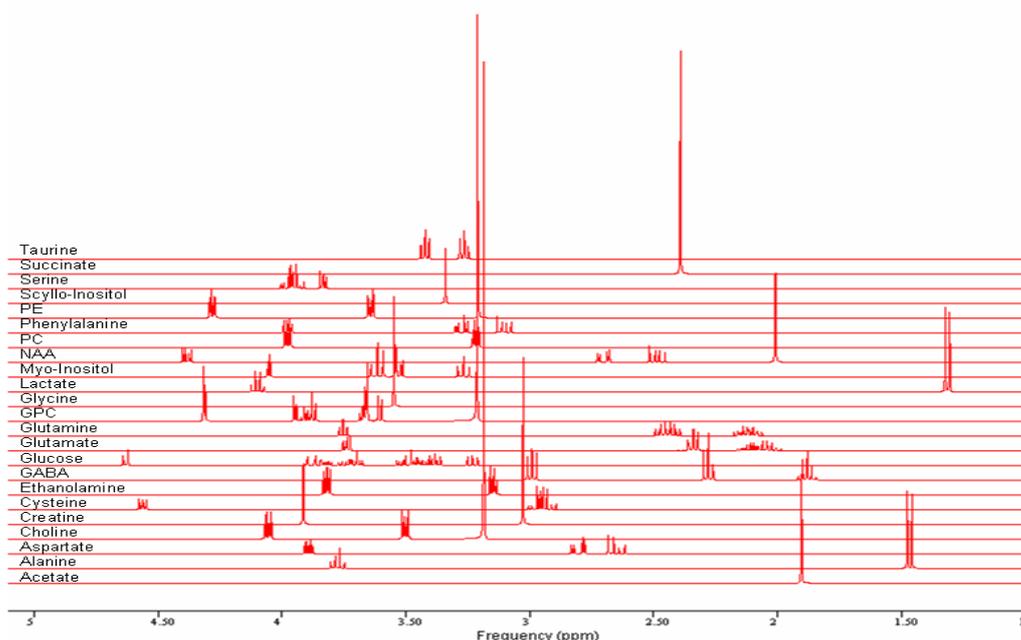


Figure 44 : Base de données simulée des signaux des métabolites (NMRSCOPE)

Cette base est utilisée pour la quantification des signaux HRMAS de cerveau de rongeur (Rabeson et al., 2008).

PE : phosphoéthanolamine; PC : phosphorylcholine; NAA : N-acétyl-aspartate; GPC : glycérophosphocholine; GABA : acide γ -amino-butérique.

Etant donné que le Mn élargit certaines raies telles que le lactate, le glutamate et le NAA (cf. résultats), la base a été adaptée à l'élargissement de ces métabolites uniquement afin de quantifier au mieux les spectres obtenus en présence de Mn (**Figure 45**). En effet, des amortissements largement supérieurs à ceux de la base lors de la quantification sont autorisés, cependant cela génère des erreurs dans l'ajustement de la ligne de base par la méthode subtract-QUEST. La solution d'adapter la base pour les signaux très élargis a donc été adoptée.

5.1.3. Métabolites observables en RMN HRMAS

Environ 37 métabolites sont détectables grâce à cette technique dans des biopsies intactes de cerveau de rongeur. Parmi ceux-ci, 17 métabolites sont quantifiables de façon semi-automatique grâce au logiciel QUEST (Ratney et al., 2004) utilisé dans notre étude (voir la partie « matériels et méthodes », p.122) :

Alanine (Ala)	Aspartate (Asp)	Créatine (Cr)
Choline (Cho)	Acide γ -amino-butyrique (GABA)	Glutamate (Glu)
Glutamine (Gln)	Glutathion (GSH)	Glycérophosphocholine (GPC)
Glycine (Gly)	Lactate (Lac)	Myo-inositol (m-Ins)
N-acétyl-aspartate (NAA)	Phosphoéthanolamine (PE)	Phosphorylcholine (PC)
Scylloinositol (s-Ins)	Taurine (Tau)	

Comme nous le rappelons brièvement ci-dessous, la plupart de ces métabolites interviennent dans le métabolisme énergétique.

Les oses et polyosides ingérés lors de l'alimentation entrent dans la glycolyse pour générer 2 molécules d'ATP et donner du pyruvate. En situation anaérobie (sans oxygène), le pyruvate va donner du lactate afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP. Dans la situation la plus courante d'aérobiose, le pyruvate, via la glycolyse, va donner de l'acétyl-Coenzyme A dégradé dans le cycle de Krebs pour fournir les coenzymes nécessaire à la production de 38 molécules d'ATP dans la chaîne respiratoire mitochondriale. L'acétyl-Coenzyme A donne lieu à plusieurs transformations pour arriver à la formation de l' α -cétoglutarate.

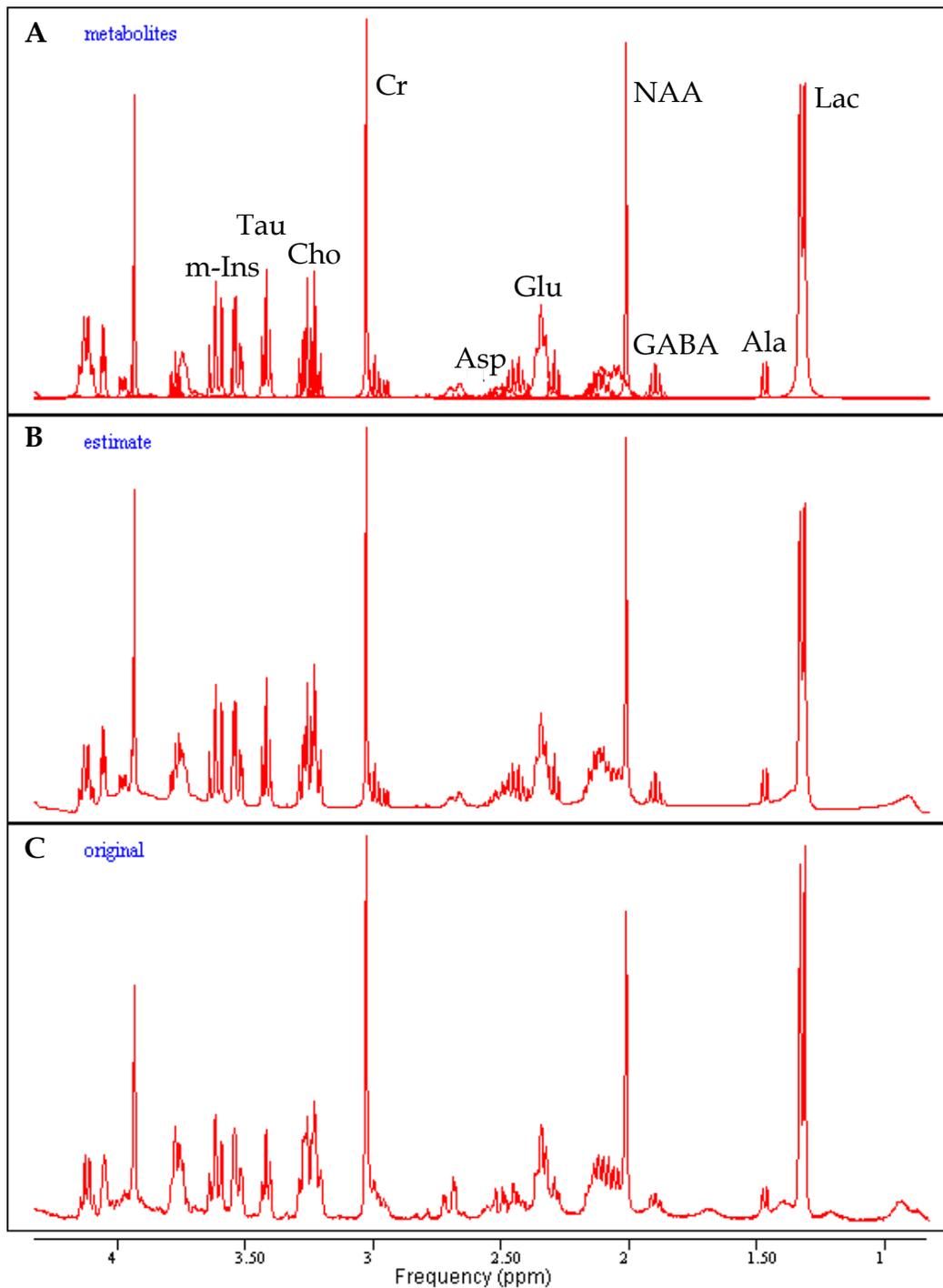


Figure 45 : Exemple de spectre expérimental quantifié après adaptation de la base à l'élargissement du NAA, glutamate et lactate.

- A. métabolites estimés (sans lipides ni macromolécules)
- B. métabolites estimés
- C. métabolites expérimentaux (Hippocampe contrôle)

Par action de la glutamate déshydrogénase (GDH), l' α -cétoglutarate donne du glutamate qui à son tour forme de la glutamine (enzyme : glutamine synthase) et du GABA (enzyme : glutamate décarboxylase). Finalement, le malate formé vers la fin

du cycle de Krebs donne de l'oxaloacétate (enzyme : malate déshydrogénase) donnant lui-même de l'aspartate. Cependant, l'oxaloacétate étant le dernier acide du cycle, il doit être régénéré. En effet, il est très important pour la navette malate/aspartate qui joue un rôle dans la formation du glutamate et de l'aspartate. Ce sont les astrocytes qui dégradent le pyruvate (enzyme : pyruvate décarboxylase) pour redonner de l'oxaloacétate (**Figure 46**).

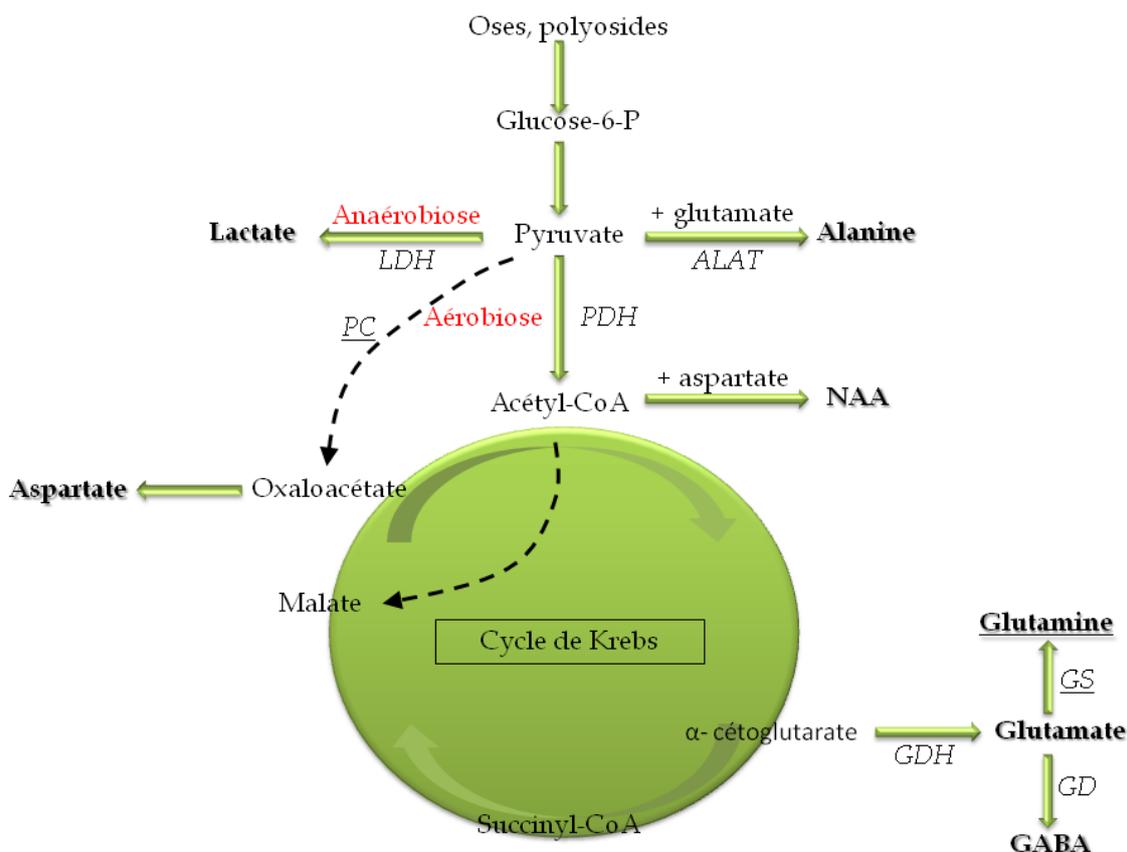


Figure 46 : Schéma du métabolisme énergétique.

La glycolyse (dans le cytoplasme cellulaire) dégrade le glucose en pyruvate. L'acétyl-Co-A entre dans le cycle de Krebs (dans la membrane mitochondriale) pour produire de l'énergie et des acides aminés. Les enzymes et métabolites soulignés sont astrocytaires. Les métabolites analysés en RMN-HRMAS sont en gras.

Les enzymes sont en italique. *ALAT* : alanine amino transférase ; *GD* : glutamate décarboxylase ; *GDH* : glutamate déshydrogénase ; *GS* : glutamine synthétase ; *LDH* : lactate déshydrogénase ; *PC* : pyruvate décarboxylase ; *PDH* : pyruvate décarboxylase.

Il y a différentes navettes dans le cycle énergétique, notamment entre les neurones et les astrocytes. Les principales navettes sont :

- La navette malate/aspartate (réversible) qui met en jeu deux produits du cycle de Krebs. L'oxaloacétate produisant de l'aspartate et l' α-cétoglutarate permettant de

produire du glutamate entre le cytosol de la cellule et la matrice mitochondriale. Il a été montré que la « Ca²⁺-sensitive aspartate-glutamate carrier aralar1 » (AGC1) est principalement trouvée dans les neurones (très peu dans les astrocytes) (Ramos et al., 2003). Elle est essentielle pour la production des neurotransmetteurs. L'inhibition de cette navette peut entraîner la mort neuronale (McKenna et al., 2006).

- Navette glutamate/ glutamine (Zwingmann and Leibfritz, 2003)

La glutamine est synthétisée dans les astrocytes à partir du glutamate neuronal. Elle est ensuite utilisée par le neurone pour donner du glutamate comme NT (**Figure 47**).

- Navette lactate : le lactate serait formé à partir du pyruvate dans les astrocytes en condition aérobie et transféré vers les neurones en tant que substrat énergétique (Pellerin and Magistretti, 1994). Cette théorie est toujours sujette à controverse bien que de nombreux travaux l'alimentent.

- Les navettes alanine-lactate et leucine-kétoisocaproate (KIC) utilisent l'ammoniaque produit lors de la transformation glutamine-glutamate, dans le but, respectivement, de donner du pyruvate ou d'échanger la leucine et le KIC entre neurones et astrocytes (**Figure 47**).

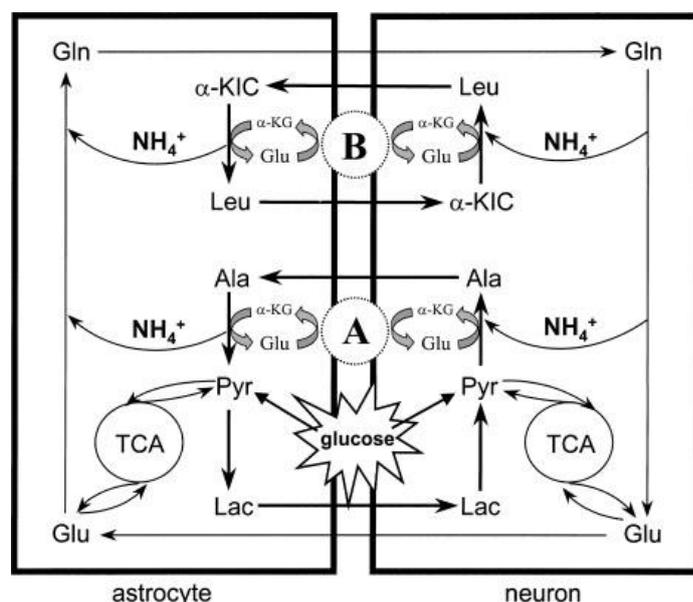


Figure 47: Cycle du glutamine-glutamate dans le cerveau complété avec les navettes alanine-lactate (A) et leucine- kétoisocaproate (B) entre les neurones et les astrocytes.

Glutamate (Glu), glutamine (Gln), alanine (Ala), lactate (Lac), leucine (Leu), kétoisocaproate (KIC) (Zwingmann and Leibfritz, 2003).

On constate que, certains métabolites et certaines enzymes ont tendance à être présents plutôt dans des cellules astrocytaires ou des neurones (**Tableau 12**).

	Astrocytes	Neurones
Métabolites	Acétate	Alanine Succinate
	Myo-inositol	Glutamate NAA
	Glutamine	GABA
	Taurine	Aspartate
	Lactate	Leucine
Enzymes	Glutamine Synthétase (GS)	Glutaminase
	Pyruvate Carboxylase (PC)	Alanine aminotransférase (ALAT)

Tableau 12 : Distribution préférentielle des métabolites et des enzymes entre neurones et astrocytes

5.2. Matériels et Méthodes

5.2.1. Animaux et groupes

Un total de 16 rates femelles, de souche Sprague-Dawley, (230 ± 11 g, Charles Rivers, France) a été utilisé. Un groupe contrôle (contrôle, $n = 8$) et un groupe auquel du Mn a été administré (Mn, $n = 8$). Toutes les expériences ont été effectuées sous anesthésie générale avec un mélange d'isoflurane (IsoFlo, Axience, France) et d'air (induction : 5% dans air, maintien : 2% dans air enrichi en O_2 à 40%). La température rectale a été monitorée et maintenue à environ $37^\circ C$ à l'aide d'une couverture chauffante. Pour des raisons d'éthique et donc de bien être animal, le comportement des rats (inspection visuelle de la démarche, du pelage, du nez et des yeux) a été surveillé. En cas de souffrance, l'animal aurait été immédiatement euthanasié selon les méthodes conventionnelles. Aucun de ces points limites n'a été atteint pour les doses de $MnCl_2$ utilisées dans ce protocole.

5.2.2. Préparation du $MnCl_2$

La préparation du $MnCl_2$ est identique à celle décrite dans le chapitre 3 (p47)

5.2.3. Chirurgie et injection du traceur par voie intracérébrale

La procédure d'injection du $MnCl_2$ (50 mM ; $10\mu L$) dans le GD droit est identique à celle décrite dans le chapitre 3 (p47).

5.2.4. IRM *in vivo*

L'imagerie IRM a été réalisée 24h après l'administration de Mn. Le protocole d'acquisition IRM est identique à celui décrit dans le chapitre 3 (p49).

Des images pondérées T_1 ont été obtenues (TurboRare 3D, TR = 300ms, TE = 12 ms, matrice $128 \times 128 \times 64$, FOV = $16 \times 16 \times 32$ mm, taille d'un voxel = $0,125 \times 0,125 \times 0,5$ mm). Le temps d'acquisition était de 14 min par rat.

5.2.5. Prélèvement des hippocampes

Directement après l'IRM (chaque rat est resté environ 20 min sous l'isoflurane), les animaux, encore sous l'effet anesthésiant de l'isoflurane, sont rapidement euthanasiés par décapitation. Le cerveau est prélevé et l'hippocampe entier est disséqué sur glace à $4^\circ C$ de la façon décrite (**Figure 48**).

Par la suite, les hippocampes gauches et droits ont été divisés en 3 parties égales décrites ci-dessous (**Figure 49**) puis congelés rapidement à sec dans l'azote liquide. La durée totale entre l'euthanasie et la congélation est de 1 min 30.

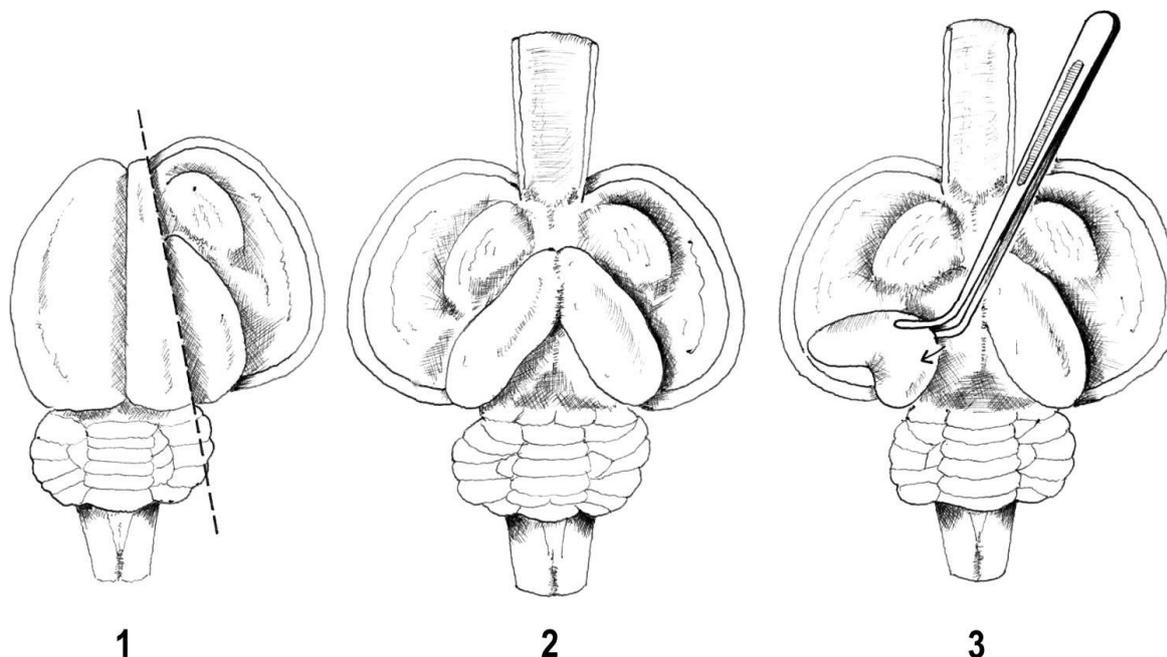
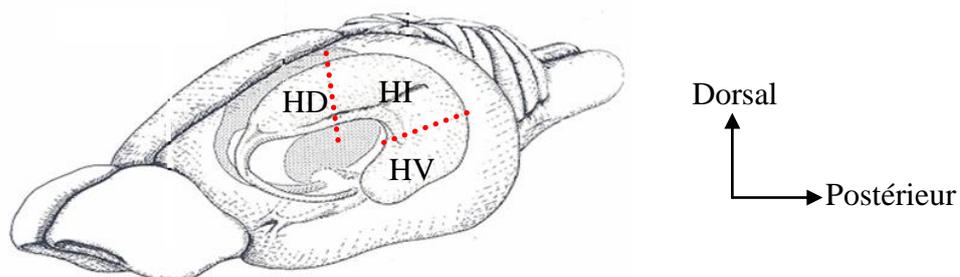


Figure 48 : Séparation des trois parties de l'hippocampe pour les analyses RMN-HRMAS. Le cortex est coupé avec un scalpel puis, un à un les hippocampes sont dégagés avec une fine pince courbe et une pipette Pasteur boutonnée et courbée afin de ne pas abimer le tissu. A la fin de la dissection, les hippocampes sont coupés en 3 parties.



Hippocampe gauche	Hippocampe droit
Hippocampe dorsal (HDg)	Hippocampe dorsal (HDd)
Hippocampe intermédiaire (HIg)	Hippocampe intermédiaire (HI d)
Hippocampe ventral (HVg)	Hippocampe ventral (HVd)

Figure 49 : Schéma de la procédure chirurgicale pour la dissection rapide des hippocampes gauches et droits du cerveau de rat (Navarro et al., 2008).

5.2.6. Analyses *ex vivo* par RMN HRMAS du proton

Les spectres RMN-HRMAS ont été réalisés au sein du laboratoire de RMN dans l'unité de Biophysique et Rayonnements Non Ionisants de l'IRBA-CRSSA (Institut de Recherche Biomédicale des Armées, antenne CRSSA de La Tronche).

5.2.6.1 Acquisition des spectres

Sur chaque échantillon d'hippocampe congelé, ~15 mg est prélevé, puis inséré dans un rotor de 50 μ L en zirconium (**Figure 50**). 30 μ L d'une solution de 1 mM de sodium 3-triméthylsilyl propionate (TSP) dans de l'eau deutérée (D_2O) sont ajoutés dans le rotor. Le TSP est utilisé comme référence pour les déplacements chimiques du proton ($\delta=0$ ppm). Afin de limiter les dégâts cellulaires, les manipulations ont été effectuées à froid, sur un portoir refroidi à $-20^\circ C$. Les rotors/solutions utilisés étaient froids ($4^\circ C$). Les spectres de RMN-HRMAS du proton ont été acquis sur un spectromètre Bruker Avance III, de 9,4 T (Bruker Biospin, Wissembourg, France) à une fréquence de 400 MHz. La sonde HRMAS de 4 mm dispose du triple accord 1H - ^{13}C - ^{31}P . Une vitesse de rotation de 4 KHz a été utilisée. La température est maintenue à $4^\circ C$ pendant l'expérience. Une séquence d'impulsion Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG ; temps d'écho de 30 ms) a été utilisée afin d'atténuer le signal (large) des lipides et macromolécules. Le signal résiduel de l'eau a été pré-saturé pendant les 2 s de temps de relaxation et le temps total de récupération est de 3,5 s. L'acquisition d'un spectre avec 256 passages (scans) dure 16 minutes.

Pour la quantification des spectres (voire 5.1.1.2.), les amplitudes de chaque métabolite, générées par QUEST, ont été normalisées par la somme des amplitudes.

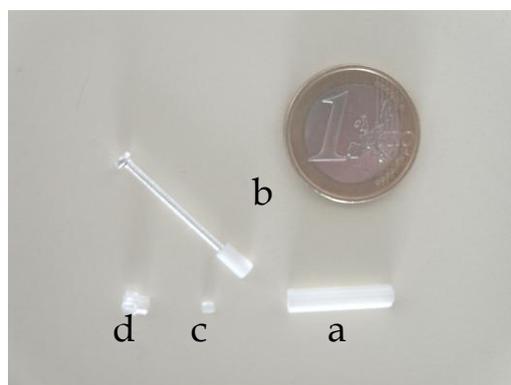


Figure 50 : Photo des éléments composant le rotor.
a : rotor (50 μ L) ; b : insert supérieur monté sur vis d'insertion, en contact avec la biopsie ; c : vis qui referme l'insert supérieur ; d : bouchon à ailettes (voir pour thèse Bon, 2007).

5.2.6.2 Courbe de calibration

A noter, l'effet paramagnétique du Mn empêche son ajout à de fortes concentrations dans les échantillons. En effet, au-delà de 1 mM, les pics sont élargis au point de ne plus être distinguables de la ligne de base. Pour cette même raison, il n'est pas possible de déterminer la stoechiométrie des complexes métabolites/Mn par RMN du proton, selon la méthode classique des variations continues (Job, 1925) (cf. discussion).

Une courbe de calibration de la quantité de Mn présent dans l'échantillon en fonction de la largeur de raie du CH₃ du lactate ($\delta=1,33$ ppm, doublet) a été obtenue à partir d'échantillons de tissu hippocampique auxquels différentes quantités de Mn ont été ajoutées (solution finale de Mn à 0,5 mM ; 0 à 130 μ M). Les mesures ont été effectuées 15 min après l'ajout de Mn et après rotation dans l'aimant. Les concentrations finales de Mn ont été calculées à partir du volume final prenant en compte le volume de la biopsie (8,57 μ L pour une densité = 1), le volume de D₂O (30 μ L) et chaque volume ajouté de Mn (entre 2 et 4 μ L).

Les mêmes paramètres d'acquisition que pour l'étude du métabolisme ont été utilisés. La largeur de raie à mi-hauteur a été mesurée à l'aide du logiciel Bruker Topspin 3.0. Cette mesure correspond à la largeur totale du pic, quelque soit le nombre de multiplets.

5.2.7. Analyses en RMN du liquide *in vitro*

Le même type de courbe de calibration que dans le paragraphe précédent a été réalisé à partir de métabolites en solution *in vitro*. Afin d'évaluer la chélation du Mn par le lactate et le glutamate, des solutions de ces métabolites ont été préparées dans du D₂O-TSP. Du Mn a été ajouté afin d'obtenir des concentrations finales de :

- MnCl₂ (0 à 125 μ M) + Lactate (8 mM) + D₂O-TSP
- MnCl₂ (0 à 125 μ M) + Glutamate (8 mM) + D₂O-TSP

La largeur du pic du lactate à 1,33 ppm (CH₃, doublet) a été mesurée ainsi que celle du glutamate à 3,75 ppm (CH) et 2,35 ppm (CH₂) (**Figure 51**).

La compétition de la chélation de Mn entre deux métabolites a été testée en mettant en présence du Mn, du lactate et du myo-inositol aux concentrations finales de :

- MnCl₂ (0 à 125 μ M) + Lactate (8 mM) + Myo-inositol (8 mM) + D₂O-TSP

La largeur du pic du m-Ins à 3,62 ppm (deux CH superposés, triplet) a été mesurée pour chaque ajout de Mn, en plus de la raie du lactate (**Figure 51**).

Les spectres RMN proton ont été acquis sur le même spectromètre, avec 32 accumulations et une séquence de pré-saturation de l'eau résiduelle.

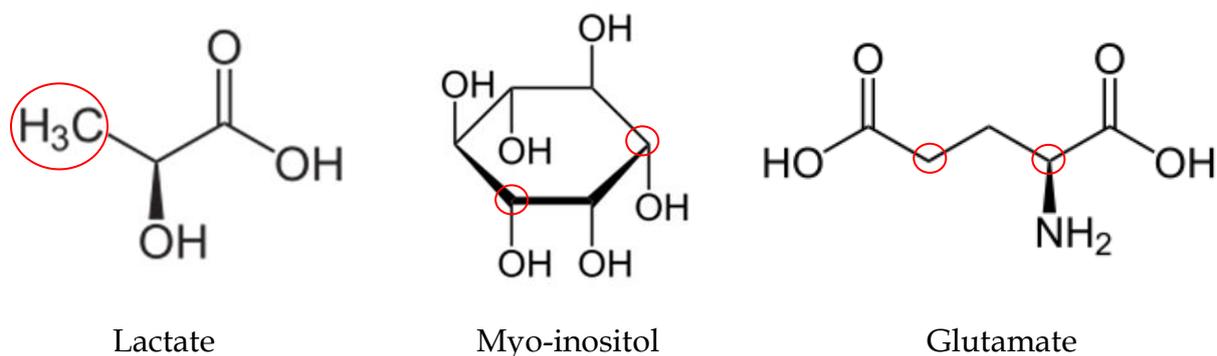


Figure 51 : Métabolites étudiés pour la réalisation de la courbe de calibration.

L'élargissement des pics du lactate, myo-inositol et glutamate a été calculé en présence de Mn à différentes concentrations. Les pics observés représentent le groupement CH_3 pour le lactate, CH pour le myo-inositol et CH_2 pour le glutamate (cercles rouge).

5.2.8. Analyse des données IRM

Les données IRM ont été analysées en utilisant un logiciel développé par l'équipe dans l'environnement Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA), appelé UVASC, permettant, dans notre cas, de tracer les régions d'intérêts.

7 régions d'intérêts (ROI) ont été tracées manuellement : Bruit de fond, HDd, HDg, HI d, HIg, HVd et HVg.

Le rapport signal sur bruit ou « signal to noise ratio » (SNR) a été calculé pour les HD, HI et HV ipsi- (c'est-à-dire le côté droit, injecté) et controlatéral (c'est-à-dire le côté gauche, non injecté). Le contraste MEMRI pour une ROI a été obtenu en calculant la différence des mesures SNR avec et sans Mn.

5.2.9. Statistiques

Les résultats ont été exprimés comme suit : moyenne \pm écarts types (ET) et les comparaisons suivantes ont été effectuées :

- Le SNR entre les différentes ROI a été comparé en utilisant un test de Student apparié.
- Pour l'étude du métabolisme, un test de Student non apparié a été réalisé pour chaque métabolite entre groupe contrôle et groupe Mn.

Pour évaluer si l'élargissement de la raie du lactate est un facteur de prédiction de la concentration de Mn, un coefficient de corrélation de Pearson a été calculé.

Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

5.3. Résultats

5.3.1. Distribution du Mn dans l'hippocampe de rat après MEMRI

Les animaux ayant reçu du $MnCl_2$ présentent un signal IRM plus intense 24h après l'injection, notamment au niveau des deux hippocampes et du cortex (néocortex) que les animaux contrôles n'ayant pas reçu de Mn (**Figure 52**).

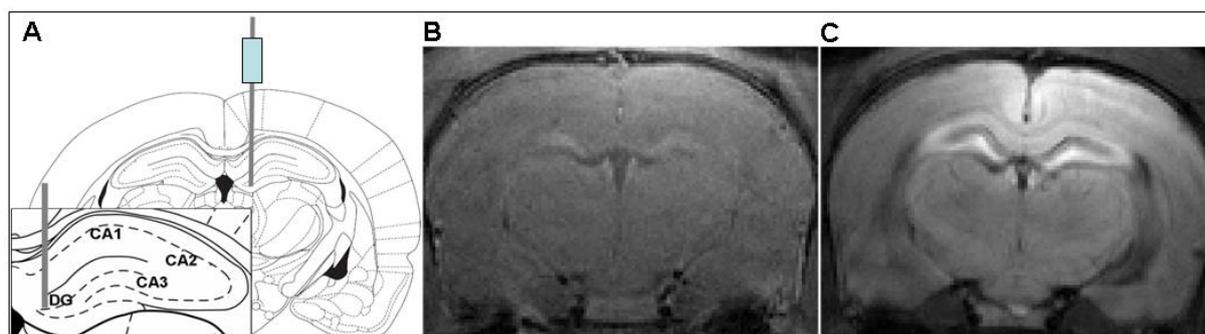


Figure 52: MEMRI 24h après l'injection de $MnCl_2$ par voie intra-cérébrale dans l'hippocampe droit de rat.

A. Schéma de l'injection de $MnCl_2$ (10 μ L, 50 mM) sur l'atlas de Paxinos et Watson. **B.** Coupe coronale de cerveau de rat au niveau de l'HD, 24h après injection du véhicule. **C.** Coupe coronale de cerveau de rat au niveau de l'HD, 24h après injection de $MnCl_2$.

5.3.2. Effet du Mn sur les spectres HRMAS de l'hippocampe

L'injection de manganèse a provoqué deux effets que nous allons traiter séparément dans les paragraphes suivants : tout d'abord, un effet sur les signaux RMN, lié au paramagnétisme du Mn et à sa chélation par certains métabolites, et un effet biologique lié à la perturbation du métabolisme cérébral.

5.3.2.1 Effet du Mn sur les signaux RMN

Dans la condition contrôle (sans injection de Mn, **Figure 53A**), nous observons un spectre « type » avec les différents métabolites compris entre 0,5 et 4,5 ppm. Au niveau du site d'injection du Mn (HDd à l'HIId), ce profil « type » est perturbé. En effet, nous observons un élargissement de certaines raies du spectre telles que les raies du lactate, glutamate, NAA et de l'aspartate. L'élargissement le plus flagrant est trouvé au niveau du lactate (**Figure 53B**). La largeur de raie (en Hz) correspond à $10,56 \pm 2,26$ dans l'HDd et $9,85 \pm 1,08$ dans l'HIId alors qu'elle est de $9,64 \pm 2,16$ dans l'HDg et $9,31 \pm 0,42$ dans l'HIg. Au niveau de l'HVd et des hippocampes gauches, il n'y a pas d'élargissement de raie. De plus, cet effet élargissant dû au Mn décroît le long de l'hippocampe droit, au fur et à mesure que l'on s'éloigne du site d'injection.

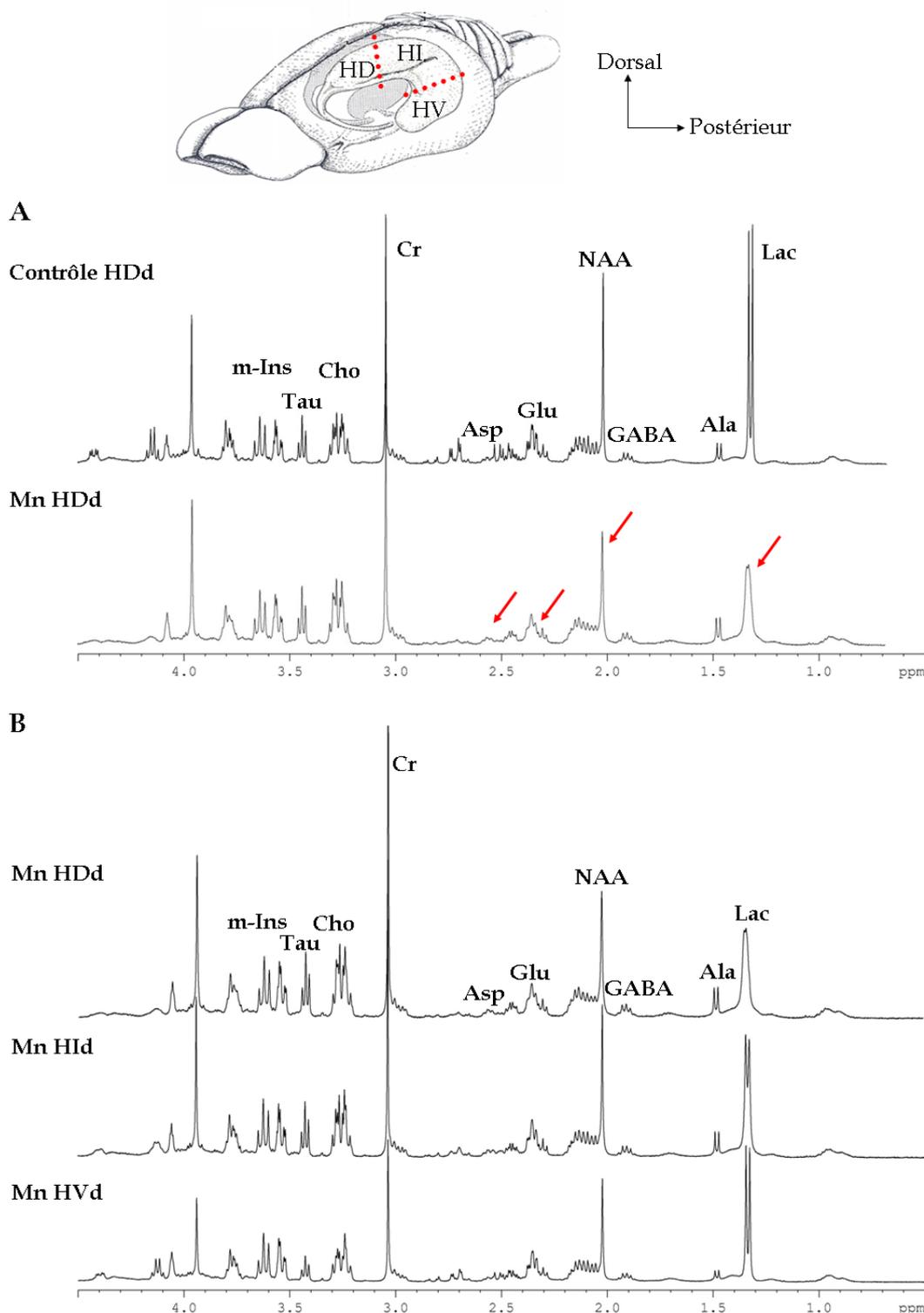


Figure 53 : Effet élargissant du manganèse.

Impact du Mn sur les signaux obtenus en RMN-HRMAS. Spectres d'un seul animal, représentatif de l'ensemble des biopsies analysées suite à l'injection de Mn au niveau de l'hippocampe droit de rat (spectres normalisés par la somme des pics). **A.** Le spectre contrôle (haut) montre un spectre caractéristique d'hippocampe de rat. Le spectre Mn (bas) présente des élargissements des raies du lactate, NAA, glutamate et aspartate (flèches rouges) dus à la présence de Mn. **B.** L'effet élargissant du manganèse décroît le long de l'hippocampe. En observant la raie du lactate, nous observons un retour aux valeurs contrôles dans l'HVd.

Ainsi, ces résultats suggèrent que l'on peut indirectement détecter le manganèse dans l'hippocampe via son effet élargissant sur certaines résonances et que l'on pourrait le quantifier. C'est pourquoi nous avons entrepris des expériences *in vitro*, afin d'évaluer la capacité de la spectroscopie RMN proton à quantifier le manganèse présent dans les hippocampes suite à une expérience MEMRI.

5.3.2.2 Quantification du Mn grâce à l'élargissement de la raie du lactate

Le lactate étant très impacté par la présence de Mn, nous l'avons tout d'abord sélectionné comme marqueur potentiel de concentration de Mn. Pour cela, nous avons analysé par RMN haute-résolution des solutions de lactate (8 mM) en présence de Mn à différentes concentrations (0 ; 3,1 ; 5,9 ; 8 ; 10,5 ; 12,5 ; 20 ; 31,5 ; 60 ; 83,5 ; 100 et 125 μ M), et la largeur du pic du lactate à 1,33 ppm (CH_3) a été reportée en fonction des concentrations de Mn. Nous observons que la largeur de raie du lactate est proportionnelle à la concentration de Mn avec un facteur de régression $r^2=0,87$ et une valeur de $p<0,001$ (**Figure 54**). Cependant, les points en dessous de 10 μ M de Mn sont assez dispersés, sans doute dû aux erreurs liées à la préparation des solutions à faible concentration de Mn et à la limite de détection du spectromètre.

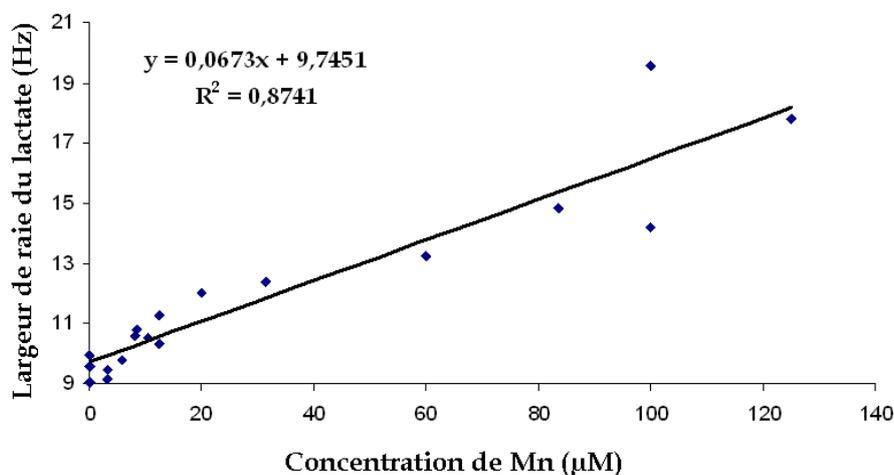


Figure 54 : Largeur de la raie du lactate en fonction de la concentration du Mn dans une solution aqueuse.

Analyses *in vitro* en spectroscopie RMN haute-résolution proton. Les tubes contiennent une solution de lactate (8 mM) et de Mn à différentes concentrations (entre 0 et 125 μ M). 18 mesures ont été effectuées et sont représentées sur ce graphique (nuage de points). L'élargissement est proportionnel aux concentrations de Mn.

A partir de l'équation de la droite, $y=0,0673x + 9,7451$, la concentration présumée de Mn dans les biopsies d'hippocampe de rat a été déterminée. Elle est de $12,1 \pm 33,6 \mu\text{M}$ dans l'HDd, $1,6 \pm 16,0 \mu\text{M}$ dans l'HIId. Des valeurs négatives sont obtenues dans les

autres sous-parties hippocampiques reflétant une trop faible concentration détectable en RMN-HRMAS par l'élargissement de la raie du lactate.

La même expérience a été effectuée à partir de biopsie d'hippocampe de rat n'ayant pas reçu de Mn. Du Mn a été ajouté petit à petit dans la solution contenant la biopsie et 5 acquisitions ont été effectuées après 15 minutes de rotation dans l'aimant.

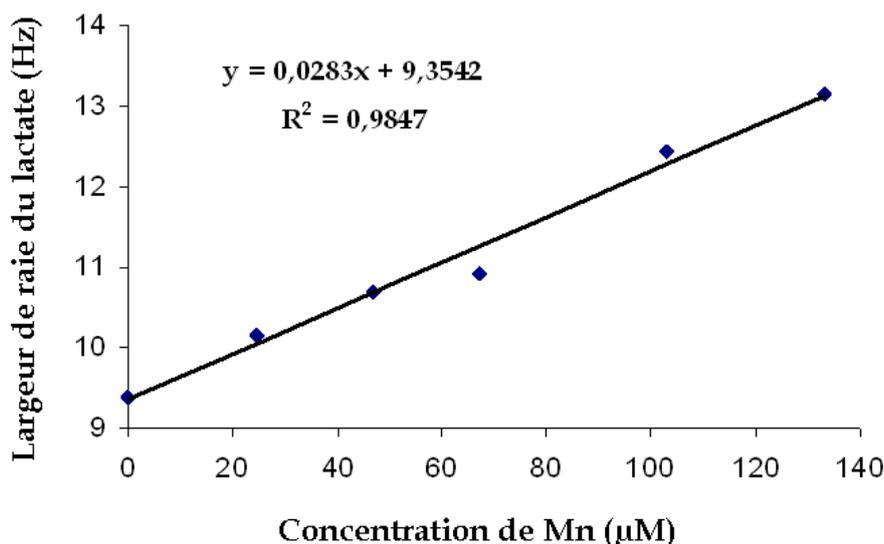


Figure 55 : Largeur de la raie du lactate en fonction de la concentration du Mn dans une biopsie contrôlée.

Mesure en spectroscopie RMN-HRMAS sur une biopsie contrôlée d'hippocampe de rat. Le Mn (0,5 mM) a été ajouté directement dans le rotor contenant la biopsie. 6 mesures ont été effectuées et sont représentées sur ce graphique (nuage de points). L'élargissement est proportionnel aux concentrations de Mn.

Nous observons que, tout comme pour les solutions, la largeur de raie du lactate est proportionnelle à la concentration de Mn avec un $r^2=0,985$ et une valeur de $p<0,001$ (Figure 55).

A partir de l'équation de la droite, $y=0,0283x + 9,3542$, la concentration présumée de Mn dans les biopsies d'hippocampe de rat a été déterminée. Elle est de $42,5 \pm 79,9 \mu\text{M}$ dans l'HDd, $10,2 \pm 76,3 \mu\text{M}$ dans l'HId, de $17,6 \pm 38,1 \mu\text{M}$ dans l'HDg. Des valeurs négatives sont obtenues dans les autres sous parties hippocampiques reflétant une trop faible concentration détectable en RMN-HRMAS par l'élargissement de la raie du lactate. Avec cette technique, nous observons une diminution de la concentration de Mn le long de l'hippocampe. La plus forte concentration correspond au site d'injection HDd, puis l'HId et l'HVd. Les écarts types obtenus pour la concentration de Mn sont très importants, dus notamment à l'imprécision de la mesure de la largeur de raie du doublet du lactate (CH_3). Cependant, en comparant les expériences sur solutions et sur biopsies, on constate que les concentrations de Mn ont dû être

multipliées par 4 dans les biopsies pour obtenir des élargissements de lactate similaires à ceux obtenus en solution.

Par la suite, nous avons réalisé un test de compétition *in vitro* entre le lactate et un métabolite dont la largeur n'est pas affectée par le Mn dans nos biospies, le myo-inositol. Nous observons dans la **Figure 56** que la largeur de raie du CH₃ du lactate n'est pas influencée par la présence du m-Ins. En effet, la pente de la droite est de 0,0663 alors qu'elle était de 0,0673 pour une solution sans m-Ins et la valeur de p est encore significative (p<0,001). De plus, la largeur de la raie du m-Ins à 3,41 reste stable et n'est pas dépendante de la concentration de Mn (p=0,397).

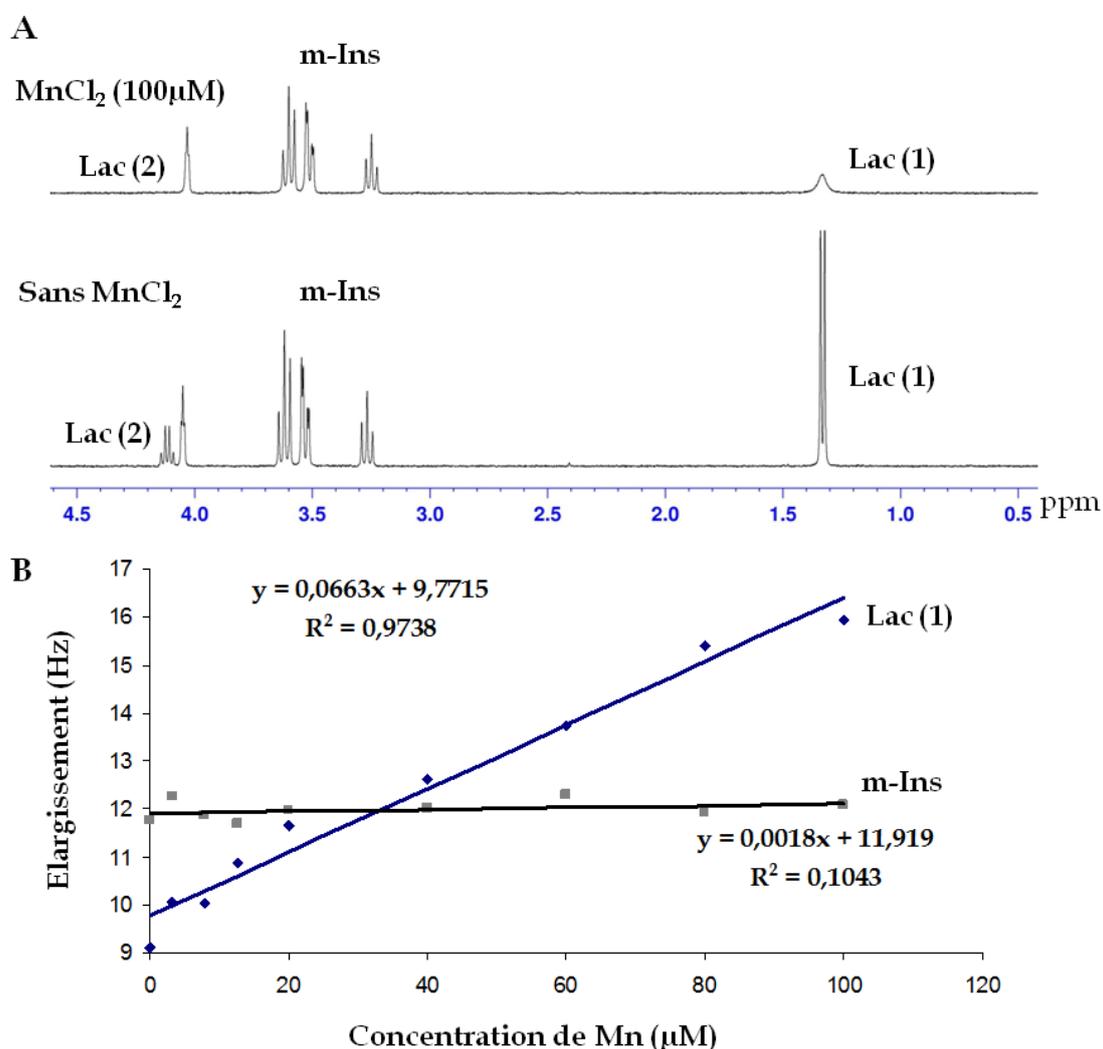


Figure 56 : Largeur de la raie du lactate et du myo-inositol en fonction de la concentration du Mn dans une solution d'eau.

9 mesures ont été effectuées et sont représentées sur ce graphique (nuage de points). L'élargissement de la raie du lactate est proportionnel aux concentrations de Mn.

A. Spectre du lactate (losanges) et myo-inositol (carrés) avec et sans MnCl₂.

B. Spectroscopie RMN proton *in vitro*. Les tubes contiennent une solution de lactate (8mM), de myo-inositol (8mM) et de Mn à différentes concentrations (entre 0 et 100μM).

Finalement, nous avons testé *in vitro* l'effet élargissant du Mn sur le glutamate, qui était lui aussi élargi dans les biopsies (voir **Figure 53**). Nous avons mesuré les largeurs de raie de 2 pics, un à 3,75 ppm correspondant au CH₂ (1) et le deuxième correspondant au CH₂ (2) à 2,35 ppm (**Figure 57**). Les deux pics sont élargis différemment, en effet, le pic du CH₂ (2) présente une largeur maximum de 18,34 Hz alors qu'elle est de 14,34 Hz pour le CH₂ (1). Les largeurs des pics sont significativement proportionnelles à la concentration de Mn, $p < 0,01$ pour CH₂ (1) et $p < 0,05$ pour le CH₂ (2).

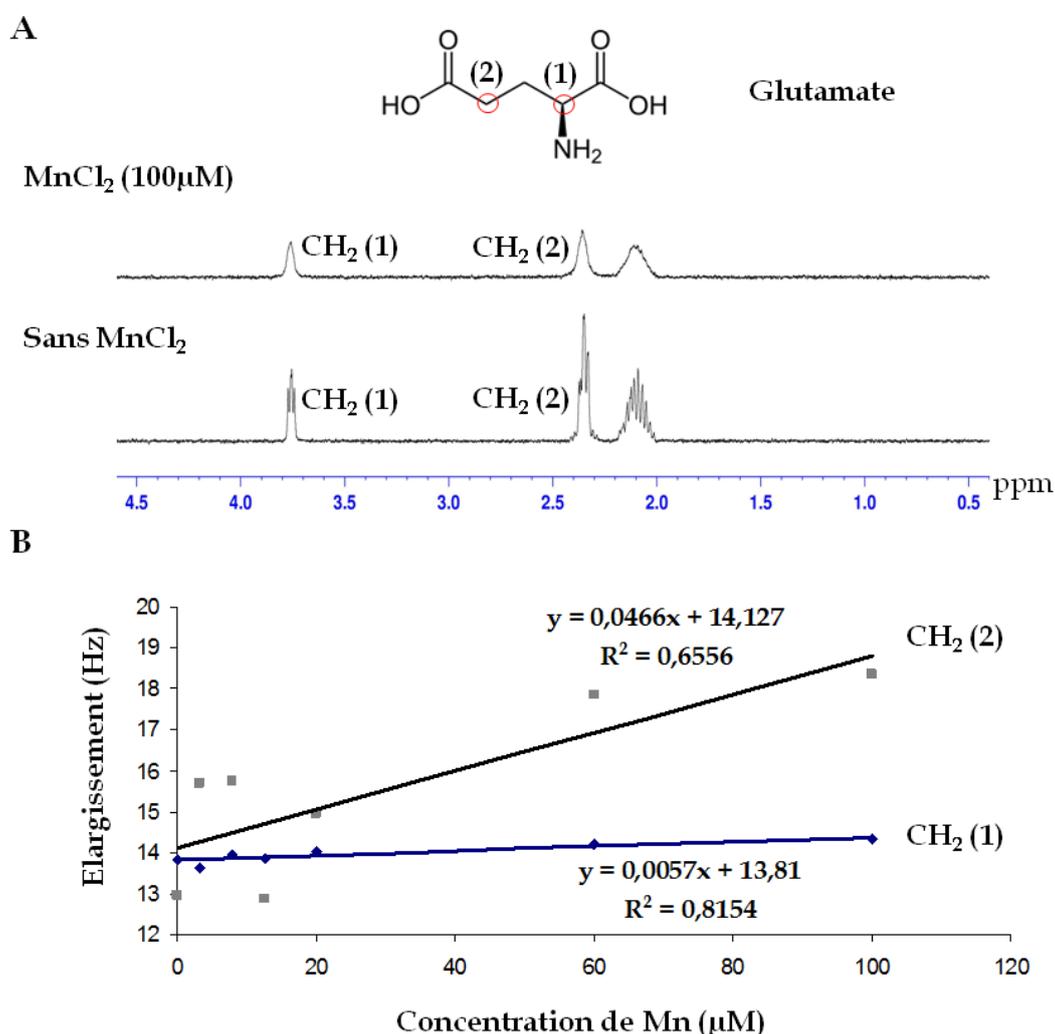


Figure 57 : Largeur des pics CH₂ du glutamate en fonction de la concentration du Mn dans une solution d'eau.

A. Spectre de l'acide glutamique (groupement CH₂ (1) : losanges, groupement CH₂ (2) : carrés) avec et sans MnCl₂.

B. Spectroscopie RMN proton *in vitro*. Les tubes contiennent une solution de glutamate (8mM) et de Mn à différentes concentrations (entre 0 et 100 μM). 7 mesures ont été effectuées et sont représentées sur ce graphique (nuage de points). L'élargissement est proportionnel aux concentrations de Mn.

5.3.2.3 Evolution du signal IRM le long de l'hippocampe

Le signal sur bruit (SNR) a été calculé à partir des images IRM obtenues 24h après l'injection de $MnCl_2$ dans l'hippocampe droit du cerveau de rat, juste avant le prélèvement. Nous avons déterminé le SNR dans les trois sous-parties hippocampiques (HD, HI et HV). Nous observons un fort signal (SNR) au niveau de l'HDd qui diminue le long de l'hippocampe lorsque l'on s'éloigne du site d'injection (Figure 58).

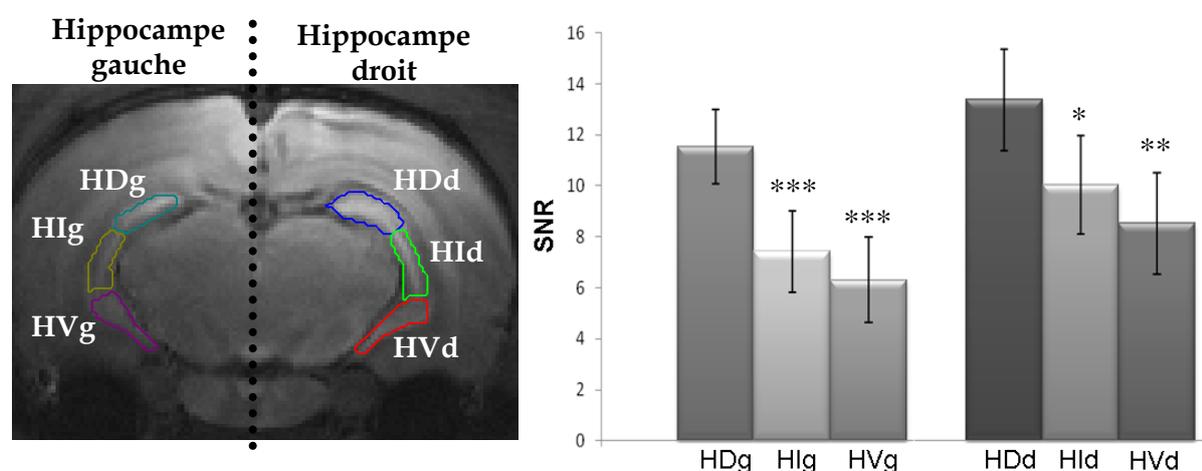


Figure 58 : signal sur bruit (SNR) des 3 sous-parties hippocampiques ipsilatérales (droite) et controlatérales (gauche) à l'injection de $MnCl_2$.

Image IRM (7T) pondérée T1, les différentes ROI sont représentées. Le SNR diminue le long des hippocampes. Plus la structure est située loin du site d'injection et plus le SNR est faible. $n=5$; moyenne \pm ET. Le SNR a été comparé entre HDg et HIg ; entre HDg et HVg ; entre HDd et HId et entre HDd et HVd (test apparié). * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,001$.

5.3.3. Impact du Mn sur le métabolisme hippocampique

L'amplitude (unité arbitraire) des métabolites suivants n'est pas significativement influencée par la présence de Mn dans l'hippocampe ipsilatéral (droite) : acétate (témoins = $0,5 \cdot 10^{-3} \pm 0,06 \cdot 10^{-3}$; Mn = $0,4 \cdot 10^{-3} \pm 0,05 \cdot 10^{-3}$), glutamine (témoins = $0,02 \pm 0,001$; Mn = $0,02 \pm 0,001$), GSH (témoins = $3,0 \cdot 10^{-3} \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$; Mn = $3,0 \cdot 10^{-3} \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$), GPC (témoins = $2,9 \cdot 10^{-3} \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$; Mn = $2,8 \cdot 10^{-3} \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$), glycine (témoins = $3,9 \cdot 10^{-3} \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$; Mn = $4 \cdot 10^{-3} \pm 0,4 \cdot 10^{-3}$) et taurine (témoins = $0,03 \pm 0,002$; Mn = $0,03 \pm 0,004$) (Figure 59). L'amplitude de ces métabolites n'est pas non plus modifiée du côté controlatéral à l'injection (Figure 60).

Au niveau du site d'injection (HDd), un impact important sur le métabolisme cérébral est observé. De plus, cet effet n'est pas identique dans chaque sous-partie de l'hippocampe et de chaque côté (ipsi- et controlatéral) de l'injection. En effet, du côté

ipsilatéral, la moitié des métabolites environ est significativement perturbée par l'injection de Mn (**Figure 59**). Les quantités d'alanine et de glutamate augmentent de façon significative par rapport aux témoins alors que l'asp, le GABA, la PC, le PE, le lac et le NAA diminuent. Au niveau de l'HIId correspondant à la partie anatomique intermédiaire entre l'HDd et l'HVd, les métabolites sont légèrement moins affectés. Nous observons une augmentation du glutamate et du lactate, ainsi qu'une diminution du GABA, PC, PE, m-In et NAA. Enfin, très peu de métabolites dans l'HVd sont modifiés suite à l'injection de Mn dans l'HDd. Seule une augmentation de l'alanine et une diminution du NAA sont observées.

Du côté controlatéral, un impact du manganèse sur le métabolisme est aussi observé (**Figure 60**). 7 métabolites sur 17 sont perturbés dans l'HDg et ceux-ci sont différents des métabolites modifiés au site d'injection. Nous observons une augmentation de l'alanine et du glutamate et une diminution de la Cho, PC, PE, m-In et NAA. Concernant les autres structures hippocampiques controlatérales, seules une diminution de la PE (HIg et HVg) et du NAA (HVg) sont observées.

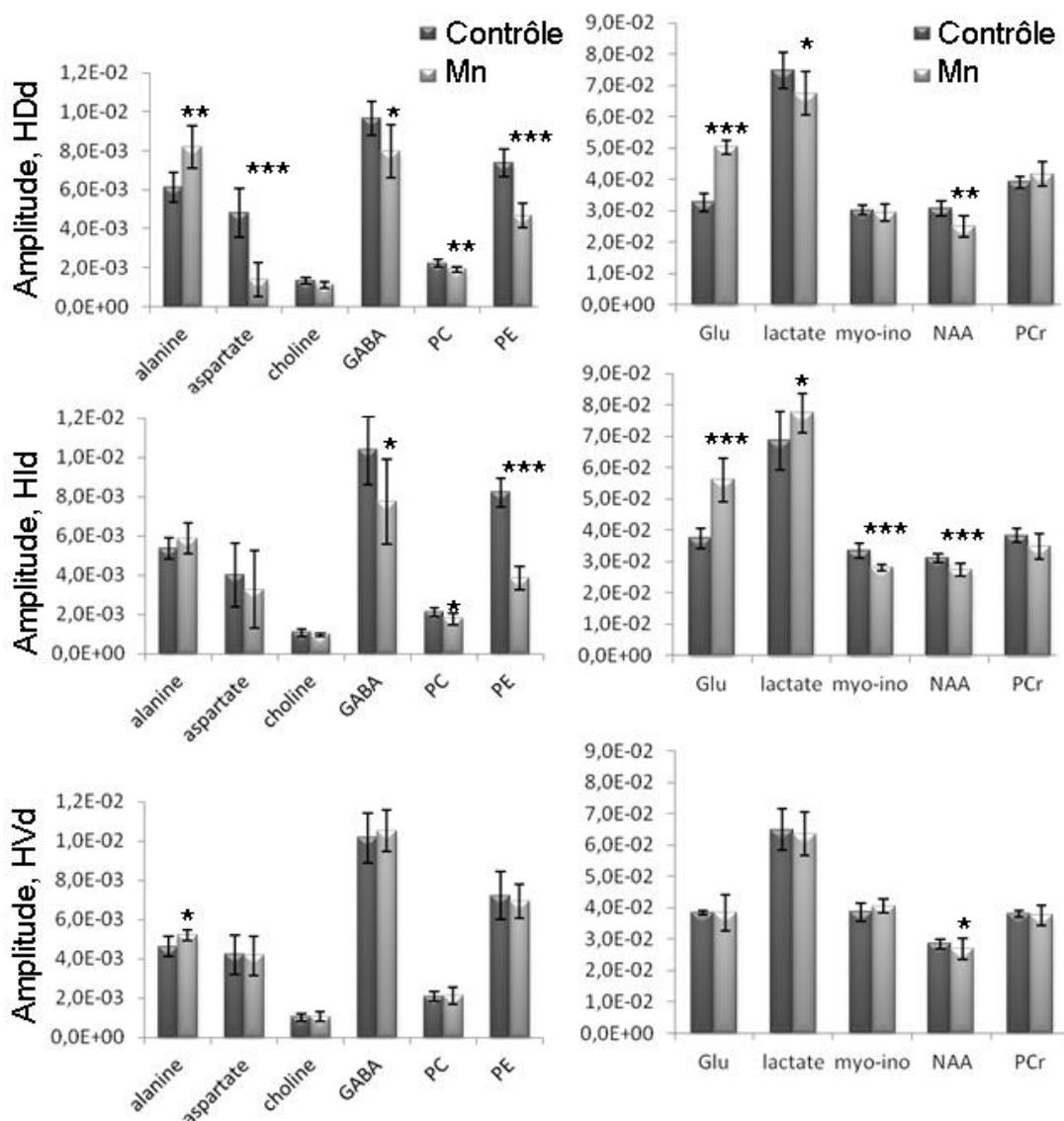


Figure 59 : Impact du Mn sur l'hippocampe droit de rat après injection de MnCl₂.

Le Mn a été injecté dans le GD de l'hippocampe droit de rat (10 μ L, 50 mM). 24h après l'injection, les rats ont été euthanasiés et les biopsies d'hippocampe ont été prélevées puis analysées par RMN-HRMAS ¹H. 11 métabolites (sur 17) sont représentés sur ce graphique. L'amplitude du signal étant différente pour les métabolites, deux graphiques ont été représentés. Celui de gauche représente les amplitudes comprises entre 0 et 0,12 et celui de droite les amplitudes comprises entre 0,20 et 0,90. HDd : Hippocampe Dorsal droit (zone d'injection du Mn) ; HId : Hippocampe Intermédiaire droit ; HVd : Hippocampe Ventral droit. L'amplitude du signal a été comparée entre les rats injectés au Mn et les rats contrôles. *p<0,05 ; ** p<0,01 ; ***p<0,001 (moyenne \pm ET), n=8 MnCl₂, n=7 contrôles.

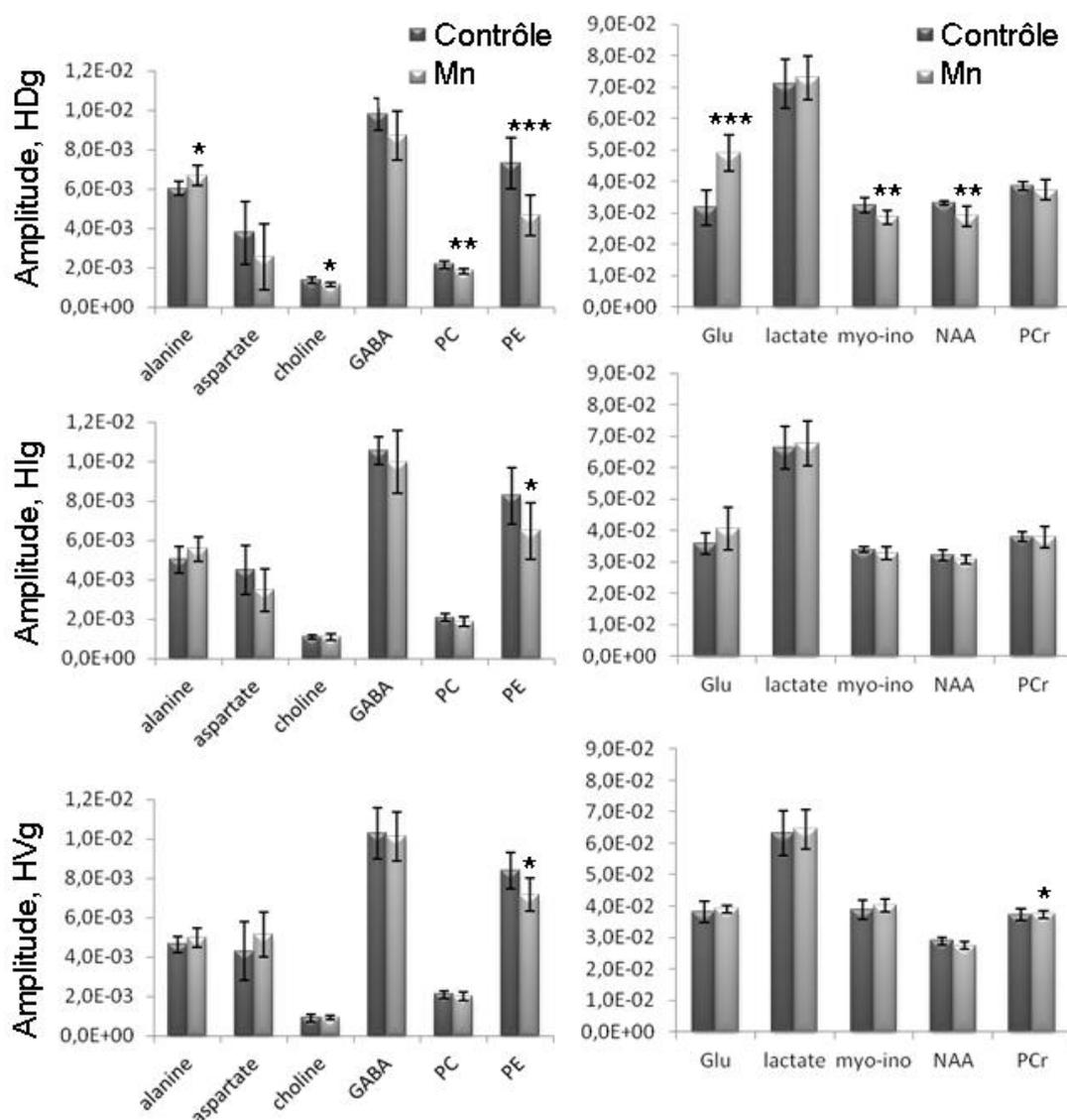


Figure 60 : Impact du Mn sur l'hippocampe gauche de rat après injection de MnCl₂.

Le Mn a été injecté dans le GD de l'hippocampe droit de rat (10 μ L, 50 mM). 24h après l'injection, les rats ont été euthanasiés et les biopsies d'hippocampe ont été récupérées puis analysées par RMN-HRMAS du ¹H. 11 métabolites (sur 17) sont représentés sur ce graphique. L'amplitude du signal étant différente pour les métabolites, deux graphiques ont été représentés. Celui de gauche représente les amplitudes comprises entre 0 et 0,12 et celui de droite les amplitudes comprises entre 0,20 et 0,90. HDg : Hippocampe Dorsal gauche (zone controlatérale au site d'injection du Mn) ; Hlg : Hippocampe Intermédiaire gauche ; HVg : Hippocampe Ventral gauche. L'amplitude du signal a été comparée entre les rats injectés au Mn et les rats contrôles. *p<0,05 ; ** p<0,01 ; ***p<0,001 (moyenne \pm ET), n=8 MnCl₂, n=7 contrôles.

Du côté ipsilatéral, la quantité de métabolites (excepté le NAA et l'alanine) retourne à des valeurs identiques à celles des témoins le long de l'hippocampe. Il en est de même du côté controlatéral, excepté pour la PE et le NAA (**Figure 61**).

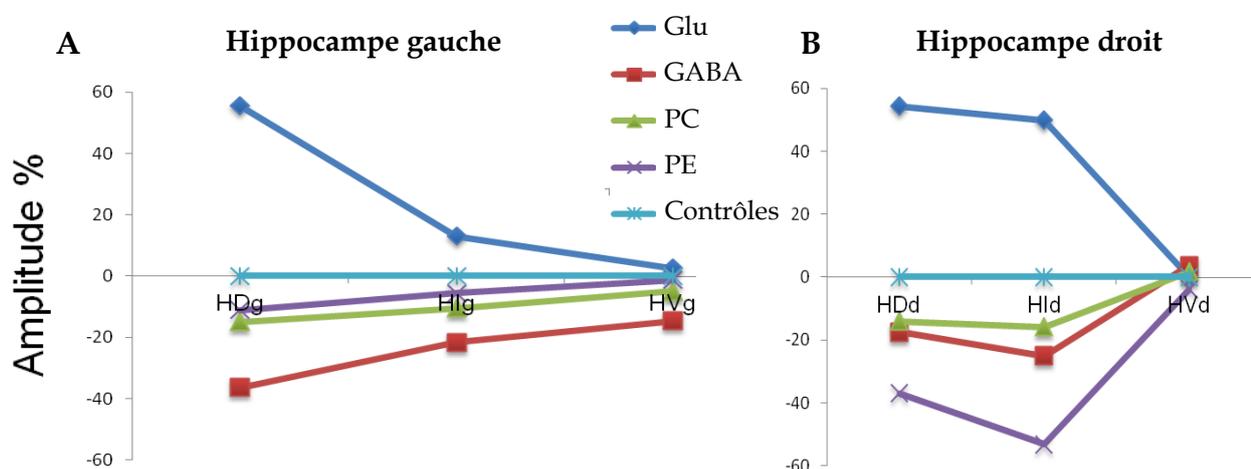


Figure 61 : Evolution de la quantité des métabolites le long de l'hippocampe (amplitudes en % des témoins, sans unité)

La quantité de métabolites évolue le long de l'hippocampe gauche (A) et droit (B) pour retourner à des valeurs comparables à celles des contrôles dans l'HV.

5.4. Discussion

5.4.1. Détection du Mn dans les biopsies

5.4.1.1 Chélation du Mn par les acides

Nous avons observé un élargissement des pics des acides organiques tels que l'acide lactique, l'acide aspartique, l'acide N-acétyl-aspartique et l'acide glutamique, alors que les autres pics du spectre de biopsie sont peu ou pas affectés par la présence de Mn. Il ne s'agirait donc pas d'un élargissement aspécifique lié à un effet global du Mn sur l'eau.

Il s'agirait plus d'un effet local lié à la chélation du Mn par les acides organiques. Cela a été vérifié par des expériences *in vitro* de compétition du lactate avec le myo-inositol, montrant que seul le lactate était affecté par la présence de Mn dans cette expérience. Il est en effet connu que les acides organiques ont une affinité plus ou moins grande pour les ions, dont le Mn (Kishi et al., 1994). Il est donc possible que le Mn soit chélaté par ces acides. Les expériences *in vitro* avec des solutions de lactate, montrent que l'élargissement du lactate est proportionnel à la concentration de Mn. Cependant, à partir d'une concentration de 1 mM les résonances étaient élargies au point qu'elles n'étaient plus détectables. Ainsi, il n'a pas été possible de déterminer par RMN les stoechiométries des complexes formés, ni leur constante d'association apparente. En effet, la méthode des variations continues ou méthode de Job (Job, 1925) implique de réaliser des mélanges en ratios variables de chacun des protagonistes du complexe, et de suivre un observable, comme le déplacement chimique ou les temps de relaxation.

Par contre, lorsque l'on observe le spectre d'une solution de glutamate et Mn, nous observons que le Mn élargit les deux pics correspondant au CH à 3,75 ppm et au CH₂ à 2,34ppm. C'est ce dernier qui est le plus élargi par le Mn, il correspond au groupement CH₂ le plus éloigné du groupement NH₂. Il se pourrait que le groupement NH₂ empêche la chélation du manganèse sur la fonction acide proche. Le fait que l'on n'observe pas d'élargissement des pics de la glutamine va dans le même sens : la seule fonction acide de la glutamine est proche du NH₂, ce qui pourrait limiter la chélation du Mn. Il en est de même du lactate : le CH proche de la fonction acide est nettement plus élargi que le CH₃ dont nous avons mesuré l'élargissement. Cependant, en raison de la faible intensité de ce pic (quadruplet à 4,11 ppm), nous n'avons pas pu mesurer de manière fiable son élargissement.

Ces données montrent que le Mn pourrait être chélaté par les groupements OH des acides carboxyliques, qui sont déprotonés à pH physiologique (chargés

négativement). Il serait intéressant d'accéder aux constantes d'association et à la stœchiométrie des complexes métabolite/Mn par d'autres méthodes que la RMN.

5.4.1.2 Détermination de la concentration du Mn

Les courbes de calibration réalisées *in vitro* avec du lactate en solution, ou sur une biopsie, donnent des quantités de Mn différentes.

Dans les expériences d'ajout de Mn sur des biopsies saines, nous avons utilisé des doses de Mn 4 fois plus fortes que dans la solution pour observer un élargissement du lactate équivalent. Or dans la biopsie, le mélange est bien plus complexe que *in vitro* en solution :

(i) le Mn est chélaté par d'autres métabolites qui sont en compétition (le glutamate, l'aspartate, le NAA), mais il est aussi certainement chélaté par des enzymes, des protéines et des macromolécules.

(ii) la biopsie est un milieu très salin, à pH neutre, ce qui modifie certainement les affinités des acides pour le Mn, par rapport à une solution dans du D₂O, à pH légèrement acide.

(iii) l'ajout de Mn sur une biopsie ne peut pas réellement mimer l'injection intra-tissulaire de Mn, dans la mesure où il est difficile d'évaluer si le Mn entre dans les cellules.

Il est possible que le Mn ne soit chélaté que par les métabolites extra-cellulaires. Ainsi, les biopsies prélevées après injection intra-hippocampique de Mn pourraient correspondre à une situation intermédiaire entre la solution *in vitro* et l'ajout externe de Mn sur une biopsie.

Pour comparaison, lors de nos précédents travaux, nous avons trouvé une concentration entre 0,46 et 1,91 mM de Mn par microscopie à fluorescence X (synchrotron) et entre 0,30 et 0,48 mM dans l'hippocampe dorsal gauche par carte T1 en IRM après injection IC de Mn (Daoust et al., *in press* ; Voir chapitre 3, p.39). Dans notre étude utilisant une biopsie pour en déterminer l'élargissement de la raie du lactate, nous avons trouvé une concentration de $0,018 \pm 0,038$ mM de Mn dans l'hippocampe dorsal gauche. Cependant les techniques utilisées nous avaient permis de calculer des concentrations de Mn locales, là où le Mn est le plus concentré, notamment dans les régions astrocytaires. La détermination de la concentration de Mn par l'élargissement du lactate moyenne la concentration de Mn dans la biopsie. Par conséquent la concentration de Mn trouvée grâce à cette technique n'est pas anormale et pourrait refléter les concentrations de Mn globales trouvées dans l'hippocampe.

Cependant, le lactate que nous observons dans les biopsies est principalement produit dans les conditions anaérobies, c'est-à-dire après la mort de l'animal. Il est possible que le lactate, produit en anaérobiose, chélate le Mn libre, reflétant alors les concentrations de Mn libre.

5.4.2. Impact du Mn sur le métabolisme

Un fort impact du Mn a été observé sur le métabolisme hippocampique notamment au niveau du site de l'injection (hippocampe dorsal droit) et du côté controlatéral à l'injection (hippocampe dorsal gauche). Cette perturbation du métabolisme semble corrélée à la quantité de Mn le long de l'hippocampe. La question qui se pose est : est-ce que la perturbation du métabolisme est aussi corrélée à la chélation du manganèse par certains métabolites ? Effectivement, la chélation du Mn par des neurotransmetteurs tels que le glutamate pourrait influencer leur fonctionnalité. Par exemple le glutamate pourrait ne plus être transformé en glutamine par les astrocytes, or, nous n'avons pas observé de perturbation de la glutamine. Nous savons que le glutamate est un neurotransmetteur excitateur essentiel au SNC. La synthèse de glutamate augmente dans l'hippocampe lors de l'apprentissage d'une tâche par le rat (Ballini et al., 2008) alors que sa diminution peut aboutir à des dysfonctionnements neurologiques (Desai Shanti et al., 2004). Jackson et al. ont étudié le comportement de rats 1h et 24h après l'injection de Mn à 200 $\mu\text{mol}/\text{Kg}$ par voie IP (Jackson et al., 2011). Les résultats n'indiquent aucune perturbation des performances liées à la mémoire hippocampique et par conséquent pas de perturbation du rôle du glutamate. En s'appuyant sur ces résultats obtenus après injection par voie IP, nous pouvons supposer que le Mn n'influence pas ou peu la fonctionnalité du glutamate. Cependant, il est important de noter que nous avons procédé à une injection locale intra-cérébrale de Mn directement dans l'hippocampe. Le Mn, localement, peut altérer la fonctionnalité de certains NT, mais ce dysfonctionnement reste local et peut être compensé par les cellules avoisinantes. Pour compléter ces idées, des expériences devraient être effectuées afin de vérifier la fonctionnalité de ces neurotransmetteurs.

Le NAA est un marqueur de souffrance et de viabilité neuronale, bien que son rôle soit encore mal connu. Parmi ses nombreuses fonctions, il a été reporté que le NAA est lié au métabolisme énergétique mitochondrial (Moffett et al., 2007). L'acétylation de l'aspartate peut faciliter le retrait du NAA des mitochondries neuronales favorisant la conversion du glutamate en α -cétoglutarate et par conséquent favoriser la production d'énergie. Dans notre étude, le NAA diminue dans toutes les sous-parties hippocampiques. Cet effet diminue le long de l'hippocampe droit

(ipsilatéral) : HDd -19,09% ; HIId -12,13% et HVd -5,63% mais aussi le long de l'hippocampe gauche (controlatéral) : HDg -12,74% ; HIg -4,02% et HVg -5,23%. Cette diminution a aussi été mise en évidence au niveau du globus pallidus de rat par Zwingmann et al. (-27,8%), après des injections par voie IP de Mn (50 mg/kg) pendant 4 jours (Zwingmann et al., 2007). Or, aucune perte neuronale n'a été observée en histologie dans notre étude. La baisse de NAA observée en HRMAS pourrait donc refléter un dysfonctionnement mitochondrial neuronal.

Une augmentation de l'alanine et du glutamate est observée ainsi qu'une diminution du GABA, alors qu'au niveau de la glutamine, aucune perturbation significative n'est mesurée. Nous savons que 90% du glutamate est neuronal (Cruz and Cerdán, 1999; Chapa et al., 2000) ; l'augmentation significative de glutamate peut refléter une surproduction ou bien, à l'inverse, une diminution de sa consommation. De plus, il est connu qu'un excès de glutamate peut entraîner une excitotoxicité neuronale (Raveh et al., 1999), menant essentiellement à la mort des neurones. Il a été montré que le niveau des trois neurotransmetteurs (NT) dopamine, glutamate et GABA est clairement corrélé. Par conséquent, une altération de la production ou de la libération d'un de ces NT a un effet sur les deux autres NT. De plus, le Glutamate est transformé en glutamine par une enzyme dépendante du Mn : la glutamine synthétase (GS) ou transformé en GABA par l'enzyme acide glutamique déshydrogénase. La glutamine lors de l'activation glutamatergique est à son tour reconvertie en glutamate par la glutaminase (Fitsanakis et al., 2006). Zwingmann et al. ont étudié l'effet du Mn sur le métabolisme cérébral de rat après injection d'acétate marqué au ¹³C (substrat transformé uniquement dans les astrocytes). Les auteurs ont mis en évidence une augmentation du glutamate et une diminution du GABA dans le cortex frontal (Zwingmann et al., 2007). Ces résultats sont identiques aux nôtres dans l'hippocampe dorsal ipsilatéral. Il est à noter qu'il y a une perturbation du cycle glutamine-glutamate-GABA dans les structures hippocampiques proches du site d'injection du Mn, mettant en avant une perturbation de la communication entre neurones et astrocytes.

De plus, nous observons une augmentation de l'alanine dans les hippocampes dorsaux (site d'injection). L'alanine-transférase (ALAT) catalyse le transfert de la fonction amine de l'alanine vers l' α -cétoglutarate qu'elle transforme en glutamate, tandis que l'alanine donne un pyruvate. L'alanine serait impliquée dans le cycle glutamate/glutamine appuyant l'idée d'une perturbation de ce cycle dû au Mn (Bröer et al., 2007).

Le myo-inositol est un osmolyte organique important impliqué dans la régulation du volume astrocytaire (Le Bas et al., 1998), tout comme la phosphocréatine, la taurine et la choline. La quantité de myo-inositol, de choline et de phosphocholine est diminuée

notamment dans l'HDl et l'HDg (régions proches du site d'injection) relatant une astrogliose locale. L'altération gliale semble limitée puisqu'il n'y a pas de perturbation de production de glutamine et de taurine. Hazell et al. ont montré une modification de la morphologie des astrocytes après injection de Mn chez le rat (50 mg/Kg en IP) appelée « Alzheimer type II astrocytosis » (Hazell et al., 2003). De même, dans nos travaux précédents, pour le même type d'injection (10 μ L, 50 mM en IC), nous avons observé une astrogliose au site d'injection du Mn (Daoust et al., *in press* ; cf chapitre 3, p.47). En effet, puisque les PC (pyruvate carboxylase) et GS (glutamine synthétase ; **Figure 46**) sont des métalloprotéines nécessitant du Mn, il a été suggéré que le Mn joue un rôle important dans le métabolisme astrocytaire (Tholey et al., 1987). La PC astrocytaire permet de convertir le pyruvate en oxaloacétate pour donner de l'aspartate. Ce métabolite est très perturbé au site d'injection (-70,8%) pouvant évoquer le fait d'une perturbation de la PC et donc de la fonction astrocytaire.

Zwingmann et al. ont étudié le métabolisme du glucose marqué au ^{13}C par spectroscopie RMN sur des cultures primaires de neurones et d'astrocytes (Zwingmann et al., 2003). Cinq jours après un traitement au Mn de 100 μM , les auteurs ont montré une diminution du ratio ATP/ADP de -50% et de phosphocréatine/créatine de -70%. Les résultats suggèrent que, en accord avec l'altération de l'oxydation du glucose neuronal, les changements du métabolisme astrocytaire peuvent causer une perte de l'équilibre homéostatique contribuant au dysfonctionnement neuronal dans la toxicité du Mn.

Chang et al. ont effectué des études de spectroscopie IRM sur des patients atteints de manganisme (cf. chapitre 1) (Chang et al., 2009). Ils ont montré une diminution du ratio myo-inositol/créatine dans le cortex cingulaire antérieur, suggèrent une astroglyose.

Aucune perturbation du niveau de glutathion n'est à noter alors que sa diminution pourrait être une des conséquences de l'exposition au Mn (Erikson et al., 2006), cependant ce résultat n'est pas retrouvé dans toutes les études (Hernández et al., 2011). Une augmentation de lactate a été observée dans l'hippocampe intermédiaire ipsilatéral. Le lactate est un métabolite énergétique entrant dans différents processus mais est principalement utilisé par les neurones (Gladden, 2004). Le lactate est transformé en pyruvate par la LDH qui régénère de l'oxaloacétate, via le cycle de Krebs, grâce à la pyruvate carboxylase, une ligase dépendante du Mn comme co-facteur. Hernandez et al. ont montré que l'acide ascorbique et le lactate avaient un effet protecteur du Mn sur les cultures primaires de neurones corticaux et granulaires

(du cervelet) (Hernández et al., 2011). Par conséquent, l'augmentation de lactate pourrait jouer un rôle dans la protection des neurones hippocampiques.

En conclusion, nous observons une variation de l'élargissement des raies et du métabolisme le long des hippocampes qui serait proportionnelle aux concentrations de Mn. Il y a une perturbation du cycle glutamate-GABA en accord avec la littérature. La perturbation des osmolytes organiques (myo-inositol et choline) au site d'injection est en accord avec l'astrogliose observée en histologie dans le Chapitre 3. Ces données montrent que les études IRM utilisant le Mn doivent prendre en considération l'impact de ce dernier sur les cellules cérébrales et nous éclaire sur l'effet du Mn sur le métabolisme astrocytaire et neuronal.

La quantification des données a été difficile de part l'effet élargissant du Mn. La variabilité des résultats est de ce fait élevée. Les perspectives de ce travail sont de refaire la même expérience à partir de doses plus faibles de Mn (60 nL, 100 mM). De ce fait, le Mn aura un effet élargissant moindre et ces doses sont celles couramment utilisées en MEMRI pour le tract-tracing (Canals et al., 2008a). Les résultats obtenus en RMN-HRMAS pourront être complétés avec de la spectroscopie RMN *in vivo*. Il serait aussi intéressant d'étudier le devenir des métabolites 1 mois après injection de Mn (réversibilité).

Des cartes T1 en IRM pourront être effectuées couvrant tout l'hippocampe, permettant d'en déduire les concentrations du Mn. Une de nos hypothèses est la surestimation de la concentration de Mn à partir des cartes T1.

En effet, des expériences préliminaires ont montré que le T1 (de l'eau) diminue lorsque le Mn est chélaté par les acides organiques tels que le lactate. L'expérience a été effectuée en spectroscopie du liquide (spectromètre Bruker 9,4T ; de la même façon que pour les courbes de calibrations), avec une séquence d'inversion récupération afin de mesurer le T1 de la solution. Les solutions testées sont : lactate 8mM ; Mn 20 μ M et lactate 8 mM + Mn 20 μ M. Les T1 de l'eau mesurés sont les suivants : $5,5 \pm 0,2$ sec (lactate) ; $3,4 \pm 0,1$ sec (Mn) et $2,9 \pm 0,1$ sec (lactate + Mn). Il est possible que la relaxivité r_1 du Mn augmente lorsque l'ion est chélaté.

Chapitre 6 - Evaluation de la connectivité fonctionnelle par MEMRI chez un modèle de souris déficiente pour MAP6

6.1. INTRODUCTION	146
6.1.1. LES MICROTUBULES :	146
6.1.2. DESCRIPTION DES SOURIS KO MAP-6 (KO STOP)	148
6.2. ETUDE I : ETUDE DE LA CONNECTIVITE FONCTIONNELLE DES VOIES OLFACTIVES CHEZ LA SOURIS KO MAP6	152
6.2.1. INTRODUCTION	152
6.2.2. MATERIELS ET METHODES	154
6.2.3. RESULTATS	157
6.3. ETUDE II : ETUDE DE LA CONNECTIVITE FONCTIONNELLE DU TRACT THALAMO-CORTICAL CHEZ LES SOURIS KO STOP	161
6.3.1. INTRODUCTION	161
6.3.2. MATERIELS ET METHODES	163
6.3.3. RESULTATS	171
6.4. DISCUSSION	180
6.4.1. LIMITES METHODOLOGIQUES	180
6.4.2. CONNECTIVITE FONCTIONNELLE DES SOURIS KO MAP6	181
6.4.3. PERSPECTIVES	185

- **A. Daoust**, E. L. Barbier, A. Andrieux, S. Bohic and J.C. Deloulme. Evaluation of functional connectivity in a cold-microtubule deficient mice using manganese enhance magnetic resonance imaging in vivo. 20ème congrès annuel de l'ISMRM 2012, Melbourne (Australie).
- **A. Daoust**, E. L. Barbier, A. Andrieux, Y. Saoudi, S. Bohic, and J. C. Deloulme. Evaluation of functional connectivity in a cold-microtubule deficient mice using manganese enhance magnetic resonance imaging in vivo. SFRMBM 2012, Marseille (France).

6.1. Introduction

Les souris KO MAP6 présentent une anomalie synaptique et une déplétion en vésicules synaptiques associées à des troubles du comportement similaires à la schizophrénie (Andrieux et al., 2002). Dans ce chapitre, nous étudions la connectivité fonctionnelle cérébrale de ces souris par MEMRI. Nous détaillons dans un premier temps le modèle animal utilisé : les souris KO MAP6, précédé d'un bref rappel sur la composition et le rôle des microtubules, et dans un second temps notre étude MEMRI (Figure 62A).

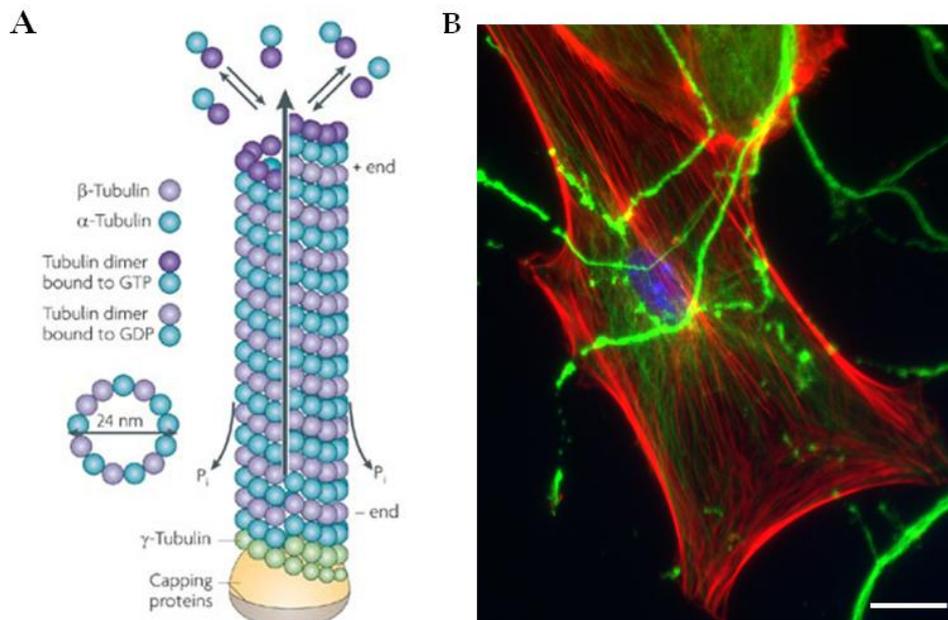


Figure 62 : Microtubules

A. Schéma d'un microtubule composé de tubuline α et β . La tubuline liée au GTP permet l'assemblage du microtubule (extrait de Conde et Cáceres, 2009).

B. Marquage en immunofluorescence de la tubuline (vert), actine (rouge) et noyau (bleu) d'un astrocyte en culture provenant de cortex embryonnaire de souris. Photographie effectuée en collaboration avec l'équipe 1 du GIN. Echelle = 10 μ m.

6.1.1. Les microtubules :

Les microtubules sont des structures dynamiques présentes dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Brièvement, un microtubule est un tube de 24 nm de diamètre, il est composé généralement de 13 protofilaments juxtaposés, eux-mêmes composés de dimères de tubulines α et β . L'assemblage et le désassemblage des microtubules se

fait par addition ou soustraction de dimères de tubuline α et β aux extrémités des microtubules (Job, 1988).

L'actine est une protéine cytoplasmique. Associée aux microtubules, elle joue un rôle important dans la mitose. Cette protéine est nécessaire pour l'architecture et les mouvements cellulaires.

Les microtubules irradient à partir du centrosome dans tout l'espace intracellulaire. Sous cette configuration, les microtubules assurent des fonctions d'organisations de l'espace intra-cellulaire : ils sont responsables du positionnement des mitochondries, sont indispensables à l'organisation et à la stabilisation de l'appareil de Golgi, jouent un rôle central dans l'organisation du réticulum endoplasmique et servent de rails directeurs pour les transports d'organelles et de molécules variées (Baas and Heidemann, 1986; Guillaud et al., 1998) (**Figure 62B**).

Pour remplir ces diverses fonctions, les microtubules interagissent avec un grand nombre de composants intracellulaires parmi lesquels des protéines régulatrices qui contrôlent leur assemblage, appelées protéines associées aux microtubules (microtubule-associated proteins, MAPs).

In vitro, il est possible d'agréger de la tubuline en microtubule. Dans ce cas, deux paramètres sont importants : la température (30-37°C) et la présence de guanosine triphosphate (GTP) avec laquelle la tubuline forme un complexe. Le GTP est hydrolysé en guanosine diphosphate (GDP) et la tubuline est incorporée dans les microtubules sous forme de tubuline-GDP. Cependant, l'exposition des microtubules au froid (<15°C, *in vitro*) induit rapidement un désassemblage des microtubules appelé aussi dépolymérisation. Certaines drogues peuvent avoir le même effet que le froid sur les microtubules comme la colchicine, la vinblastine ou le nocodazole.

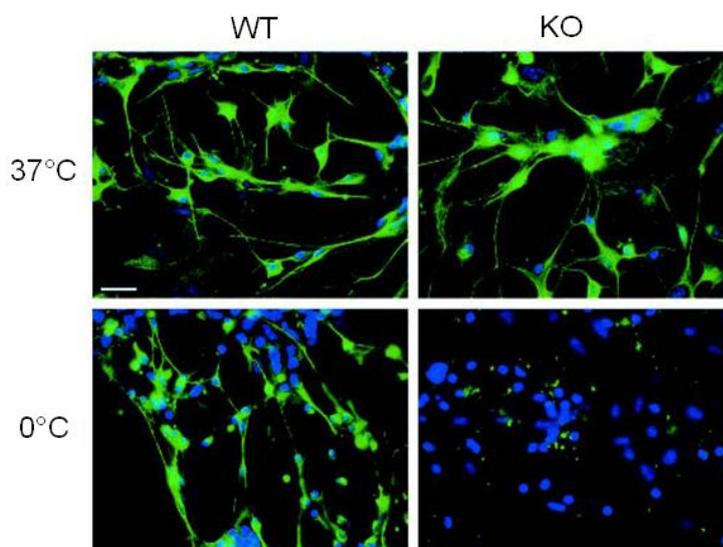


Figure 63 : L'extinction du gène codant pour la protéine MAP6 supprime la stabilité des microtubules.

Immunofluorescence de la tubuline (vert) et des noyaux (bleu) à partir de culture primaire de neurones corticaux de souris WT et KO MAP6. Le froid induit une dépolymérisation des microtubules mis en évidence par une disparition du marquage de la tubuline pour les neurones KO MAP6 (extrait de Andrieux et al., 2002).

In vivo, les microtubules sont stables et souvent insensibles au froid ce qui permet de préserver le cytosquelette cellulaire (Lieuvin et al., 1994). Dans la plupart des types cellulaires, la stabilisation au froid est due à l'action de seulement quelques types de MAP (Houseweart and Cleveland, 1999) comme la MAP6, appelée aussi protéine STOP (stable tubule only polypeptide) (Bosc et al., 1996; Denarier et al., 1998) (**Figure 63**).

6.1.2. Description des souris KO MAP-6 (KO STOP)

Afin d'évaluer directement le rôle de la protéine STOP, l'équipe 1 de l'U836 (GIN) (Dir. Annie Andrieux, anciennement Didier Job), a produit une souris chez laquelle l'expression du gène codant pour cette protéine a été éteinte : les souris KO STOP également appelées KO MAP6. Dans ce chapitre nous utiliserons toujours le terme KO MAP6 pour désigner les souris transgéniques déficientes en gène codant pour la MAP6. La souche utilisée provient du fond génétique 129SvPas/C57Bl6. Les souris sauvages +/+ sont utilisées comme témoins (wild type, WT) et les souris mutantes homozygotes -/- correspondent aux souris KO.

6.1.2.1 Comportement

Les souris KO MAP6 présentent des déficits du comportement social, de la mémoire de travail à court terme et de l'apprentissage social et spatial (Bégou et al., 2008), des problèmes de locomotion, une altération du comportement maternel et une hypersensibilité à un stress modéré (Andrieux et al., 2002; Brun et al., 2005; Fradley et al., 2005). Les souris présentent aussi un déficit de la reconnaissance d'objet et de la mémoire à long terme (Powell et al., 2007; Fournet et al., 2012).

Ces anomalies sont spécifiquement atténuées par une administration chronique de neuroleptiques comme la rispéridone et la clozapine (Delotterie et al., 2010) ou bien par des antidépresseurs comme la fluoxétine (Fournet et al., 2012).

6.1.2.2 Neurotransmission

Neurotransmission glutamatergique

Andrieux et al. ont montré qu'une perte de la protéine MAP6 induit une forte diminution de la stabilité des microtubules entraînant une anomalie synaptique avec une déplétion en vésicules synaptiques et un déficit de la plasticité à court et long terme (Andrieux et al., 2002). L'expression des ARNm de protéines pré- et post-synaptiques a été quantifiée chez les souris KO MAP6, hétérozygotes et WT. Une diminution de l'expression de ces ARNm a été trouvée dans l'hippocampe, le cervelet et le cortex (Eastwood et al., 2007). Ces résultats montrent que la MAP6 est

importante pour le fonctionnement synaptique. Il a été suggéré que cette souris MAP6 $-/-$ pouvait être utilisée pour les études de la plasticité synaptique et de la réponse aux neuroleptiques. En effet, un déficit synaptique peut entraîner une sensibilité aux neuroleptiques. C'est le cas de la schizophrénie (Mirnics et al., 2001), une maladie psychiatrique dans laquelle les patients peuvent présenter des symptômes classifiés en 3 catégories : positifs (hallucinations visuelle et auditive), négatifs (anhédonie, diminution des interactions sociales) et les déficits cognitifs (altération des fonctions exécutives telles que la mémoire de travail et l'attention) (voir pour revue Lewis and Lieberman, 2000).

Il a été montré que la protéine MAP6 et les récepteurs glutamatergiques NMDA (NMDA-R1) sont impliqués dans le développement neuronal. Les souris KO pour les gènes codant pour la protéine MAP6 ou NMDA-R1 présentent un phénotype similaire à la schizophrénie. En effet, ces souris présentent une hyper-locomotion qui peut être compensée par un traitement antipsychotique (la clozapine) mais qui ne peut compenser les perturbations des réflexes sensorimoteurs (test « prepulse inhibition », PPI) observées chez ces souris. Ces symptômes locomoteurs sont retrouvés chez les patients schizophrènes (Fradley et al., 2005) ce qui établit un lien de plus entre la protéine MAP6 et la schizophrénie.

Neurotransmission dopaminergique

Le métabolisme glucidique cérébral des souris KO MAP6 est augmenté dans le cortex olfactif, l'hypothalamus, les aires tegmentales ventrales et la substance noire compacte (par rapport aux souris WT). Selon Hanaya et al., ces données reflètent une hyperactivité dopaminergique ainsi qu'un déficit olfactif et des perturbations du sommeil chez les souris KO MAP6 (Hanaya et al., 2008). La densité en transporteurs dopaminergiques (DA) et en récepteurs D1 n'est pas modifiée. Le taux physiologique de DA et la densité en récepteurs D2 et D3 sont diminués dans les régions dopaminergiques chez des souris KO MAP6. De plus, les souris KO MAP6 présentent une hyper-sensibilité à la cocaïne (qui inhibe la recapture de DA) (Bouvrais-Veret et al., 2008). Brun et al ont montré une augmentation de l'efflux dopaminergique dans le noyau accumbens des souris KO MAP6 (Brun et al., 2005).

Neurotransmission sérotoninergique

Fournet et al. ont montré une augmentation du taux de sérotonine (5-HT) tissulaire au niveau du noyau du raphé chez les souris MAP6 $-/-$. Inversement, dans les aires de projection sérotoninergiques, les souris KO MAP6 présentent une diminution du taux de sérotonine (5-HT) tissulaire (Fournet et al., 2010). Les souris KO MAP6 présentent donc une dysconnectivité sérotoninergique. Cette dysconnectivité peut

être expliqué soit par une diminution de la densité en transporteurs sérotoninergique, soit par un déficit de projection.

Les souris MAP6 $-/-$ présentent un comportement dépressif (test de suspension par la queue, test de nage forcée ou de Porsolt, tests d'éclaboussement, état du pelage, test de préférence au sucrose) associé à une diminution de l'anxiété (test du labyrinthe en croix surélevé, test de champ ouvert, test de la boîte claire/obscur, et le test d'enfouissement des billes) (Fournet et al., 2012). Elles sont hyper-sensibles aux traitements antidépresseurs tels que la fluoxétine, la venlafaxine et la réboxétine.

En résumé les souris KO MAP6 présentent une perturbation du comportement associée à :

- Une hyper-réactivité dopaminergique (système limbique)
- Une diminution de la libération du glutamate (hypo-activité)
- Une dysconnectivité sérotoninergique

6.1.2.3 Anatomie

L'anatomie cérébrale est dépendante du fond génétique utilisé. En effet, il faut que le fond génétique soit homogène pour avoir un phénotype reproductible. L'équipe 1 de l'U836 (GIN), a réalisé plusieurs croisements de souris chez lesquelles le gène codant pour la protéine MAP6 est éteint. Des souris 129S1/Smvlj +/- ont été croisées avec des BalbC +/+ pour donner une première génération F1 129/BalbC +/- . Reproduites entre elles, ces souris donnent naissance à une deuxième génération F2 129/BalbC +/+, +/- et -/-. Les souris KO MAP6 de cette deuxième génération présentent une diminution du volume cérébral de -22% à 3 mois qui ne varie pas en fonction de l'âge (-24% à 12 mois). Cependant, ce fond génétique n'est pas homogène. Des déficits du corps calleux non liés au déficit en protéine MAP6, sont observés.

Finalement, deux lignées de fond génétique pure, KO MAP6 ont été produites : 129SvPas et C57Bl6. Le croisement de deux hétérozygotes donne des animaux de fond génétique homogène (50% 129SvPas et 50% C57Bl6) soit la production de souris WT, hétérozygotes et KO MAP6. Les souris KO MAP6 de cette première génération présentent une diminution de 15% du volume cérébral par rapport aux WT et présentent un élargissement des ventricules latéraux de 168 % (**Figure 64**). Ce fond génétique (F1 129/Bl6) homogène a servi à toutes nos études. Une équipe canadienne a utilisé un fond génétique différent a aussi montré une diminution des volumes ventriculaire et cérébral chez la souris KO MAP6 (Powell et al., 2007).

L'équipe 1 de l'U836 (GIN) a également montré une altération de la taille de certains tracts tels que le fornix, le faisceau mamillo-thalamique, le corps calleux et le faisceau rétroflexe par des techniques de DTI et d'histologie (Deloulme et al., en préparation).

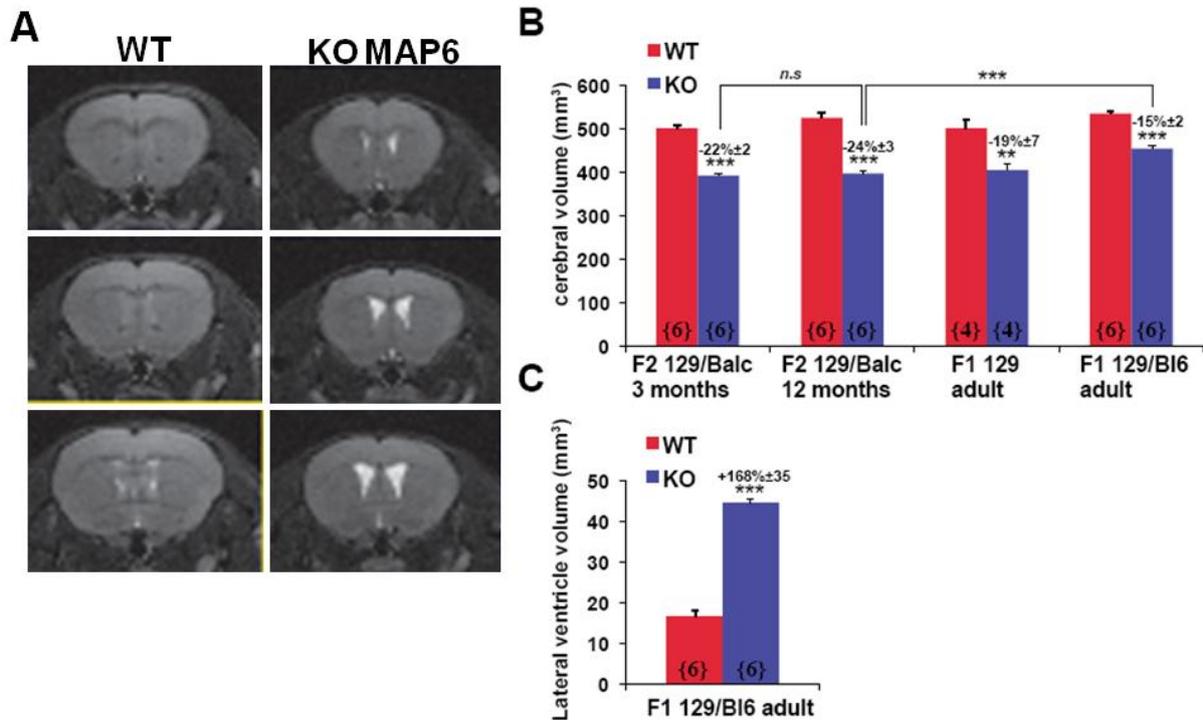


Figure 64 : Volumes cérébral et ventriculaire obtenus par IRM chez 3 fonds génétiques de souris KO MAP6 et WT.

A : Galerie d'images en coupe coronale des souris WT et KO MAP6. Les images pondérées T1 ont été acquises sur un IRM 7T (plateforme d'imagerie petit animale, GIN, Grenoble). Les encadrés jaunes correspondent aux 3 coupes utilisées pour la quantification du volume ventriculaire. **B** : Volume cérébral (mm³) selon les fonds génétiques et l'âge. **C** : Volume des ventricules latéraux chez les souris F1 129/Bl6 adultes.

Ainsi, ces souris KO MAP6 sont un bon modèle d'étude des bases moléculaires et cellulaires des désordres psychiatriques liés aux fonctions mentales supérieures chez l'homme. En effet, il a été montré une disconnectivité neuronale chez les patients atteints de schizophrénie (Sugranyes et al., 2012). Il est donc important de mieux comprendre cette dysconnectivité.

Nous avons étudié la voie olfactive (Etude 1) et la voie thalamo-cortical (Etude 2).

6.2. ETUDE I : Etude de la connectivité fonctionnelle des voies olfactives chez la souris KO MAP6

6.2.1. Introduction

Plusieurs études ont montré la pertinence de l'exploration de la voie nasale par MEMRI pour étudier :

- le traitement des odeurs dans le BO (Pautler and Koretsky, 2002),
- mettre en évidence une excitotoxicité (Gobbo et al., 2012),
- tracer les tracts olfactifs (Cross et al., 2004)
- mettre en évidence l'impact de l'âge, des lésions, de maladies neurodégénératives et de traitements pharmacologiques sur le transport axonal (Cross et al., 2006, 2008; Smith et al., 2007a, 2011; Bertrand et al., 2012).

Il a été montré que lors de l'instillation de Mn dans la cavité nasale, l'ion Mn entre directement en contact avec la muqueuse olfactive (épithélium) contenant les terminaisons des nerfs olfactifs (NO) du bulbe olfactif. Le Mn est ensuite transporté par les axones des NO qui projettent jusqu'aux glomérules contenant les dendrites des cellules mitrales. Les axones des cellules mitrales projettent vers le noyau olfactif antérieur pour connecter le BO opposé et projettent vers le cortex piriforme et le système limbique (**Figure 65**).

Pautler et al. ont montré que l'altération des microtubules par la colchicine et le blocage des canaux calciques par le diltiazem dans le BO altère l'intensité du signal relatif après imagerie IRM pondérée T1 (Pautler and Koretsky, 2002). Ces données suggèrent que le Mn utilise les canaux calciques pour son passage en intracellulaire et est en partie transporté dans les cellules olfactives via les microtubules.

Chez les souris KO MAP6, il a été montré une altération de la neurogenèse olfactive périphérique (Benardais et al., 2010). De plus, il a été montré que chaque isoforme neuronale de la protéine MAP6 est distinguée selon un gradient spécifique dans la couche des NO. De ce fait, Richard et al. ont examiné le développement du système olfactif chez les souris déficientes en MAP6. Ils ont observé une croissance normale des axones olfactifs mais la maturation des synapses dans les glomérules (neuropiles glomérulaires) est altérée (Richard et al., 2009). Ces résultats suggèrent une altération de la connectivité fonctionnelle du BO chez les souris KO MAP6.

L'objectif de cette première étude est de déterminer la connectivité fonctionnelle de la voie olfactive par la technique de MEMRI chez les souris KO MAP6. Nous avons choisie cette voie car sa structure anatomique est simple et très bien décrite dans la

littérature. De plus, c'est une voie facile d'accès pour l'injection d'un traceur. Les régions étudiées correspondent à la couche glomérulaire, aux cellules mitrales du bulbe olfactif et au cortex piriforme. L'évolution du signal MEMRI a été suivie à plusieurs temps après instillation du Mn dans la cavité nasale gauche. Nous avons étudié le temps d'arrivée et l'intensité du signal MEMRI chez les souris WT et KO MAP6.

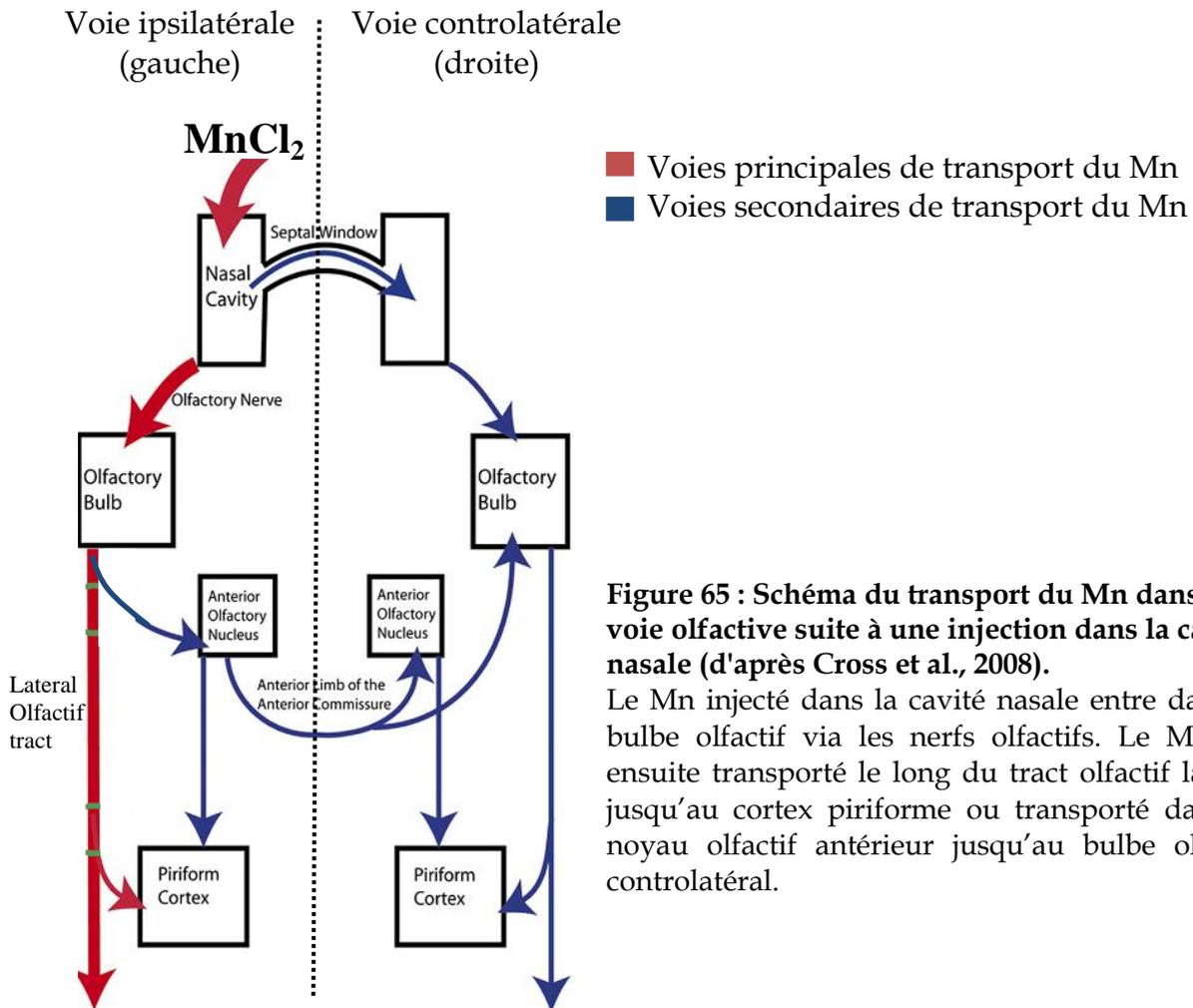


Figure 65 : Schéma du transport du Mn dans la voie olfactive suite à une injection dans la cavité nasale (d'après Cross et al., 2008).

Le Mn injecté dans la cavité nasale entre dans le bulbe olfactif via les nerfs olfactifs. Le Mn est ensuite transporté le long du tract olfactif latéral jusqu'au cortex piriforme ou transporté dans le noyau olfactif antérieur jusqu'au bulbe olfactif controlatéral.

6.2.2. Matériels et Méthodes

6.2.2.1 Animaux

Un total de 14 souris males de fond génétique C57Bl6/129 SvPas-F1 ont été utilisées (3-6 mois, élevage interne, Equipe 1), soit 7 souris WT et 7 souris KO MAP6.

Pour des raisons d'éthique et donc de bien être animal, le comportement des souris (inspection visuelle de la démarche, du pelage, du nez et des yeux) a été surveillé. En cas de souffrance, l'animal aurait été immédiatement euthanasié selon les méthodes conventionnelles. Aucun point limite n'a été atteint pour les doses de $MnCl_2$ utilisées dans ce protocole.

6.2.2.2 Préparation du $MnCl_2$

Une solution de $MnCl_2$ à 5M ($MnCl_2 + 4 H_2O$, poudre, Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) a été préparé dans de l'eau distillée. La solution étant hypotonique, l'osmolarité a été ajustée aux valeurs physiologiques (300 mOsm/L) par ajout de 400 mM de bicine (B3876, Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA).

Le pH des deux solutions a été ajusté à 7,3 par ajout de NaOH 1M. Les solutions ont été stérilisées par filtration sur membrane (0,2 μm de diamètre).

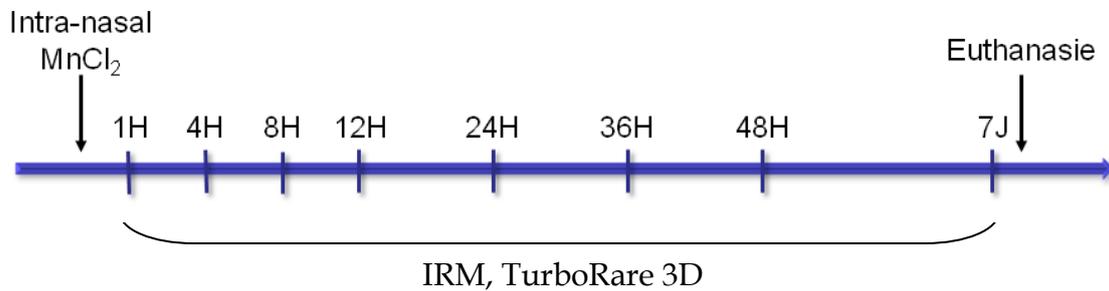
6.2.2.3 Injection du Mn

Une anesthésie générale est induite pendant 1 min avec un mélange d'isoflurane (IsoFlo, Axience, France) et d'air (induction : 5% dans air, maintien : 2% dans air enrichi en O_2 à 40%) afin de limiter le stress de l'animal lors de la contention. Ensuite, 1,5 μL de $MnCl_2$ à 5M est pipeté directement dans la cavité nasale gauche. Le même volume d'anti-inflammatoire 10 mg/L dilué dans du NaCl 7/000 est injecté dans la cavité nasale gauche suite à l'administration de $MnCl_2$ (Voren, 10 mg/L de dexaméthasone 21-isonicotinas, Labiana Life Sciences, Espagne). Les animaux sont ensuite replacés dans leurs cages respectives jusqu'à l'imagerie IRM.

6.2.2.4 IRM *in vivo*

Le protocole d'acquisition IRM est identique à celui décrit dans le chapitre 3 (p. 49). 7 sessions IRM (1h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h, 7 jours) ont été effectuées après injection de l'agent de contraste (voir l'axe de temps ci-dessous). Des images pondérées T_1 ont été obtenues (TurboRare 3D, TR = 300 ms, TE = 20,4 ms, matrice 112 x 128 x 22, FOV = 16 x 16 x 12 mm, taille d'un voxel = 0,125 x 0,125 x 0,545 mm). Le temps d'acquisition était de 14 min par souris, soit 20 min cage à cage. Après chaque session IRM,

l'animal a été replacé dans sa cage en salle de réveil. Après la dernière session IRM (7J), les animaux ont été euthanasiés par dislocation cervicale.



6.2.2.5 Analyse des données IRM

Les données IRM ont été analysées en utilisant un logiciel développé par l'équipe dans l'environnement Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA), appelé UVASC, permettant, dans notre cas, de tracer les régions d'intérêts.

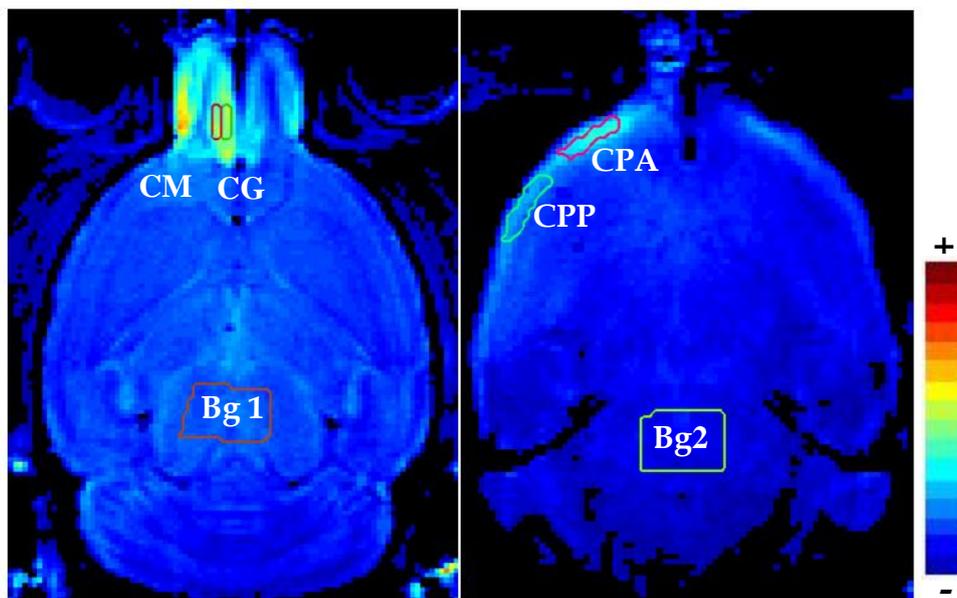


Figure 66 : Régions d'intérêts tracées manuellement sur les images IRM pondérées T_1 après injection de $MnCl_2$ par voie intra-nasale.

Les images IRM (coupes horizontales) utilisées dans cette figure correspondent à des acquisitions sur des souris WT, 24h post-injection. CG : couche glomérulaire ; CM : cellules mitrales ; Bg 1 : signal de référence 1 ; CPA : cortex piriforme antérieur ; CPP : cortexpiriforme postérieur ; Bg 2 : signal de référence 2.

6 régions d'intérêts (ROI) ont été tracées manuellement (**Figure 66**) :

Couche glomérulaire (CG), cellules mitrales (CM), signal de référence 1 (Bg 1), cortex piriforme antérieur (CPA) et postérieur (CPP) et signal de référence 2 (Bg 2).

Le signal de référence a été tracé dans la partie postérieure cérébrale, c'est-à-dire au niveau du noyau du raphé pour la coupe dorsale (Bg 1) et du cervelet pour la coupe ventrale (Bg 2).

L'intensité relative du signal (RSI pour relative signal intensity) a été calculée pour les régions CG, CM, CPA et CPP comme le rapport entre l'intensité de la ROI et l'intensité du signal de référence correspondant à la coupe analysée (Bg1 pour CG et CM ; Bg2 pour CPA et CPP).

6.2.2.6 Analyses statistiques

Les RSI des souris WT et des souris KO MAP6 ont été comparés par un test de Student. Les valeurs ont été déclarées significatives pour $p < 0,05$.

6.2.3. Résultats

6.2.3.1 Evolution du signal au cours du temps

La **Figure 69** représente l'évolution du signal IRM en fonction du temps pour une souris WT à différents niveaux anatomiques. Nous observons un très net rehaussement du contraste au niveau du BO ipsilatéral (gauche) mais aussi du côté controlatéral sur les coupes dorsales. Ces images permettent de distinguer nettement les différentes couches du BO de 4h à 48h après injection de Mn. Un rehaussement est aussi notable au niveau du cortex piriforme ipsilatéral de 8h à 48h après injection de Mn.

Les courbes d'évolution du RSI en fonction du temps montrent une différence entre les souris WT et KO MAP6 (**Figure 67**). Pour les 4 structures analysées, les souris KO MAP6 présentent un RSI diminué par rapport à celui des souris WT. Au niveau de la couche glomérulaire et la couche des cellules mitrales, le RSI est significativement réduit à 24h (-33,87% et -29,13% respectivement) et à 36h (-35,57% et -34,35% respectivement) après l'injection de MnCl₂. L'évolution du signal est sous forme de cloche avec un pic d'intensité à 24h qui diminue jusqu'à 48h post-injection et se stabilise à 7 jours. Concernant le cortex piriforme, l'évolution du signal est en forme de cloche dans le CPA et évolue peu dans le CPP. Le RSI est significativement diminué dans le CPA 24h (-21,25%) après injection et dans le CPP 24h (-14,73%) et 36h (-13,28%) après injection chez les souris KO MAP6, par rapport aux souris WT. A J7, le signal reste élevé dans toutes les ROI étudiées, démontrant la présence de Mn. La particularité des souris KO MAP6 est que le RSI à J7 reste anormalement élevé. Ce résultat vient du fait que les valeurs sont normalisées par le signal de référence (région cérébrale postérieure) qui est plus faible à J7 chez les souris KO que chez les souris WT. Si nous comparons les valeurs d'intensités brutes des ROI, elles sont plus faibles chez les souris KO que chez les WT (**Tableau 13**). De plus, les valeurs brutes des ROI à J7 pour les souris KO sont environs égales à celles retrouvées 4h post injection (CG : 65,1 ± 25,1 ; CM : 59,8 ± 22,4 ; CPA 60,7 ± 11,2 ; CPP : 65,4 ± 9,6).

	CG	CM	CPA	CPP
WT	91,9 ± 22,5	93,1 ± 30,3	88,9 ± 17,2	81,0 ± 12,2
KO	78,5 ± 11,5	78,1 ± 8,5	77,3 ± 6,1	71,9 ± 5,1

Tableau 13 : Valeurs d'intensités brutes des ROI

Les valeurs des ROI brutes obtenues à partir des images IRM 7jours après injection de Mn sont plus faibles chez les souris KO que chez les souris WT.

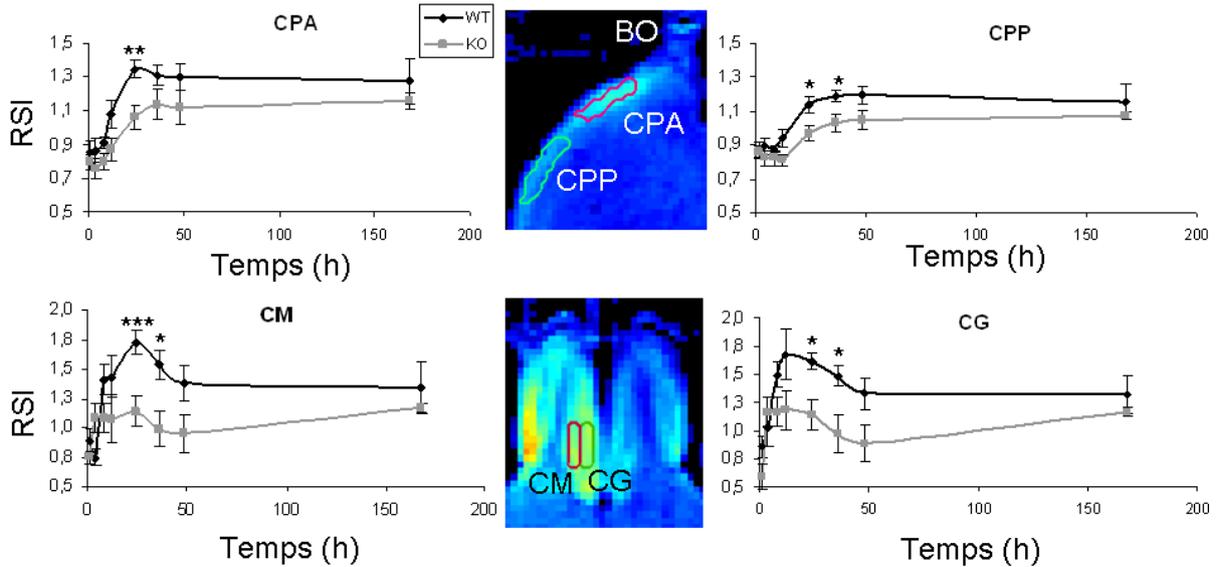


Figure 67 : Evolution de l'intensité du signal en fonction du temps dans le cortex piriforme et le BO.

L'imagerie IRM a été effectuée à 1, 4, 8, 12, 24, 36, 48h et 7jours après injection de $MnCl_2$ dans la cavité nasale gauche ($1,5\mu L$, 5M). Le RSI a été calculé dans 4 ROI différentes. Les CPA et CPP représenté sur les graphiques du haut, et les CM et CG sur les graphiques du bas. Il n'y a pas de différences significatives entre le RSI des souris WT et KO MAP6.

CPA : cortex piriforme antérieur ; CPP : cortex piriforme postérieur ; CM : cellules mitrales ; CG : cellules glomérulaires. WT : n=7 ; KO MAP6 : n=7. Moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

6.2.3.2 Intensité du signal au court du temps

En observant l'évolution du RSI en fonction du temps, nous avons observé une diminution du RSI pour les souris KO MAP6 à des temps donnés après injection de $MnCl_2$ (**Figure 68**). Nous avons alors représenté la moyenne des valeurs de RSI maximales (RSI max) pour chaque structure ainsi que les temps pour lesquels ces valeurs ont été retrouvées. Les valeurs à J7 n'ont pas été prises en compte étant donné qu'elles sont plus intenses qu'au temps précédent chez les souris KO MAP6. Nous observons que la moyenne des RSI max pour les souris WT est significativement plus élevée dans la CG ($1,87 \pm 0,01$) et la CM ($1,80 \pm 0,01$) que dans les cortex CPA ($1,37 \pm 0,13$) et CPP ($1,24 \pm 0,03$) ($p = 1,9 \cdot 10^{-5}$). La même observation est faite pour les souris KO ($p = 7,6 \cdot 10^{-4}$). De plus, le RSI max est significativement diminué dans la CG ($1,44 \pm 0,06$) et la CM ($1,40 \pm 0,06$) chez les souris KO MAP6. Aucune différence n'est observée dans le CPA ($1,27 \pm 0,07$) et le CPP ($1,13 \pm 0,03$).

Concernant le temps post-injection permettant d'atteindre le RSI max pour les souris WT, il est court pour les structures du BO (CG : $16,0 \pm 4,2$ h et CM : $20,6 \pm 2,4$ h) et plus long pour le cortex (CPA : $29,1 \pm 2,6$ h et CPP : $32,6 \pm 3,7$ h). Nous observons une augmentation significative du temps pour atteindre le RSI max chez les souris KO

MAP6 au niveau du CPA ($42,0 \pm 2,7$ h) et du CPP ($40,0 \pm 2,5$ h). Aucune différence n'est observée dans le BO (CG : $21,3 \pm 4,1$ h ; CM : $21,3 \pm 6,0$ h).

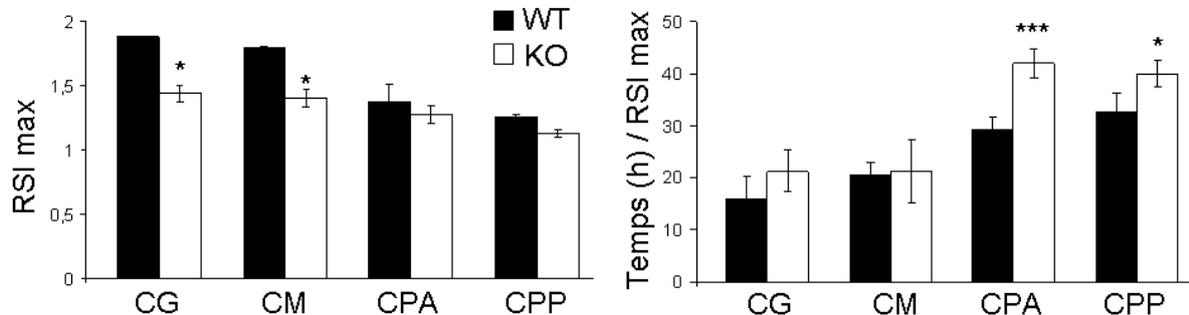


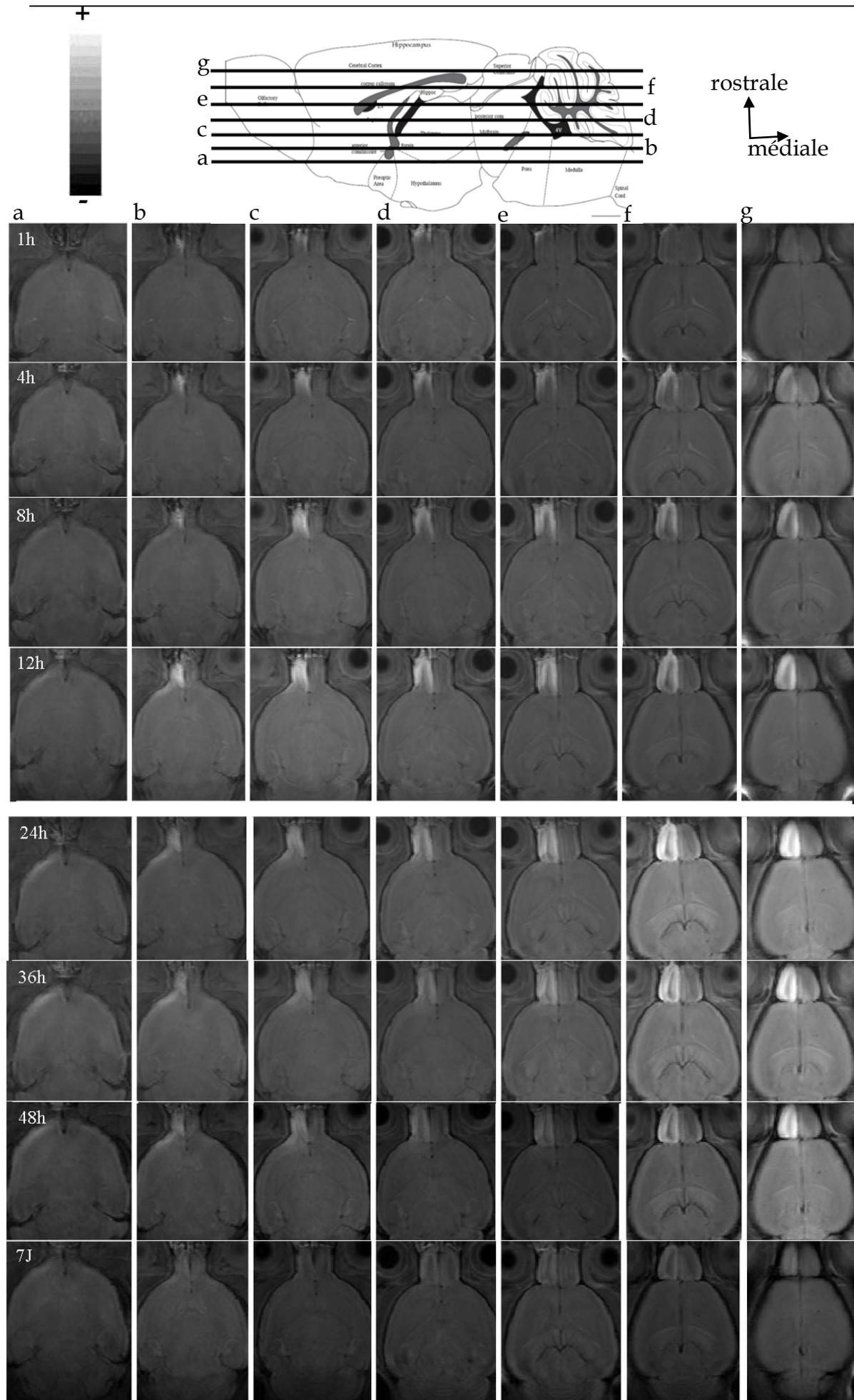
Figure 68 : Intensité du signal (RSI) maximum et temps correspondant.

Le RSI maximum est représenté pour chaque région d'intérêt. Il n'y a pas de différence significative entre les souris WT et KO MAP6. Le temps après injection de $MnCl_2$ correspondant au SNR max est représenté dans le graphique de droite. Le signal maximum met plus de temps à être atteint chez les souris KO MAP6 dans les cortex piriformes antérieur et postérieur.

WT : n=7 ; KO MAP6 : n=7. Moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$

Figure 69 : Suivi longitudinal du tract BO / cortex piriforme par MEMRI chez une souris WT.

Le $MnCl_2$ a été injecté directement dans la cavité nasale gauche ($1,5\mu L$, 5M). L'IRM a été réalisée 1h, 4h, 8h, 12h, 24h, 36h, 48h et 7 jours après injection du traceur. Différentes coupes sagittales sont représentées dans cette figure pour permettre d'observer le cortex piriforme ainsi que le BO à différents niveaux dorso-ventraux.



6.3. ETUDE II : Etude de la connectivité fonctionnelle du tract thalamo-cortical chez les souris KO STOP

6.3.1. Introduction

Parallèlement aux nombreuses études sur le BO, quelques travaux portent sur l'exploration du tract thalamo-cortical par MEMRI afin de mettre en évidence la capacité de cette technique à tracer les voies somato-sensorielles (Leergaard et al., 2003; Tucciarone et al., 2009; Gao et al., 2010), raffiner le protocole (Canals et al., 2008b), étudier la plasticité neuronale et la connectivité suite à une lésion (Allegrini and Wiessner, 2003; Soria et al., 2008; Yu, Chung, et al., 2012) et mettre en évidence l'impact de l'ischémie cérébrale sur la connectivité neuronale (van der Zijden et al., 2007).

Il a été montré que les voies partant du cortex somato-sensoriel S1 sont nombreuses : voies cortico-corticale, cortico-striatale, cortico-thalamique, cortico-técale, cortico-pontine et corticospinale (Douglas and Martin, 2004; Aronoff et al., 2010; Cruikshank et al., 2010). Ces principales voies corticales sont résumées dans la **Figure 70**. L'injection du Mn dans le cortex S1 permet donc de tracer ces différentes voies, la principale et la plus directe étant la voie thalamo-corticale.

L'équipe 1 de l'U836 (GIN) a montrée une altération de la taille de certains tracts tels que le fornix, le faisceau mamillo-thalamique, le corps calleux et le faisceau rétroflexe par des techniques de DTI et d'histologie (Deloulme et al., en préparation). Cependant, l'étude des voies corticales chez les souris MAP6 n'a pas encore été explorée et aucune donnée ne montre l'état de fonctionnalité cérébral de ces souris *in vivo*. De plus, il a été montré, par IRMf, une perturbation du tract thalamo-cortical et une disconnection possible entre le thalamus et le cervelet chez les patients schizophrènes (Andreasen et al., 2008 ISMRM). Sur cette base, nous supposons que les souris KO MAP6 présentent la même perturbation.

L'objectif de cette deuxième étude est de déterminer la connectivité fonctionnelle des souris KO MAP6 au niveau des voies corticales somato-sensorielle par la technique MEMRI. Les régions étudiées correspondent au tract thalamo-cortical et cortico-pontique. Le signal MEMRI a été mesuré à plusieurs temps après injection du Mn dans le cortex S1. Nous avons étudié la différence du temps d'arrivée du signal et de l'intensité de ce même signal MEMRI entre les souris WT et les souris MAP6. Pour finir, une comparaison du traçage de voie par la méthode MEMRI avec les techniques conventionnelles histologique a été effectuée.

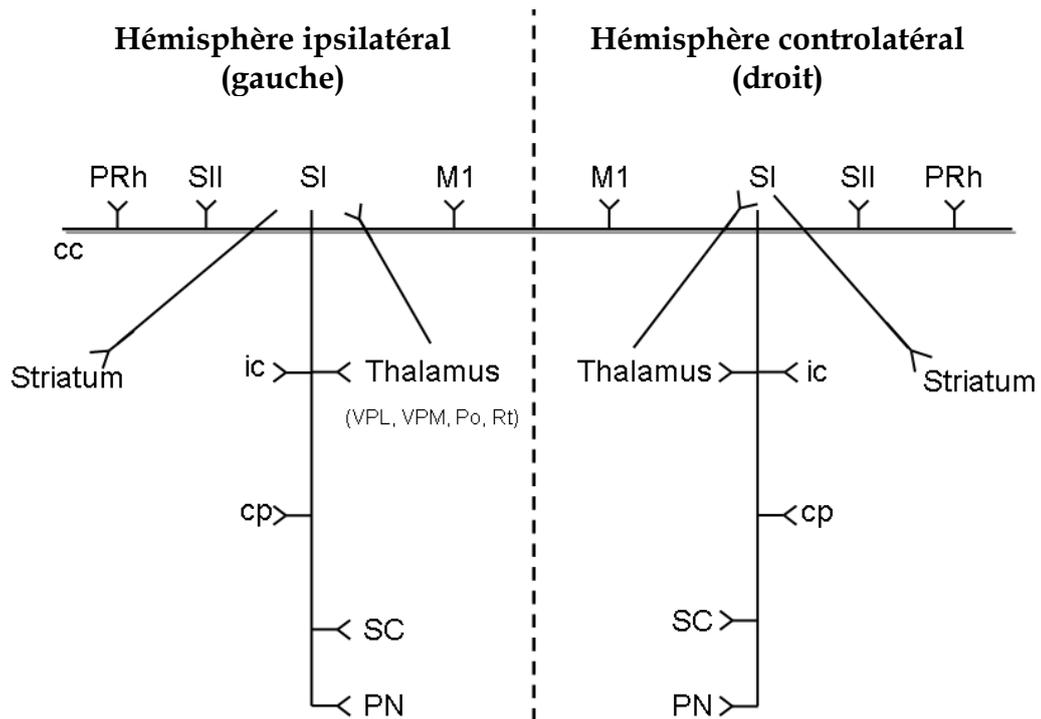


Figure 70 : Voies de projection du cortex somato-sensoriel S1.

cc : corps calleux ; cp : pédoncule cérébral ; ic : capsule interne ; M1 : cortex moteur 1 ; PN : noyau pontique ; PRh : perirhinal cortex ; sc : colliculus supérieur ; SI : cortex somato-sensoriel 1 ; SII : cortex somato-sensoriel 2.

6.3.2. Matériels et Méthodes

Les expériences réalisées dans ce chapitre sont résumés dans la **Figure 71**.

6.3.2.1 Animaux

Un total de 30 souris males de fond génétique C57Bl6/129 SvPas-F1 ont été utilisées (3-6 mois, élevage interne, Equipe 1), soit 15 souris WT et 15 souris KO MAP6.

20 souris ont été utilisées dans un premier temps pour l'étude des tracts par IRM *in vivo* puis dans un second temps pour les colorations gold (10 souris), CV (4 souris) et DiI (6 souris). 10 souris ont été utilisées pour l'étude des tracts par injection de lentivirus (**Figure 71**).

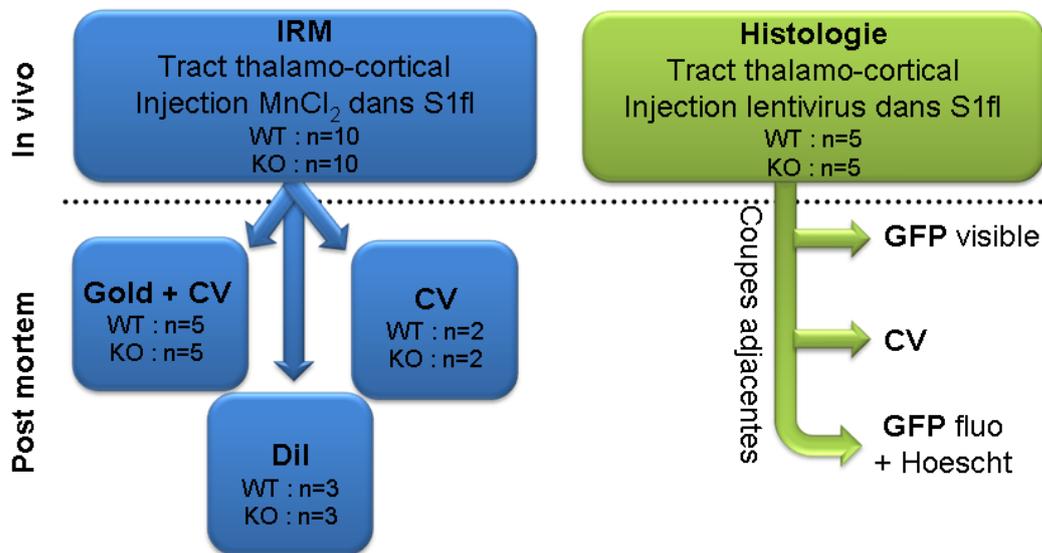


Figure 71 : Schéma récapitulatif de la méthodologie utilisée pour l'étude du tract thalamo-cortical chez les souris KO MAP6.

L'étude du tract thalamo-cortical a été réalisée grâce à deux méthodes. La première est l'imagerie *in vivo* MEMRI et la seconde l'histologie *post mortem*. Suite à l'IRM, les cerveaux sont récupérés et utilisés pour les marquages de la myéline au Gold, la vérification du site d'injection et les études anatomiques par marquage au crésyl violet (CV) et pour le marquage du tract thalamo-cortical par le cristal DiI. Concernant la deuxième méthode, les cerveaux sont récupérés et 3 marquages histologiques ont été effectués sur des coupes adjacentes dans l'ordre suivant : marquage immunologique de la GFP, marquage au CV, marquage immunofluorescent de la GFP.

6.3.2.2 Préparation du MnCl₂

Une solution de MnCl₂ à 100mM (MnCl₂·4H₂O, M1787, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a été préparée dans de l'eau distillée et 10 mM de Tris-HCl pH=7,3. Comme chaque mole de MnCl₂ correspond à 3 Osm, une concentration de 100mM est

nécessaire pour avoir une osmolarité physiologique de 300mOsm/L. Les solutions ont été stérilisées par filtration sur membrane (0,2µm de diamètre).

6.3.2.3 Injection du Mn

Une collaboration avec Véronique Coizet de l'équipe 8 du GIN a été entreprise pour la création d'un microsystème d'injection. Cela dans le but d'injecter de petites quantités de Mn, de l'ordre du nL et de limiter les dégats cellulaires dus à l'épaisseur de la canule.

Une canule en silice (diamètre extérieur de 150 µm) a été fabriquée et reliée à un cathéter de polyéthylène PE20. Ce dernier a été relié à une seringue Hamilton de 5µL. Le système a été rempli avec de l'eau distillée (le sel du sérum physiologique risque de boucher la canule).

Le MnCl₂ a été injecté stéréotaxiquement sous anesthésie générale en utilisant des techniques aseptisées. Une sédation a tout d'abord été effectuée avec une injection IP de Xylazine 10 µL/g (0,1 % dilué dans du NaCl 9/000 ; Rompun®, Virbac, France) puis l'anesthésie générale a été induite par injection IP de Kétamine 10 µL/g (10 g/L dilué dans du NaCl 9/000 ; Imalgène 1000®, Virbac, France). Pour la craniotomie, l'animal a été placé en décubitus ventral sur la table stéréotaxique. Il a été immobilisé et calé grâce à deux barres d'oreilles logées dans le méat auditif et à une barre d'incisives pour maintenir la mâchoire et véhiculer l'anesthésie gazeuse. Une incision allant de la région frontale à la région occipitale a été réalisée, exposant les sutures coronales, sagittales et transversales. La surface crânienne osseuse a été soigneusement ruginée et asséchée. Les coordonnées d'implantation de la canule dans le cortex somatosensoriel (S1fl) droit de la souris ont été déterminées à partir de l'atlas de Paxinos and Franklin 2001 : AP -0,6 mm, ML -2,0 mm et DV -0,7 mm (**Figure 72**). Le trou de trépanation, localisé selon les coordonnées stéréotaxiques à partir du bregma, a été effectué à l'aide d'une aiguille (25 gauge), sans endommager le cerveau. Les méninges ont ensuite été percées à l'aide de cette même aiguille. La canule a été reliée à un pousse-seringue électrique permettant de délivrer la solution de MnCl₂ (100 mmol/L ; 60 nL) ou de solution contrôle à un débit constant de 8 nL/min. Ce débit assez faible permet de limiter les dommages mécaniques et biologiques portés aux tissus cérébraux. A la fin de l'injection, la canule a été laissée en place pendant 10 min puis retirée lentement afin d'éviter des fuites de la solution injectée le long du trajet de l'aiguille. La plaie a ensuite été suturée à l'aide de fil stérile. La température rectale a été monitorée et maintenue à ~37°C à l'aide d'une couverture chauffante.

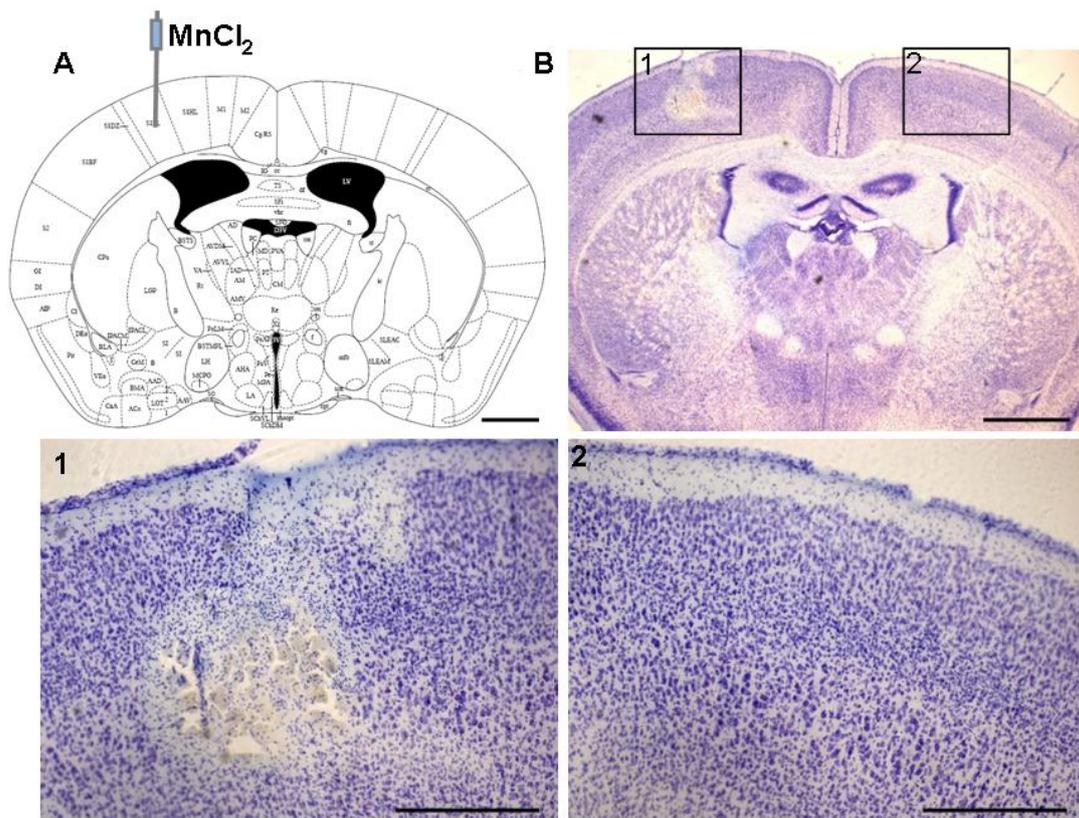


Figure 72 : Injection de $MnCl_2$ dans le cortex somato-sensoriel S1fl.

A. Le $MnCl_2$ a été injecté à raison de 60nl, 100mM dans le cortex S1fl gauche des souris WT et KO MAP6. L'injection est représentée sur un plan de l'atlas stéréotaxique de Paxinos et Franklin, 2001. B. L'injection a été contrôlée par un marquage au crésyl violet des tissus. L'image 1 correspond à la zone d'injection (gauche) et l'image 2 au côté controlatéral (droit). Barre d'échelle=1mm.

Un traitement post-opératoire a été effectué afin de faciliter le réveil de l'animal. La douleur due à la craniotomie est assez faible et est compensée par la Xylazine (antalgique). De plus, une anesthésie locale (post-opératoire) a été effectuée au site d'incision par application cutanée de bupivacaine pure (Vétoquinol, France, durée d'action : 1h). Un traitement anti-inflammatoire au caprofène (5 μ g/g, Rimadyl®, Virbac, France) et des antibiotiques (mélange de sufadoxine 20% et triméthoprime 4% ; 0,125 μ L/g, Borgal®, Virbac, France) ont été administrés par voie sous cutanée. Pour finir, une injection IP de 500 μ L de NaCl 9/1000 a été réalisé afin de limiter la déshydratation des animaux.

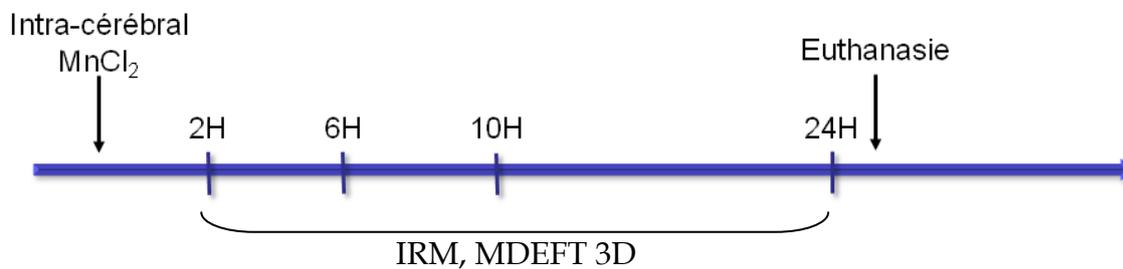
Les souris ont ensuite été placées dans une cage thermostatée à 30 °C jusqu'à leur réveil complet (soit environ 1h), puis transférées dans leur cage d'origine contenant de la nourriture hydratée.

6.3.2.4 IRM *in vivo*

Le protocole d'acquisition IRM est identique à celui décrit dans le Chapitre 3, p. 49.

4 sessions IRM (5h, 6h, 10h et 24h) ont été effectuées après injection de l'agent de contraste (voir l'axe de temps ci-dessous). Des images pondérées T_1 ont été obtenues (MDEFT 3D, TR = 4000 ms, TE = 3,65 ms, matrice 128 x 128 x 64, FOV = 14 x 14 x 16 mm, taille d'un voxel = 0,109 x 0,109 x 0,250 mm). Le temps d'acquisition était de 17 min par souris, soit 23 min cage à cage. Après chaque session IRM, l'animal a été replacé dans sa cage en salle de réveil. Après la dernière session IRM (24h), les animaux ont été euthanasiés par perfusion intracardiaque (décrit ci-après).

L'expérience a été arrêtée 24h après l'injection de Mn car nous avons montré, dans l'étude I, que cette durée correspond au pic d'intensité du signal dû au Mn.



6.3.2.5 Analyse des données IRM

Neuf régions d'intérêts (ROI) ont été tracées manuellement dans chaque hémisphère cérébral (ipsi et controlatéral) (**Figure 73**) :

capsule interne (ci), cortex somatosensoriel primaire forelimb (Cxfl), cortex somatosensoriel secondaire (S2), cortex des associations pariétales (PtA), cortex auditif secondaire (AuD), thalamus antérieur (ant TH) et thalamus postérieur (post TH, composé des deux noyaux thalamiques visibles en MEMRI : le noyau thalamique postérieur (Po) et les noyaux thalamique postéro-latéral ventral (VPL) et postéro-médial ventral (VPM)) et pour finir le pédoncule cérébral (pc).

L'intensité relative du signal (RSI pour relative signal intensity) est exprimée comme la fraction sur l'intensité du signal du cortex ipsilatéral S1fl. Ce calcul permet de normaliser l'intensité du signal par la quantité de Mn délivrée dans le cortex S1fl, susceptible de varier légèrement d'un animal à l'autre. Le RSI est calculé pour toutes les ROI décrites précédemment.

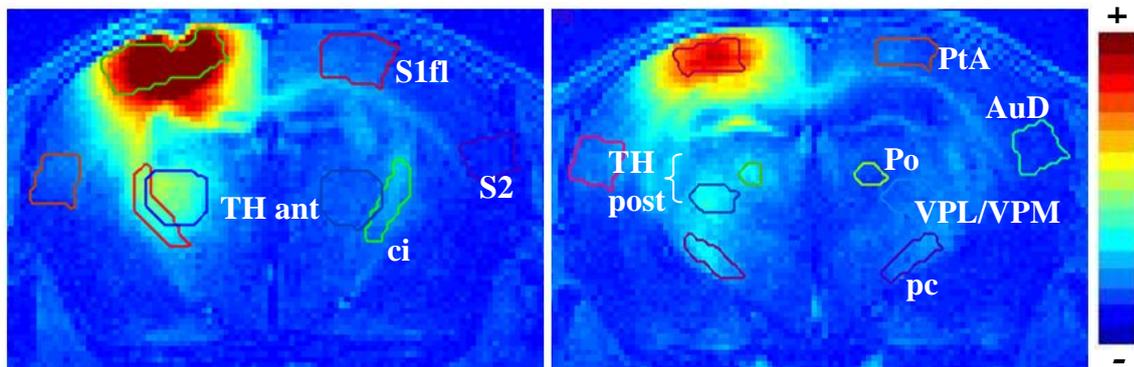


Figure 73 : Régions d'intérêt (ROI) tracées manuellement sur les images IRM pondérées T₁ après injection de MnCl₂ par voie intra-cérébrale.

Les images IRM utilisées dans cette figure correspondent à des acquisitions sur des souris WT, 10h post-injection. Deux plans coronaux postérieurs au site d'injection sont étudiés.

ci : capsule interne ; Cxfl : cortex somatosensoriel primaire forelimb, S2 : cortex somatosensoriel secondaire ; PtA : cortex des associations pariétales ; AuD : cortex auditif secondaire ; TH ant : thalamus antérieur ; TH post : thalamus postérieur (composé des Po et les VPL/VPM) ; pc : pédoncule cérébral.

6.3.2.6 Traçage du tract thalamo-cortical par injection cérébrale de lentivirus

Une solution de lentivirus codant pour la GFP (green fluorescent protein) a été injectée par stéréotaxie afin d'infecter les neurones corticaux S1. Le génome viral codant pour la GFP s'intègre dans l'ADN des neurones infectés ce qui entraîne l'expression de la GFP par le neurone. Distribuée dans les axones jusqu'aux synapses, la GFP permet de visualiser les axones des neurones corticaux S1 par microscopie optique. Le marquage est dit « monosynaptique », c'est-à-dire que la protéine GFP ne passe pas les synapses. La production du lentivirus, encore appelé lentivecteur (SIN-PGK-GFP-WHV/VSV-G), est effectuée par un laboratoire extérieur au GIN (Nicole Déglon, Commissariat à l'Energie Atomique, Grenoble et MIRCen, Institut d'Imagerie BioMédicale, Paris). Ce lentivecteur ne contient plus de séquences régulatrices de la transcription et est incapable de produire d'autres virus après avoir infecté un neurone (Hottinger et al., 2000). Des tubes de 20 µl de lentivecteur concentré (150 µg/ml) congelés sont expédiés dans la carboglace à notre laboratoire. Lors de sa réception, le lentivirus est conservé à -80 °C. Il est décongelé le jour de l'injection et ouvert en zone A2. Toutes les manipulations ont été effectuées en animalerie de type A2.

La même procédure expérimentale (mêmes coordonnées stéréotaxiques que pour l'injection de MnCl₂ dans le cortex somatosensoriel S1fl) a été effectuée pour l'injection du lentivirus. Seul la canule et le volume d'injection changent. Le volume

injecté est de 750 nL de solution virale pure (150 µg/mL, soit 11,2 ng) et la vitesse d'injection est de 0,08 µL/min.

Deux semaines sont nécessaires à l'expression maximale du virus dans les neurones et à la diffusion de la GFP dans les neurites. Après ce délai, les animaux sont euthanasiés par perfusion intracardiaque (décrite ci-dessous).

6.3.2.7 Euthanasie et préparation des cerveaux

Après les expériences d'IRM ou d'injection de lentivirus, les souris ont été anesthésiées par une injection IP de pentobarbital (100 mg/kg), et ont été fixées par perfusion intracardiaque de PBS (tampon phosphate salin : 130 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, pH = 7,4) puis par une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4%. Les cerveaux ont été prélevés et post-fixés une nuit à 4 °C dans du PFA 4% puis incubés 36 h dans une solution de sucrose 30%. Enfin, les cerveaux ont été congelés dans de l'isopentane à -20 °C et conservés à -80 °C. Par la suite des coupes coronales de 25 µm d'épaisseur ont été réalisées au cryomicrotome (Microm H 560). Les coupes flottantes ont été conservées à 4 °C dans une solution de PBS additionnée d'azide de sodium 0,01% (anti-fongique et anti-bactérien).

6.3.2.8 Traçage du tract thalamo-cortical par injection de DiI

Après prélèvement des cerveaux, les cristaux de DiI (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, Sigma) sont directement déposés dans le trou produit par la canule d'injection du MnCl₂. Le DiI est un traceur lipidique capable de diffuser lentement (de façon antérograde et rétrograde) le long des lipides membranaires et est également fluorescent. Pour notre étude, une fois le cristal de DiI implanté dans le cortex S1fl, 3 mois d'incubation dans du PFA à 37°C ont été nécessaires afin que le cristal diffuse tout au long du tract. Par la suite, les cerveaux ont été conservés à 4°C afin de diminuer la diffusion du DiI. Les cerveaux ont été inclus dans de l'agarose 4%, coupés au vibratome (VT 1000S, Leica, Allemagne) en sections coronales et sagittales de 30 µm d'épaisseur et montées sur lame. Les coupes sur lames ont été montées sous lamelles avec du milieu « Fluor guard », spécifique pour la conservation de la fluorescence (Scytek, Logan, USA) et soudées par du vernis.

6.3.2.9 Immuno-marquage de la GFP

L'intensité du signal de la GFP a été amplifiée par immuno-marquage de la protéine. Trois lavages successifs des coupes flottantes au phosphate buffer saline (PBS 1X) ont été suivis par une perméabilisation dans une solution de PBS 1X, triton 0,3% et sérum

normal de chèvre 5%. Après 3 nouveaux rinçages dans du PBS 1X, une incubation d'une nuit à 4°C a été effectuée dans une solution de blocage (PBS 1X, triton 0,1%, tween 0,1% et sérum normal de chèvre 1%) contenant l'anticorps (Ac) primaire anti-GFP de lapin (Ac polyclonal, dirigé contre la GFP, A11122, Invitrogen, USA) dilué à 1 :10000. Après trois lavages au PBS 1X, les coupes ont été incubées pendant 60 min à température ambiante dans la solution de blocage contenant l'anticorps secondaire biotinilé dirigé contre le lapin (Ac de mouton, 656140, Invitrogen, USA) dilué à 1 :750. Après trois rinçages, les coupes sont incubées 90 min à température ambiante dans un mélange d'extravidine/peroxydase (E2886, Sigma Aldrich, USA) dilué au 1 :1000 dans du PBS 1X, permettant l'amplification du signal. Après rinçage, le marquage est révélé grâce au kit DAB (DAB Peroxidase Substrate Kit, 3,3'-diaminobenzidine, SK-4100, Vector, USA), formant une coloration noire. La réaction est stoppée par rinçage des coupes dans du PBS 1X. Les coupes sont montées sur lames préencollées (Superfrost plus adhesion slides, Thermo Scientific, Allemagne) avec une solution d'eau + tween 0,01%. Les lames sont montées sous lamelles avec du DPX (DPX mountant for histology, 44581, Sigma Aldrich, USA). Les marquages ont été observés à l'aide d'une loupe binoculaire (EZ4 HD, Leïca, Allemagne) et pris en photo avec un système numérique intégré.

6.3.2.10 Histologie

Marquage au Gold :

Ce marquage met en évidence la myéline et permet de visualiser les tracts neuronaux. En effet, l'or marque spécifiquement les lipides et les protéines de la myéline. Une fois les coupes rincées au PBS 1X, celles-ci ont été plongées dans une solution de chlorure d'or 0,2% (chlorure cristallin d'or 0,2% + phosphate de sodium monobasique monohydraté 0,03% et dibasique déshydraté 4% + chlorure de sodium 9%) 2 heures à température ambiante. Les coupes ont ensuite été plongées 5 minutes dans une solution de sodium thiosulfate 2,5% diluée dans de l'eau afin de stopper la réaction. Après un rinçage dans du PBS 1X, les coupes ont été montées sur lames puis contre-colorées au crésyl violet (décrit ci-dessous).

Marquage au crésyl violet (CV) :

Cette coloration a été utilisée pour vérifier la zone d'injection du Mn et pour les études anatomiques.

Le CV permet de colorer les corps de Nissl présents dans les corps cellulaires. Cette coloration a été effectuée par immersion des lames (coupes montées sur les lames au préalable) dans différents bains. Les lames ont tout d'abord été plongées dans une solution de CV (0,1% pH= 3,4 avec de l'acide acétique glacial (A9967, Sigma Aldrich,

USA) pour une contre-coloration et 0,5%, pH neutre pour une simple coloration) diluée dans de l'eau distillée. Après rinçage dans l'eau, les lames ont été plongées dans plusieurs bains successifs d'éthanol à différents pourcentages (50%, 70%, 95% et 100%) afin de décolorer et déshydrater les coupes. Pour finir, les lames ont été plongées dans une solution d'histolemon (solution hydrophobe contrairement à la solution d'éthanol), permettant une meilleure adhérence du milieu de montage (Depex, hydrophobe).

6.3.2.11 Analyses histologique des tracts myélinisés

Les coupes sont observées à l'aide d'une loupe binoculaire (Wild M32 stereo microscope, Leica, Allemagne) et prises en photo avec un système numérique intégré.

Pour chaque cerveau, 3 coupes flottantes (coronales) ont été sélectionnées à la loupe binoculaire à partir des repères anatomiques décrits dans l'atlas de Paxinos et Franklin, 2001 correspondant aux plans a (zone d'injection S1fl), b (coupe postérieure à la coupe A) et c (coupe postérieure à la B, début de l'hippocampe ventral) exposés dans la **Figure 74**.

Les aires des structures suivantes ont été déterminées : ic, pc, Cx et du TH ainsi que les épaisseurs du cc et du Cx. Les mesures sont réalisées à partir des acquisitions numériques en utilisant le logiciel Image J (NIH, Etats-Unis).

6.3.2.12 Analyses statistiques

Sur les images GOLD, les aires des tracts des souris WT et KO ont été comparées avec un test de Student.

Les RSI des souris WT et des souris KO MAP6 ont été comparés par un test de Student. Les valeurs ont été déclarées significatives pour $p < 0,05$.

6.3.3. Résultats

6.3.3.1 Taille des tracts chez la souris KO MAP6 mis en évidence par marquage myélinique (Gold)

Les marquages au Gold révèlent une diminution de l'aire de la plupart des tracts cérébraux chez la souris KO MAP6 (Figure 74).

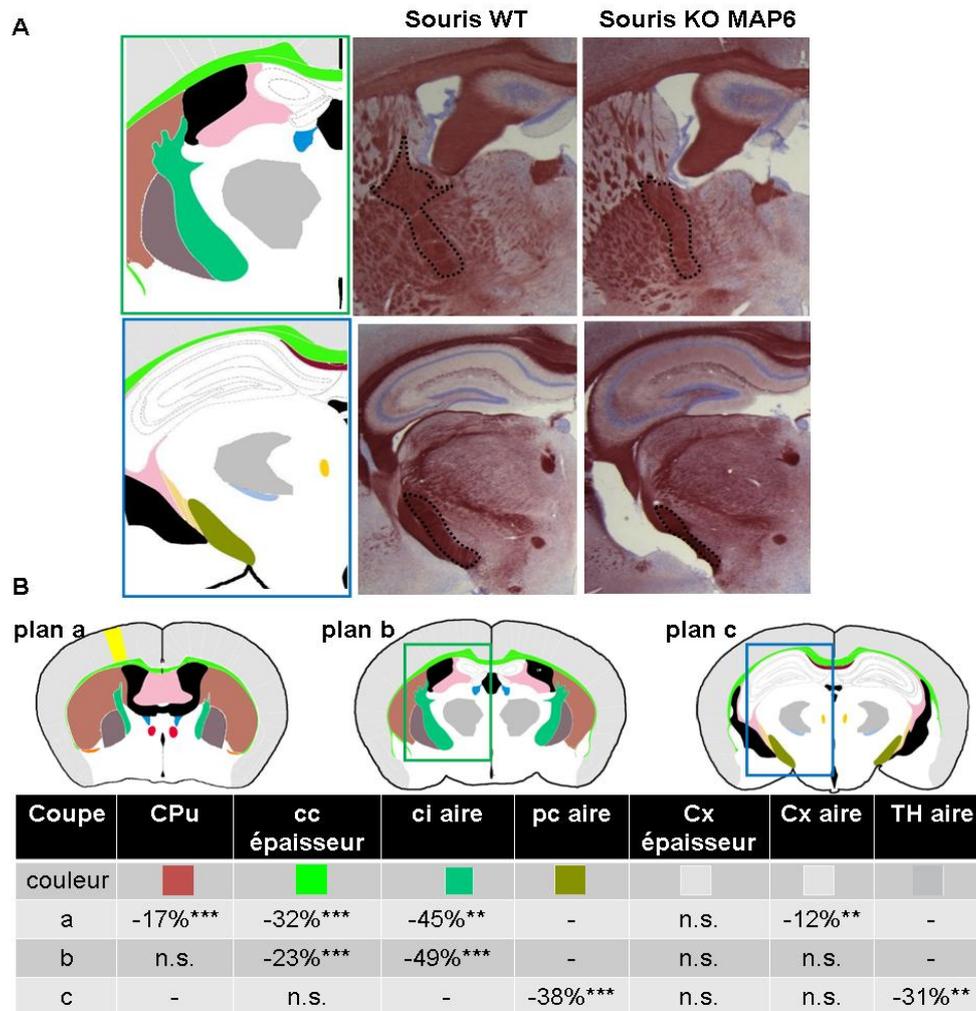


Figure 74 : Quantification de la surface des tracts des souris KO MAP6 par marquage Gold.

A. Marquage Gold chez les souris WT et KO MAP6 avec contre coloration au CV. Les pointillés délimitent la ci dans les images du haut et le pc dans celles du bas. La surface de ces deux structures est diminuée chez les souris KO MAP6.

B. Différence d'aires ou d'épaisseurs entre KO et WT pour les structures suivantes : cc, ci, pc, Cx et TH au niveau de trois coupes coronales.

WT : n=5 ; KO MAP6 : n=5. Moyenne ± SEM. *p<0,05 ; **p<0,005 ; ***p<0,001.

cc : corps calleux, ci : capsule interne, CPu : caudate putamen, pc : pédoncule cérébrale, TH : thalamus.

La quantification de la surface des tracts a été effectuée sur trois coupes coronales anatomiquement distinctes (n=5 souris). Le premier plan (a) correspond à la région d'injection du MnCl₂ dans le S1fl, et présente le début de formation de la capsule interne et la fin du striatum. Le deuxième plan (b) est postérieur au site d'injection. Il comprend la formation hippocampique, la ci et le TH ant. Le dernier plan (c) est postérieur au site d'injection et au plan précédent et comprend la formation de l'hippocampe ventrale, le pc et le TH post (**Figure 74**).

Nous observons une diminution des surfaces de toutes les régions quantifiées (CPu, cc, ci, cp et TH) à l'exception du cortex. En effet, l'épaisseur du cortex n'est pas changée chez les souris KO MAP6 et son aire est trouvée diminuée seulement au niveau du plan a.

6.3.3.2 Traçage du tract thalamo-cortical par MEMRI

Après les marquages au CV, nous observons que le tissu au niveau du site d'injection est altéré (**Figure 72**). Les dégâts cellulaires sont cependant limités au CxS1fl (1mm de largeur). Seules les coupes coronales correspondant aux plans anatomiques b et c décrits précédemment sont exploitées pour cette étude MEMRI. En effet les coupes correspondant à la zone d'injection (plan a) présentent un artéfact en imagerie pondérée T₁ (trace noire) dû à la présence de sang au site d'injection (résultat non montré).

Après injection du MnCl₂, nous observons un fort contraste (en IRM) au niveau du cortex S1fl et un contraste modéré au niveau de la capsule interne ipsilatérale 2h après l'administration du traceur (plan b). Concernant les structures plus postérieures au site d'injection (plan c), peu de contraste est observé 2h post-injection. A 6h post-injection, nous distinguons le TH ant, le TH post (Po, VPM/VPM) la ci et le pc ipsilatéraux. En controlatéral, seul le cortex S1fl et la ci sont visibles. A 10h après injection, les mêmes structures ont un contraste rehaussé ainsi que les cortex S2, PtA et AuD en ipsilatéral et le pc et TH post en controlatéral. Un jour après l'injection de MnCl₂, le contraste est diffus dans tout le cerveau mais les structures correspondant aux tracts thalamo-cortical et cortico-pontique sont encore distinctes du bruit de fond. Aucune différence visuelle de la répartition du signal n'est observée, les souris KO MAP6 présentent la même distribution du signal MEMRI que les WT (**Figure 75**).

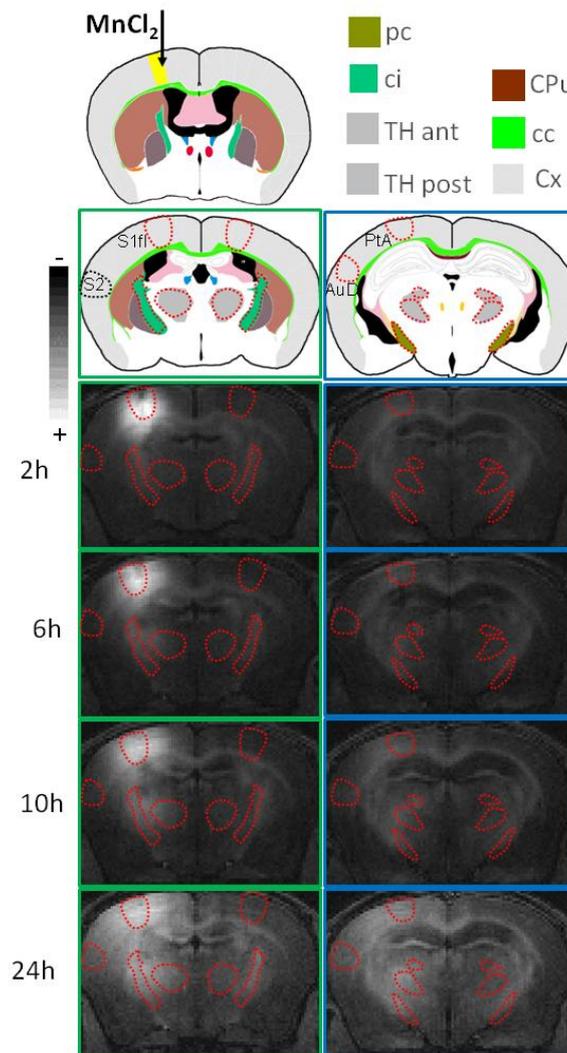


Figure 75 : Evolution du signal au cours du temps après injection de $MnCl_2$ dans le cortex S1fl chez une souris WT.

Le Mn a été injecté dans le cortex S1fl (60 nL, 100 mM).

A. Plan b, coupe coronale postérieure au site d’injection. Les traits en pointillés représentent les structures dont le contraste est rehaussé avec le Mn telles que les Cx S1fl et S2, ainsi que le TH ant et la ci.

B. Plan c, coupe coronale postérieure au site d’injection et au plan b. Les traits en pointillés représentent les structures dont le contraste est rehaussé avec le Mn telles que les Cx (PtA et AuD), TH post (Po, VPL/VPM) et pc.

ci : capsule interne ; CPU : caudate putamen ; CxS1fl : cortex somatosensoriel primaire forelimb, S2 : cortex somatosensoriel secondaire ; PtA : cortex des associations pariétales ; AuD : cortex auditif secondaire ; TH ant : thalamus antérieur ; TH post : thalamus postérieur (composé des Po et les VPL/VPM) ; pc : pédoncule cérébral.

6.3.3.3 Evolution du RSI au cours du temps

Les graphiques du RSI en fonction du temps sont présentés (plan b, **Figure 76** et plan c, **Figure 77**). Le RSI augmente en fonction du temps dans toutes les structures étudiées (ci, pc, TH et Cx). L’intensité du signal est similaire entre les souris WT et

KO MAP6 de 2h à 10h post injection dans toutes les ROI étudiées. Seuls les RSI 24h après injection de MnCl₂ sont significativement diminués chez les souris KO MAP6 vs WT dans la ci ipsi/contro, le cp ipsi/contro, les Cx S2 et Au 1 ipsi, le TH ant et post contro et le Cx S1 contro. Ces différences 24h après injections sont représentées dans la Figure 78.

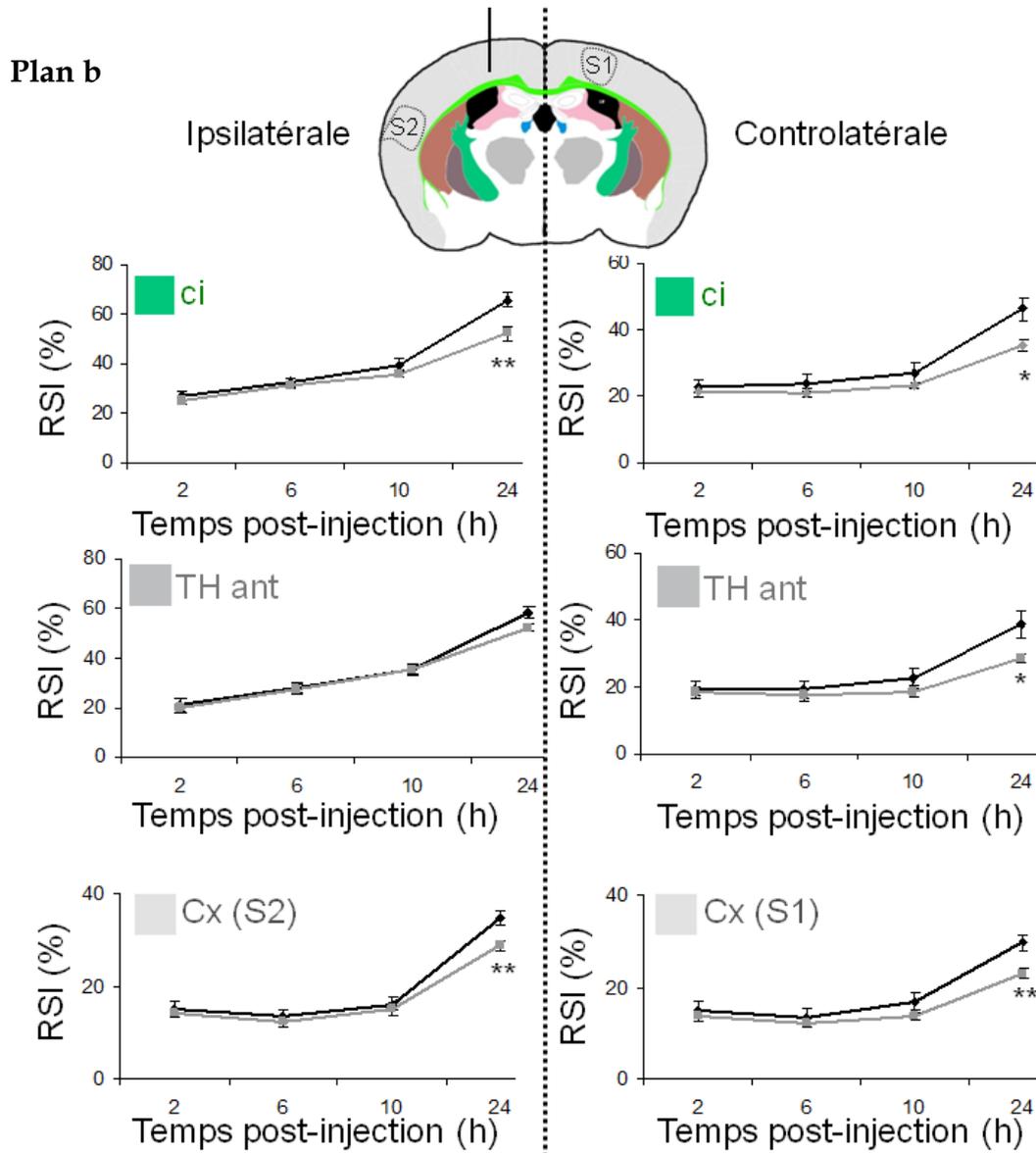


Figure 76 : Intensité du signal relatif (RSI %) en fonction du temps dans la structure b après injection de MnCl₂ dans le cortex S1 chez les souris WT et KO MAP6.

Le RSI augmente en fonction du temps dans toutes les structures étudiées (ci, TH et Cx). Le RSI est identique entre les souris WT et KO MAP6 de 2h à 10h après injection puis, à 24h une diminution significative du RSI est observée chez les souris KO MAP6 dans quasiment toutes les structures : ci ipsi et contro, TH ant contro, Cx S2 ipsi et Cx S1 contro. WT : n=10 ; KO MAP6 : n=10. Moyenne ± SEM. *p<0,05 ; **p<0,005.

ci : capsule interne ; S1fl : cortex somatosensoriel primaire forelimb ; S2 : cortex somatosensoriel secondaire ; TH ant : thalamus antérieur.

Plan c

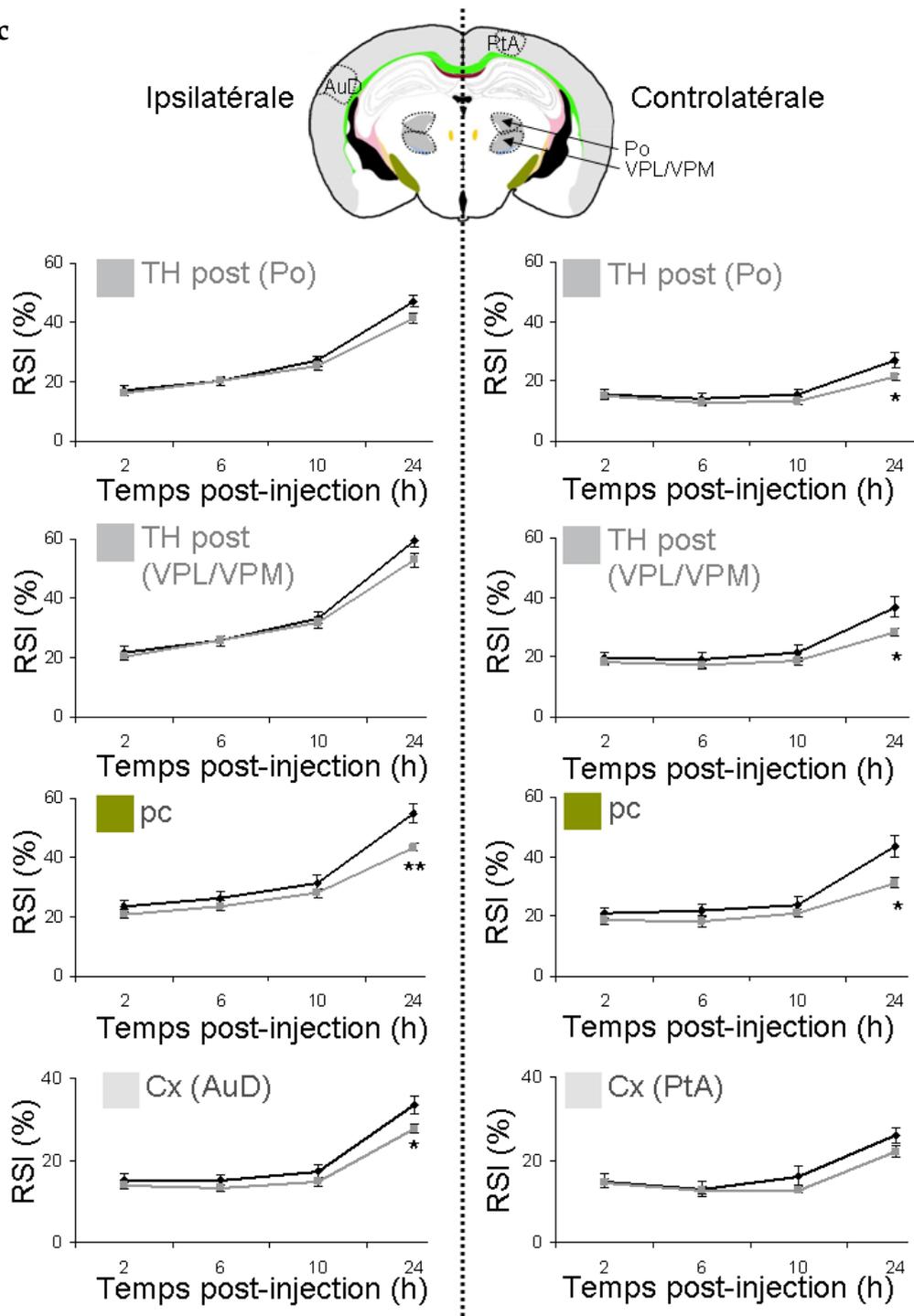


Figure 77 : Intensité du signal relatif (RSI %) en fonction du temps dans la structure c après injection de $MnCl_2$ dans le cortex S1 chez les souris WT et KO MAP6.

Le RSI augmente en fonction du temps dans toutes les structures étudiées (TH, pc et Cx). Le RSI est identique entre les souris WT et KO MAP6 de 2h à 10h après injection puis, à 24h une diminution significative du RSI est observée chez les souris KO MAP6 dans les structures : TH post contro, pc ipsi et contro et Cx S2 ipsi. WT : n=10 ; KO MAP6 : n=10. Moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

AuD : cortex auditif secondaire ; pc : pédoncule cérébral ; PtA : cortex des associations pariétales ; TH post : thalamus postérieur (composé des Po et VPL/VPM).

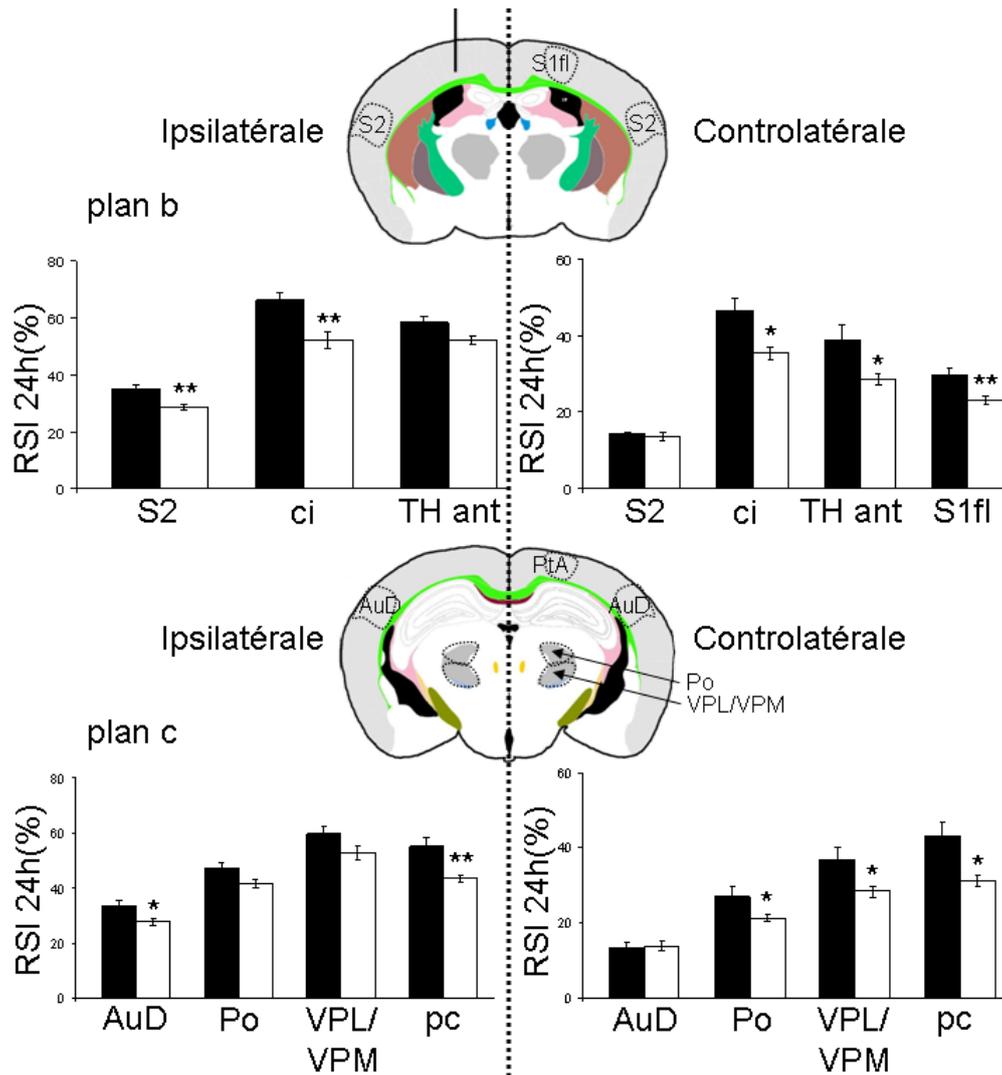


Figure 78 : Intensité du signal relatif (RSI %) 24h après injection de $MnCl_2$ dans le cortex S1 chez les souris WT et KO MAP6.

Au niveau de la coupe B, le RSI est significativement diminué chez les souris KO MAP6 dans le S2 ipsi, la ci ipsi et contro, le TH ant contro et le S1 contro. Concernant la coupe C, le RSI est significativement diminué dans le S2 ipsi, le TH post contro (Po et VPL/VPM) et dans le pc ipsi et contro chez les souris KO MAP6 comparé aux souris WT.

WT : n=10 ; KO MAP6 : n=10. Moyenne \pm SEM. *p<0,05 ; **p<0,005 ; ***p<0,001

AuD : cortex auditif secondaire ; ci : capsule interne ; pc : pédoncule cérébral ; PtA : cortex des associations pariétales ; S1fl : cortex somatosensoriel primaire forelimb ; S1TR : cortex somatosensoriel primaire trunk ; S2 : cortex somatosensoriel secondaire ; TH ant : thalamus antérieur ; TH post : thalamus postérieur (composé des Po et VPL/VPM).

6.3.3.4 Traçage du tract thalamo-cortical par DiI

Les images du traçage par le DiI sont présentées dans la **Figure 79** permettant de mettre en évidence les connections monosynaptique liées au cortex S1.

Nous observons un marquage DiI au niveau des cortex S1fl ipsilatéraux et controlatéraux ainsi que dans le cortex S2 ipsilatéral. Le corps calleux est fortement

marqué ainsi que le tract thalamo-cortical passant le long du ventricule latéral au niveau du striatum puis dans la ci, le TH ant, le TH post et le pc.

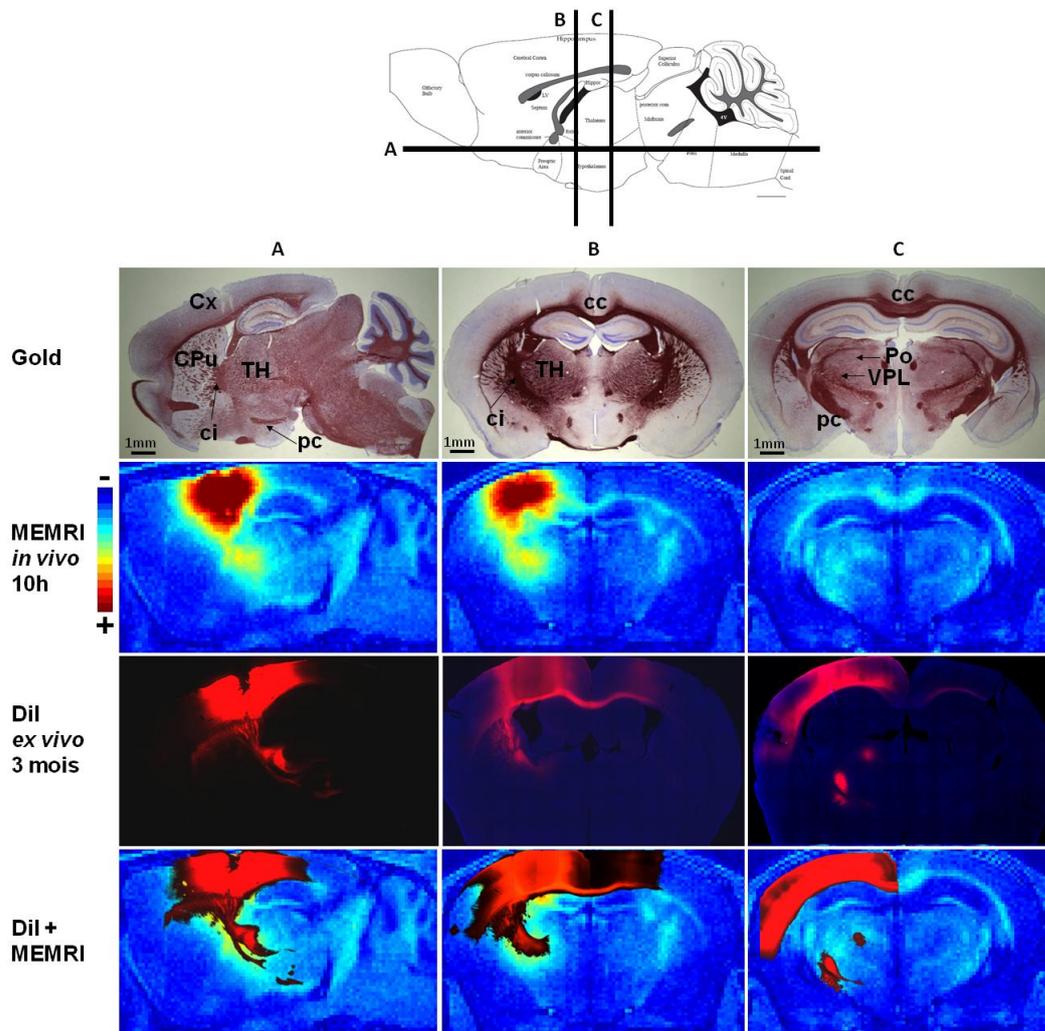


Figure 79 : Traçage du tract thalamo-cortical par le cristal DiI chez la souris WT (2 animaux).

Trois plans anatomiques sont représentés, le plan sagittal et les plans b et c coronaux. L'imagerie MEMRI a été effectuée 10h après injection de $MnCl_2$ dans le Cx S1fl (60 nL, 100 mM). Après l'IRM les cerveaux ont été récupérés, du cristal DiI a été déposé dans le trou d'injection du Mn et a diffusé 3 mois. Le marquage DiI est visible au niveau du cortex, du striatum, de la ci, du cp et du TH ant et post. Les images DiI et MEMRI se superposent bien.

Au niveau du plan c, nous observons les deux noyaux du TH post, le Po et le VPL. Lors de la superposition des images DiI avec celles correspondant aux acquisitions IRM 10h post-injection de Mn ; nous observons un bon recouvrement entre les deux types de traceurs (Mn et DiI). De plus, le Mn semble plus diffus dans les structures que le DiI, notamment pour le TH et la ci.

6.3.3.5 Traçage du tract thalamo-cortical par injection de lentivirus

Les images correspondant au traçage par le lentivirus exprimant la GFP sont présentées dans la **Figure 80**.

La coupe 4 correspond au site d'injection du lentivirus. Au niveau des coupes antérieures à la zone d'injection (1, 2 et 3), nous observons un marquage dans le S1fl, le striatum (CPu), le long des ventricules latéraux dans le cc et dans la ci en ipsilatérale. Un marquage dans le CPu et dans le Cx S1fl controlatéral est observé. Au niveau de la coupe correspondant au site d'injection (4), le marquage est intense au site d'injection S1fl ipsilatéral mais aussi au niveau du S1fl controlatéral et du TH ant ipsilatéral. Un marquage est à noter au niveau de l'hippocampe mais n'est pas retrouvé dans tous les cerveaux observés. Pour les coupes postérieures à la zone d'injection, le marquage est retrouvé le long du Cx S1TR (cortex somatosensoriel primaire trunk) puis PtA, S2 et AuD. La GFP est retrouvée dans le cc, le TH post et le pc.

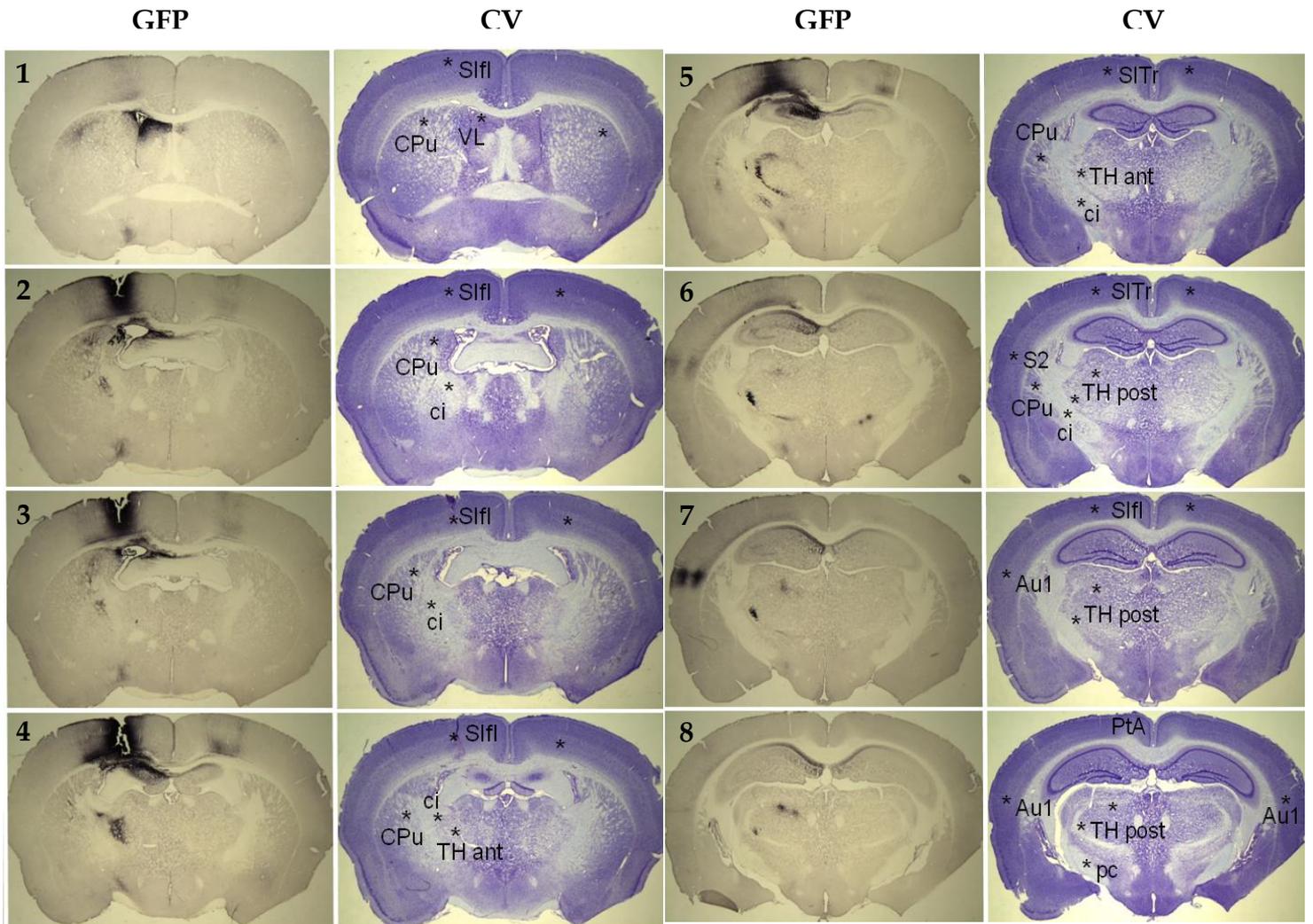
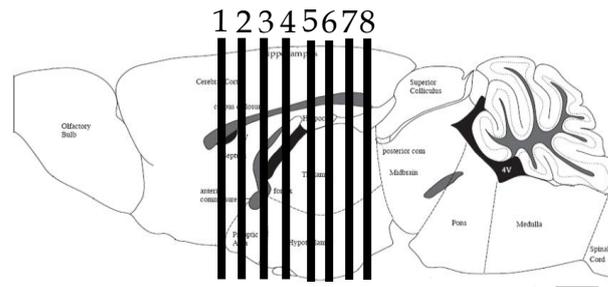


Figure 80 : Traçage du tract thalamo-cortical après injection de lentivirus exprimant la GFP dans le cortex S1fl (visible)

La GFP a été révélée par immuno-marquage utilisant un anticorps secondaire biotinilé et une révélation à la DAB. Le marquage noir sur les coupes de gauche correspond à la GFP. Les images de droite correspondent aux marquages CV des cerveaux non injectés avec le lentivirus. Du côté ipsilatéral, le marquage est visible au niveau des Cx S1, S2 et PtA, du CPU, des TH ant et post. Du côté controlatéral, le marquage est visible au niveau du CPU et du S1. La coupe 4 correspond à la coupe d'injection du lentivirus dans le S1fl.

AuD : cortex auditif secondaire ; ci : capsule interne ; CPU : caudate putamen ; pc : pédoncule cérébral ; PtA : cortex des associations pariétales ; S1fl : cortex somatosensoriel primaire forelimb ; S1TR : cortex somatosensoriel primaire trunk ; S2 : cortex somatosensoriel secondaire ; TH ant : thalamus antérieur ; TH post : thalamus postérieur (composé des Po et VPL/VPM).

6.4. Discussion

Dans ces deux études, nous avons utilisé la technique MEMRI afin d'étudier les connexions du système olfactif et cortico-thalamique des souris déficientes en protéine stabilisatrice du cytosquelette, les souris KO MAP6. Le rôle de la protéine MAP6 dans le transport axonal n'est pas encore bien établi. La technique MEMRI ouvre la possibilité d'effectuer des études longitudinales *in vivo* pouvant donner des informations uniques sur le modèle de souris de maladies mentales. Ces études sont les premières mettant en évidence la disconnectivité fonctionnelle chez les souris KO MAP6.

L'étude du tract olfactif (étude 1) a mis en avant un signal MEMRI plus faible au niveau du bulbe olfactif et un retard du pic du signal au niveau du cortex piriforme chez les souris KO MAP6. Dans l'étude 2, une réduction de la surface des tracts a été montrée par marquage histologique au niveau de la ci, du pc et du TH. L'étude de la connectivité du tract thalamo-cortical par MEMRI montre une diminution de l'intensité relative du signal MEMRI (RSI) principalement au niveau des structures controlatérales.

En résumé, ces deux études montrent que la quantité de Mn transportée est réduite chez les souris KO MAP6 dans les systèmes olfactif et cortico-thalamique.

6.4.1. Limites méthodologiques

Etude 1

Pour certaines souris, un léger signal est trouvé du côté controlatéral à l'injection dans le BO. En effet, comme décrit par Cross et al., le Mn peut passer du côté controlatéral par la fenêtre septale au niveau de la cavité nasale et par la commissure antérieure au niveau du noyau olfactif antérieur (Cross et al., 2008). Ce passage du Mn du côté controlatéral n'a pas été gênant pour l'exploitation des résultats. En effet, ce passage est léger et les valeurs du RSI du côté de l'injection ne sont pas significativement changées entre les différentes souris analysées. Lehallier et al. ont montré qu'une injection de plus de 0,3 μmol de MnCl_2 (2h après injection) altère le comportement olfactif du rat (Lehallier et al., 2012). Dans notre étude, nous avons utilisé 7,5 μmol de Mn. Cependant nous n'étudions ni la réponse aux stimuli odorants ni le comportement des souris après injection du traceur. La quantité utilisée n'a donc pas été gênante pour notre étude.

Etude 2

Suite aux marquages de la myéline par l'or (Gold), nous avons constaté une diminution drastique des aires de certaines structures cérébrales chez les souris KO

MAP6. Nous avons observé une diminution de la taille de la ci, du pc et du TH post alors que la surface du cortex n'est pas perturbée chez les souris KO MAP6. Concernant le TH ant, il est difficilement visible sur les images Gold et nous ne l'avons donc pas quantifié. Toutefois, Powell et al. ont montré une forte diminution de la taille des noyaux thalamiques chez les souris KO MAP6 (Powell et al., 2007).

Etudes 1 et 2

Plus globalement, il a été montré précédemment (Powell et al., 2007; Jany, 2010; Deloulme et al., en préparation) une diminution de la taille du cerveau des souris KO de 15% en moyenne. Cependant, il a été également montré que la diminution de la taille du cerveau n'est pas directement corrélée à la taille des aires cérébrales (Bishop and Wahlsten, 1999; Wahlsten et al., 2006). Nous n'avons donc pas pris en compte le volume cérébral pour le calcul des aires des tracts (TH, Cx, ci et cp) chez les souris WT et KO MAP6. L'injection du Mn a été effectuée dans le Cx S1fl dont l'épaisseur n'est pas diminuée chez les KO. L'injection du traceur n'est donc pas influencée par la taille du cortex. De ce fait, les coordonnées stéréotaxiques utilisées sont identiques entre KO et WT.

Les ROI de notre étude sont tracées sur une coupe donnée. Cependant les structures étudiées (BO, Cx, TH, ci et cp) correspondent à un volume. Il serait donc intéressant de tracer les ROI dans toutes les coupes présentant un signal T_1 pouvant rendre compte de la quantité totale de Mn contenue dans une structure donnée.

6.4.2. Connectivité fonctionnelle des souris KO MAP6

Etude 1

Suite à l'injection de Mn dans la cavité nasale, nous avons observé un signal pondéré T_1 au niveau du BO et des tracts olfactif postérieur (cortex piriforme antérieur et postérieur) permettant de distinguer les différentes couches du BO. Ces données sont en accord avec la littérature (Brenneman et al., 2000; Cross et al., 2008; Lehallier et al., 2012).

Une diminution du RSI chez les souris KO MAP6 est observée dans le BO (CG et CM) et le cortex piriforme (CPA et CPP) 24h après injection. De plus, nous avons montré une diminution du RSI maximum chez les souris KO MAP6 dans la CM (-22%) et dans la CG (-23%) et un ralentissement des variations du RSI dans les tracts olfactifs postérieurs (CPA : -44% et CPP : -23%). Ces résultats suggèrent que les souris KO MAP6 présentent une diminution du transport axonal du Mn dans la voie olfactive. Il a été montré au préalable que les souris KO MAP6 présentent des perturbations synaptiques particulièrement au niveau des glomérules, là où les nerfs olfactifs et les axones des cellules mitrales se rejoignent (Richard et al., 2009; Benardais et al., 2010). De plus, il a été montré une augmentation du renouvellement

neuronal au niveau de l'épithélium olfactif chez les souris KO MAP6 liée à une augmentation de la prolifération neuronale, de l'apoptose et du nombre de cellules immatures (les cellules neurosensorielles de l'épithélium olfactif envoient leurs axones au BO) (Benardais et al., 2010). Ces données suggèrent la présence d'un fort nombre de cellules immatures dans l'épithélium olfactif pouvant limiter le transport du Mn avant même son entrée dans le BO.

Etude 2

Nous avons observé une évolution du signal IRM au cours du temps. Les structures reliées au tract thalamo-cortical sont clairement visibles 10h après l'injection de Mn tels que : le tract thalamo-cortical, le tract cortico-cortical (régions corticales S1fl/S2/PtA/AuD), le tract cortico-striatal ainsi que le tract cortico-pontique (ci/pc). Le traçage de ces voies avait été précédemment décrit par Leergaard et al. après une injection de Mn dans le cortex S1 (10nL, 800mM) (Leergaard et al., 2003).

Un jour après injection de Mn dans le Cx S1fl, nous observons une diminution significative du transport du Mn dans les tracts cortico-pontique (ci et pc), cortico-cortical et cortico-thalamique controlatéral.

Le Mn étant un ion trans-synaptique, la technique MEMRI permet de visualiser l'activité fonctionnelle neuronale poly-synaptique. A contrario, les techniques classiques histologiques telles que le DiI et l'infection des neurones par un virus exprimant la GFP permettent de visualiser des tracts mono-synaptiques. De ce fait, les structures controlatérales (sauf le Cx S1fl) ne sont pas visualisables avec le DiI ou le lentivirus : l'accès à ces structures controlatérales à partir du cortex S1fl ipsi est poly-synaptique. Toutefois, les images DiI ipsilatérales corréleront bien avec les images MEMRI : les mêmes structures sont retrouvées dans les deux techniques (Cx, TH, ci et pc). De même, le traçage de la voie corticale avec le lentivirus correspond aux images MEMRI (**Figure 81**, **Figure 79**).

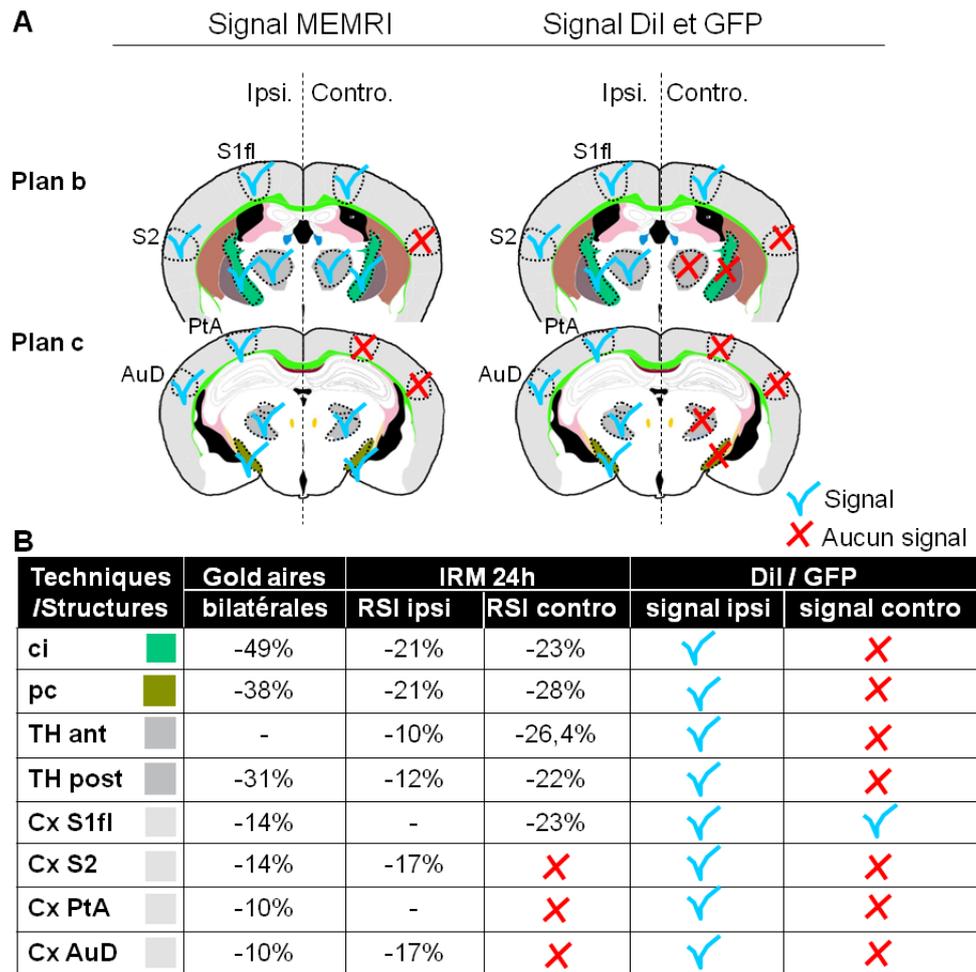


Figure 81 : Résumé de l'étude de la voie corticale par MEMRI, DiI et lentivirus.

A. Le signal observé en MEMRI et DiI/lentivirus est représenté sur deux coupes coronales postérieures au site d'injection.

B. Tableau récapitulatif des résultats obtenus avec les différentes techniques : aires des structures avec la coloration au Gold (moyenne ipsi et contro) ; RSI avec la MEMRI (24h) ; présence de marquage histologique après marquage au DiI (3 mois) ou lentivirus (1 semaine). Les valeurs correspondent à la différence KO MAP6 versus WT exprimée en %.

*p<0,05 ; **p<0,005 ; ***p<0,001.

✓ = présence de signal (MEMRI, DiI ou GFP)

✗ = absence de signal (MEMRI, DiI ou GFP)

Etudes 1 et 2

Deux remarques générales concernant le signal MEMRI sont indiquées :

(i) Dans l'étude du tract olfactif, le RSI augmente puis diminue lors du passage du Mn. Les pics d'intensité du signal se produisent 24h après l'injection de Mn, en accord avec les données de Cross et al (Cross et al., 2004). De ce fait, nous avons supposé que l'évolution du RSI jusqu'à 24h après injection de Mn était suffisante pour l'étude du tract thalamo-cortical. Les variations du RSI au cours du temps ne présentent pas de différence entre les souris WT et KO jusqu'à 24h post-injection.

Nous pouvons supposer qu'une différence d'intensité du signal MEMRI n'est significativement détectable qu'au pic d'intensité de ce dernier. Celle-ci dépendra alors de la vitesse de transport du Mn ainsi que de la quantité de Mn accumulée dans les structures 24h après injection.

(ii) Nous avons observé que le RSI est plus fort au niveau de la zone d'injection (BO ou cortex S1fl) que dans les tracts étudiés (Cx piriforme ou TH) probablement du fait de la distance au site d'injection. Plus la région est éloignée du site d'injection, plus le signal est faible. Après injection, le Mn est transporté par les neurones (Pautler, 2004) mais pénètre également dans les astrocytes (Daoust et al., 2012), les cellules endothéliales et épithéliales et diffuse dans l'espace extracellulaire (Aoki et al., 2004b; Bornhorst et al., 2012). Cette dilution du Mn peut expliquer le signal plus faible des structures éloignées du site d'injection. De plus, la diminution du transport axonal est observée principalement dans les structures éloignées du site d'injection et qui nécessitent le passage des synapses. En effet, les diminutions du transport axonal de Mn sont accentuées dans les structures poly-synaptiques controlatérales telles que le TH, la ci et le pc (étude 2). Mais aussi dans les structures poly-synaptiques ipsilatérales telles que le Cx S2, la ci, le pc (étude 2), les couches du BO et le cortex piriforme (étude 1).

(iii) La diminution du transport axonal n'est pas corrélée avec les diminutions des aires des structures ($r^2=0,08$ du côté ipsilatéral). Nous avons observé une diminution bilatérale des aires des tracts alors que la diminution du transport axonal est asymétrique. Au niveau des connections mono-synaptiques, aucune perturbation fonctionnelle n'est observée pour les noyaux thalamiques alors qu'une diminution de leurs tailles a été montrée (Powell et al., 2007). De plus, une diminution du transport du Mn a été observée dans le Cx S2 et AuD alors que l'épaisseur du cortex n'est pas perturbée chez les souris KO. Ces résultats montrent que les connectivités structurelles et fonctionnelles ne sont pas toujours corrélées, en accord avec la littérature (voir pour revue, Damoiseaux and Greicius, 2009). Pour le BO, nous n'avons pas déterminé la taille des structures.

La capacité du Mn à entrer dans les cellules via les canaux calciques et à être transporté le long des microtubules lui confèrent une possibilité unique de rendre compte, *in vivo*, de l'état de fonctionnalité du transport axonal (Smith et al., 2007a). Le Mn est transporté dans des vésicules et co-relargué avec les NT tels que le glutamate (Lin and Koretsky, 1997). Andrieux et al. ont montré une réduction du pool de vésicules synaptiques ainsi qu'un déficit de la plasticité à court et long terme associé à une diminution de la libération du glutamate au niveau hippocampique (Andrieux et al., 2002). Ils ont aussi montré une diminution de la densité vésiculaire

au niveau des synapses glutamatergiques hippocampiques (Andrieux et al., 2006). Le déficit synaptique des souris KO MAP6, associé à la diminution du nombre de vésicules, peut altérer la libération du Mn dans la fente synaptique et par conséquent limiter son transport. D'autres causes au ralentissement du transport axonal peuvent cependant être envisagées, comme une diminution du nombre de synapses.

Suite à nos résultats, nous supposons que le déficit de transport axonal observé dans le BO entraîne une perturbation de l'olfaction dans ce modèle animal. Powell et al. ont montré un déficit dans des tests d'olfaction (Powell et al., 2007). Après une série de tests comportementaux, ils ont cependant conclu que ces problèmes étaient dus à une baisse de motivation plutôt qu'à un déficit fonctionnel. Il en est de même pour l'étude du tract thalamo-cortical. Nos résultats supposent que la réponse sensorielle liée au cortex S1 doit être plus faible chez les souris KO MAP6. Il serait alors intéressant d'effectuer une imagerie fonctionnelle utilisant le Mn comme marqueur de l'activité calcique, autrement appelée AIM (activity induced manganese-dependent) (Van der Linden et al., 2002), en réponse à des odeurs (Pautler and Koretsky, 2002) ou après stimulus des vibrisses (Yu, Glen, et al., 2012) chez les souris KO MAP6.

6.4.3. Perspectives

Les aires des tracts olfactifs n'ont pas été mesurées. Il serait donc intéressant de déterminer la surface des couches glomérulaires et mitrales du BO ainsi que la surface du cortex piriforme afin de les comparer aux RSI des souris KO MAP6 comme nous l'avons fait dans l'étude 2.

Il a été montré un effet positif des neuroleptiques et de l'épothilone D sur le comportement des souris KO MAP6 (Fournet et al., 2012) ainsi que sur l'amélioration de la LTP/LTD et l'augmentation de la densité vésiculaire synaptique (Andrieux et al., 2006). L'épothilone D est une molécule interagissant directement avec la tubuline afin de stabiliser les microtubules (Kolman, 2004). Il serait alors intéressant de regarder l'effet d'un traitement à l'épothilone D sur la connectivité fonctionnelle des voies corticales ou olfactives. En d'autres termes, est-ce que la connectivité fonctionnelle des souris KO MAP6 peut être améliorée par un traitement (épothilone D ou neuroleptique)? Des études préliminaires ont été réalisées tout récemment en ce sens.

Le déplacement mitochondrial étant dépendant du cytosquelette, il serait intéressant d'étudier la vitesse de déplacement des mitochondries de neurones KO MAP6 en présence de Mn (les neurones hippocampiques utilisés dans le chapitre 4 provenaient de souris WT). De même, il serait intéressant de quantifier le nombre de

prolongements axonaux et la taille de ces prolongements de neurones KO MAP6 en présence de Mn. Il serait intéressant aussi de regarder la distribution intracellulaire du Mn dans des neurones WT vs KO MAP6 dans la même ligne que les expériences réalisées au chapitre 4.

Ces deux études montrent la capacité de la MEMRI à mettre en évidence un problème de connectivité fonctionnelle *in vivo* chez un modèle murin de maladies mentales telles que la dépression et la schizophrénie. Cette étude est la première à montrer une diminution du transport neuronal dans les voies olfactive et corticale chez les souris KO MAP6, permettant une meilleure compréhension de l'état de fonctionnalité cérébrale de ces souris.

Conclusion générale et perspectives

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis d'encadrer les limites de la technique MEMRI (**Figure 82**). Nous avons observé de fortes concentrations de Mn dans les lignées cellulaires N2A et PC12 avec ou sans ajout de Mn dans le milieu de culture. Des concentrations plus faibles, mais toujours élevées ont été trouvées dans les cultures primaires de NH. Ces concentrations ne sont pas retrouvées dans le tissu après injection de Mn, montrant les capacités de détoxification du Mn par l'organisme et notamment par les astrocytes. Suite à l'injection IC de manganèse, une modification du métabolisme au site d'injection a été mise en évidence. Celle-ci est largement atténuée dans les régions périphériques au site d'injection.

Les expériences classiques de MEMRI utilisent des doses faibles de Mn. En effet les doses IC sont de quelques nL (50-100mM). Nos résultats suggèrent que, à des doses modérées, la toxicité du Mn lors des expériences MEMRI est limitée. De plus, nous avons montré que les capacités de relaxation du Mn permettent de détecter cet ion à de faibles concentrations en IRM (90 μ M ; chapitres 3, 5, des concentrations inférieures peuvent probablement être détectées).

Les perspectives de ce travail sont multiples. Il serait intéressant de déterminer les concentrations minimales de Mn injectables permettant d'obtenir un signal IRM nécessaire pour les études MEMRI. De plus, il serait important d'étudier l'effet du Mn sur le réseau microtubulaire. Si le Mn joue un rôle sur la polymérisation/dépolymérisation des microtubules, cela peut grandement impacter les résultats obtenus lors d'études de connectivité fonctionnelle chez des animaux modèles de maladies neurologiques. D'une manière plus générale, il serait intéressant d'évaluer l'impact du Mn sur des co-cultures (cellules gliales et neurones) pour mieux comprendre le comportement du Mn dans le cerveau.

La MEMRI est une technique prometteuse pour la recherche pré-clinique. Elle ouvre les portes pour la découverte de nouveaux agents de contraste ayant la capacité de marquer l'activité et le transport neuronale. La découverte d'un tel agent, utilisable chez les l'homme, serait une grande avancé dans le diagnostic clinique. Des particules ont déjà été synthétisées promettant de belles avancées dans le domaine de la recherche.

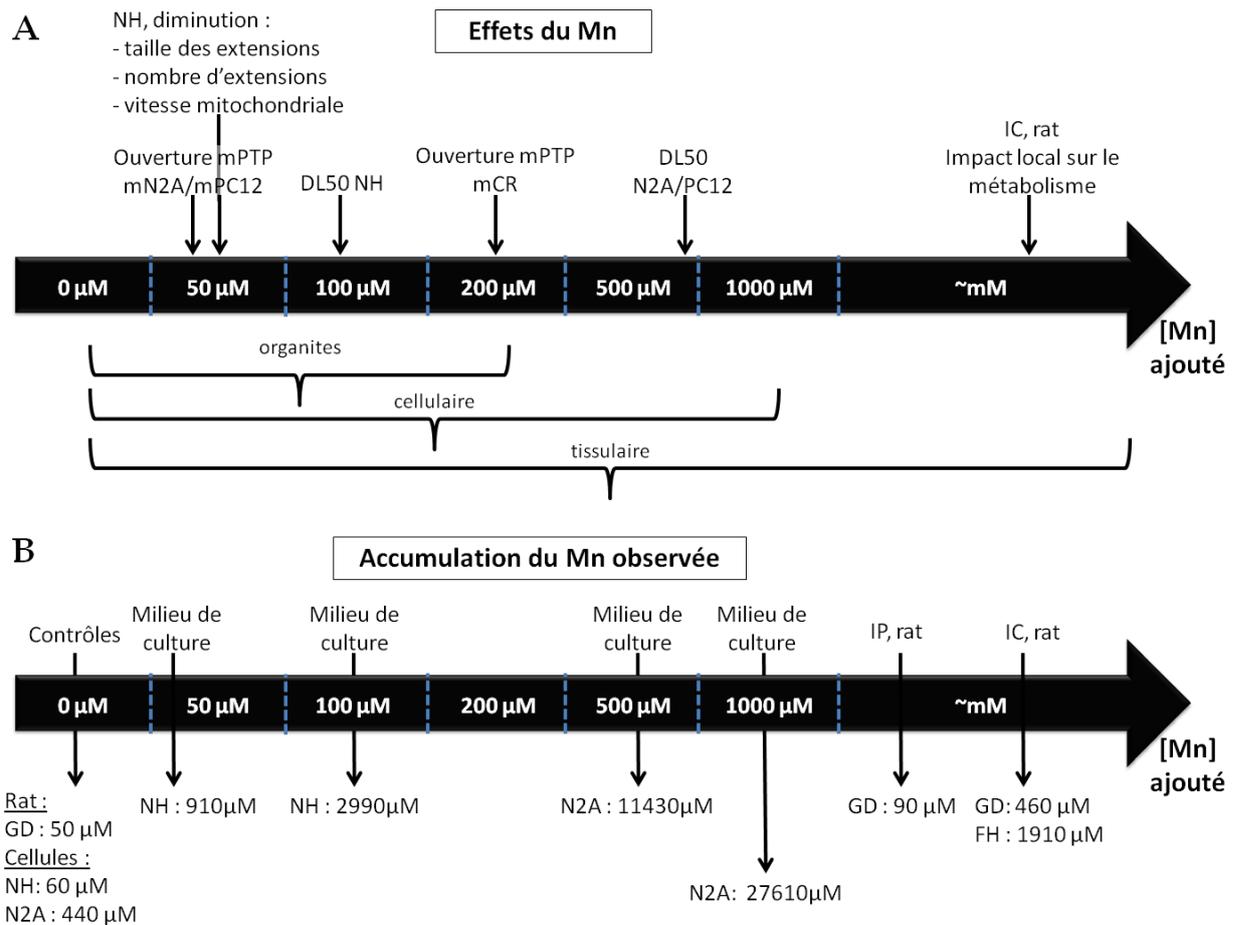


Figure 82 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus

A. Effet du Mn en fonction de sa concentration. Par exemple, la DL50 des cellules N2A et PC12 est obtenue en présence de $\sim 800 \mu\text{M}$. L'échelle sub-cellulaire (0 à $200 \mu\text{M}$), cellulaire (0 à $1000 \mu\text{M}$) et tissulaire (0 à 100mM) est ajoutée sous la flèche de concentrations du Mn.

B. Accumulation du Mn observée en fonction de la dose de Mn ajoutée dans le milieu de culture ou administrée au rat. Par exemple, un ajout de $100 \mu\text{M}$ de Mn dans le milieu de culture des NH induit une accumulation de $2990 \mu\text{M}$ de Mn dans ces cellules.

GD : gyrus denté ; IC : intra-cérébrale ; IP : intra-péritonéale ; mCR : mitochondrie extraites de cerveau de rat ; mN2A : mitochondries des cellules N2A ; mPC12 mitochondries des cellules PC12 ; NH : neurones hippocampiques.

Références

- Abreo, K., Abreo, F., Sella, M.L., Jain, S., 1999. Aluminum enhances iron uptake and expression of neurofibrillary tangle protein in neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 72, 2059–2064.
- Acosta-Saavedra, L.C., Moreno, M.E., Rodríguez-Kessler, T., Luna, A., Gomez, R., Arias-Salvatierra, D., Calderon-Aranda, E.S., 2011. Environmental exposure to lead and mercury in Mexican children: a real health problem. *Toxicology Mechanisms and Methods* 21, 656–666.
- Albrecht, J., Sidoryk-Węgrzynowicz, M., Zielińska, M., Aschner, M., 2010. Roles of Glutamine in Neurotransmission. *Neuron Glia Biology* 6, 263–276.
- Allegrini, P.R., Wiessner, C., 2003. Three-dimensional MRI of cerebral projections in rat brain in vivo after intracortical injection of MnCl₂. *NMR in Biomedicine* 16, 252–256.
- Andrieux, A., Salin, P., Schweitzer, A., Bégou, M., Pachoud, B., Brun, P., Gory-Fauré, S., Kujala, P., Suaud-Chagny, M.-F., Höfle, G., Job, D., 2006. Microtubule Stabilizer Ameliorates Synaptic Function and Behavior in a Mouse Model for Schizophrenia. *Biological Psychiatry* 60, 1224–1230.
- Andrieux, A., Salin, P.A., Vernet, M., Kujala, P., Baratier, J., Gory-Fauré, S., Bosc, C., Pointu, H., Proietto, D., Schweitzer, A., Denarier, E., Klumperman, J., Job, D., 2002. The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev* 16, 2350–2364.
- Aoki, I., Wu, Y.-J.L., Silva, A.C., Lynch, R.M., Koretsky, A.P., 2004a. In vivo detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese-enhanced MRI. *Neuroimage* 22, 1046–1059.
- Aronoff, R., Matyas, F., Mateo, C., Ciron, C., Schneider, B., Petersen, C.C.H., 2010. Long-range connectivity of mouse primary somatosensory barrel cortex. *European Journal of Neuroscience* 31, 2221–2233.
- Aschner, J.L., Aschner, M., 2005. Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Mol. Aspects Med* 26, 353–362.
- Aschner, M., 2000. Manganese: brain transport and emerging research needs. *Environ Health Perspect* 108, 429–432.
- Aschner, M., Dorman, D.C., 2006. Manganese: pharmacokinetics and molecular mechanisms of brain uptake. *Toxicol Rev* 25, 147–154.
- Aschner, M., Gannon, M., Kimelberg, H.K., 1992. Manganese uptake and efflux in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* 58, 730–735.
- Aschner, M., Guilarte, T.R., Schneider, J.S., Zheng, W., 2007. Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 221, 131–147.
- Aschner, M., Lukey, B., Tremblay, A., 2006a. The Manganese Health Research Program (MHRP): status report and future research needs and directions. *Neurotoxicology* 27, 733–736.
- ATSDR, 2000. Toxicological profile for manganese.

- Ávila, D.S., Colle, D., Gubert, P., Palma, A.S., Puntel, G., Manarin, F., NoreMBERG, S., Nascimento, P.C., Aschner, M., Rocha, J.B.T., Soares, F.A.A., 2010. A Possible Neuroprotective Action of a Vinyllic Telluride against Mn-Induced Neurotoxicity. *Toxicol Sci* 115, 194–201.
- Baas, P.W., Heidemann, S.R., 1986. Microtubule reassembly from nucleating fragments during the regrowth of amputated neurites. *J Cell Biol* 103, 917–927.
- Bagga, P., Patel, A.B., 2012. Regional cerebral metabolism in mouse under chronic manganese exposure: Implications for Manganism. *Neurochemistry International* 60, 177–185.
- Ballini, C., Corte, L.D., Pazzagli, M., Colivicchi, M.A., Pepeu, G., Tipton, K.F., Giovannini, M.G., 2008. Extracellular levels of brain aspartate, glutamate and GABA during an inhibitory avoidance response in the rat. *Journal of Neurochemistry* 106, 1035–1043.
- Barbeau, A., 1984. Manganese and extrapyramidal disorders (a critical review and tribute to Dr. George C. Cotzias). *Neurotoxicology* 5, 13–35.
- Barbier, E.L., Liu, L., Grillon, E., Payen, J.-F., Lebas, J.-F., Segebarth, C., Rémy, C., 2005. Focal brain ischemia in rat: acute changes in brain tissue T1 reflect acute increase in brain tissue water content. *NMR in Biomedicine* 18, 499–506.
- Barral, J., 2006. Manganese-enhanced magnetic resonance brain imaging (MEMRI).
- Batandier, C., Leverve, X., Fontaine, E., 2004. Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Induces Reactive Oxygen Species Production at the Level of the Respiratory Chain Complex I. *J. Biol. Chem.* 279, 17197–17204.
- Bégou, M., Volle, J., Bertrand, J.-B., Brun, P., Job, D., Schweitzer, A., Saoud, M., D'Amato, T., Andrieux, A., Suaud-Chagny, M.-F., 2008. The stop null mice model for schizophrenia displays cognitive and social deficits partly alleviated by neuroleptics. *Neuroscience* 157, 29–39.
- Benardais, K., Kasem, B., Couegnas, A., Samama, B., Fernandez, S., Schaeffer, C., Antal, M.-C., Job, D., Schweitzer, A., Andrieux, A., Giersch, A., Nehlig, A., Boehm, N., 2010. Loss of STOP Protein Impairs Peripheral Olfactory Neurogenesis. *PLoS One* 5.
- Bernardi, P., Vassanelli, S., Veronese, P., Colonna, R., Szabó, I., Zoratti, M., 1992. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J. Biol. Chem.* 267, 2934–2939.
- Bertrand, A., Khan, U., Hoang, D.M., Novikov, D.S., Krishnamurthy, P., Rajamohamed Sait, H.B., Little, B.W., Sigurdsson, E.M., Wadghiri, Y.Z., *in press*. Non-invasive, in vivo monitoring of neuronal transport impairment in a mouse model of tauopathy using MEMRI. *NeuroImage*.
- Bishop, K.M., Wahlsten, D., 1999. Sex and species differences in mouse and rat forebrain commissures depend on the method of adjusting for brain size. *Brain Research* 815, 358–366.
- Bock, N.A., Paiva, F.F., Nascimento, G.C., Newman, J.D., Silva, A.C., 2008a. Cerebrospinal fluid to brain transport of manganese in a non-human primate revealed by MRI. *Brain Res* 1198, 160–170.
- Bock, N.A., Paiva, F.F., Nascimento, G.C., Newman, J.D., Silva, A.C., 2008b. Cerebrospinal fluid to brain transport of manganese in a non-human primate revealed by MRI. *Brain Research* 1198, 160–170.

- Bock, N.A., Silva, A.C., 2007. Manganese: a unique neuroimaging contrast agent. *Future Neurology* 2, 297-305.
- Bohic, S., Cotte, M., Salomé, M., Fayard, B., Kuehbacher, M., Cloetens, P., Martinez-Criado, G., Tucoulou, R., Susini, J., 2012. Biomedical applications of the ESRF synchrotron-based microspectroscopy platform. *Journal of Structural Biology* 177, 248-258.
- Bohic, S., Ghersi-Egea, J.-F., Gibon, J., Paoletti, P., Arnaud, J., Hunot, S., Boom, A., Bouron, A., 2011. Rôles biologiques des éléments traces dans le cerveau - exemples du Zn et du Fe. *Revue Neurologique* 167, 269-279.
- Bohic, S., Hare, D., Daoust, A., Cloetens, P., Barbier, E.L., 2012. Spatially resolved imaging methods to probe metals 2 in the brain: from subcellular to organ level, in: *Metal Ions in Neurological Systems*. Springer-Verlag.
- Bon, D., 2007. Evaluation de deux nouveaux outils pour l'étude d'échantillons biologiques par spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire: -La RMN HR-MAS (High-Resolution Magic Angle Spinning): une technique d'analyse d'échantillons bruts; -La Métabonomique: une méthode d'analyse statistique des spectres pour la recherche de signatures métaboliques.
- Bonilla, E., Salazar, E., Villasmil, J.J., Villalobos, R., 1982. The regional distribution of manganese in the normal human brain. *Neurochem. Res* 7, 221-227.
- Bonny, J.-M., Mailly, P., Renou, J.-P., Orsal, D., Benmoussa, A., Stettler, O., 2008. Analysis of laminar activity in normal and injured rat spinal cord by manganese enhanced MRI. *Neuroimage* 40, 1542-1551.
- Bornhorst, J., Wehe, C.A., Hüwel, S., Karst, U., Galla, H.-J., Schwerdtle, T., 2012. Impact of Manganese on and Transfer across Blood-Brain and Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier in Vitro. *J. Biol. Chem.* 287, 17140-17151.
- Bosc, C., Cronk, J.D., Pirolet, F., Watterson, D.M., Haiech, J., Job, D., Margolis, R.L., 1996. Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2125-2130.
- Bouvrais-Veret, C., Weiss, S., Hanoun, N., Andrieux, A., Schweitzer, A., Job, D., Hamon, M., Giros, B., Martres, M.-P., 2008. Microtubule-associated STOP protein deletion triggers restricted changes in dopaminergic neurotransmission. *Journal of Neurochemistry* 104, 745-756.
- Bowler, R.M., Nakagawa, S., Drezgic, M., Roels, H.A., Park, R.M., Diamond, E., Mergler, D., Bouchard, M., Bowler, R.P., Koller, W., 2007. Sequelae of fume exposure in confined space welding: a neurological and neuropsychological case series. *Neurotoxicology* 28, 298-311.
- Brenneman, K.A., Wong, B.A., Buccellato, M.A., Costa, E.R., Gross, E.A., Dorman, D.C., 2000. Direct olfactory transport of inhaled manganese ((54)MnCl(2)) to the rat brain: toxicokinetic investigations in a unilateral nasal occlusion model. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 169, 238-248.
- Brinton, R.D., 2009. Estrogen-induced plasticity from cells to circuits: predictions for cognitive function. *Trends Pharmacol Sci* 30, 212-222.
- Bröer, S., Bröer, A., Hansen, J.T., Bubb, W.A., Balcar, V.J., Nasrallah, F.A., Garner, B., Rae, C., 2007. Alanine metabolism, transport, and cycling in the brain. *Journal of Neurochemistry* 102, 1758-1770.

- Brun, P., Bégou, M., Andrieux, A., Mouly-Badina, L., Clerget, M., Schweitzer, A., Scarna, H., Renaud, B., Job, D., Suaud-Chagny, M.-F., 2005. Dopaminergic transmission in STOP null mice. *Journal of Neurochemistry* 94, 63–73.
- Canals, S., Beyerlein, M., Keller, A.L., Murayama, Y., Logothetis, N.K., 2008a. Magnetic resonance imaging of cortical connectivity in vivo. *NeuroImage* 40, 458–472.
- Carmona, A., Devès, G., Ortega, R., 2008. Quantitative micro-analysis of metal ions in subcellular compartments of cultured dopaminergic cells by combination of three ion beam techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390, 1585–1594.
- Carmona, A., Devès, G., Roudeau, S., Cloetens, P., Bohic, S., Ortega, R., 2009. Manganese Accumulates within Golgi Apparatus in Dopaminergic Cells as Revealed by Synchrotron X-ray Fluorescence Nanoimaging. *ACS Chem Neurosci* 1, 194–203.
- Cavassila, S., Fenet, B., van den Boogaart, A., Rémy, C., Briguet, A., Graveron-Demilly, D., 1997. ER-Filter: a preprocessing technique for frequency-selective time-domain analysis. *Magn Reson Anal* 3, 87–92.
- Chang, E.C., Kosman, D.J., 1989. Intracellular Mn (II)-Associated Superoxide Scavenging Activity Protects Cu,Zn Superoxide Dismutase-Deficient *Saccharomyces Cerevisiae* Against Dioxygen Stress. *J. Biol. Chem.* 264, 12172–12178.
- Chang, Y., Woo, S.-T., Lee, J.-J., Song, H.-J., Lee, H.J., Yoo, D.-S., Kim, S.H., Lee, H., Kwon, Y.J., Ahn, H.J., Ahn, J.-H., Park, S.-J., Weon, Y.C., Chung, I.-S., Jeong, K.S., Kim, Y., 2009. Neurochemical changes in welders revealed by proton magnetic resonance spectroscopy. *NeuroToxicology* 30, 950–957.
- Chapa, F., Cruz, F., García-Martín, M.L., García-Espinosa, M.A., Cerdán, S., 2000. Metabolism of (1-¹³C) glucose and (2-¹³C, 2-²H₃) acetate in the neuronal and glial compartments of the adult rat brain as detected by {¹³C, ²H} NMR spectroscopy. *Neurochemistry International* 37, 217–228.
- Charlet, L., Chapron, Y., Faller, P., Kirsch, R., Stone, A.T., Baveye, P.C., 2012. Neurodegenerative diseases and exposure to the environmental 5 metals Mn, Pb, and Hg.
- Chemicals, I.-O.P. for the S.M. of, 2002. Principles and Methods for the Assessment of Risk from Essential Trace Elements. World Health Organization.
- Cheng, B., Mattson, M.P., 1995. PDGFs protect hippocampal neurons against energy deprivation and oxidative injury: evidence for induction of antioxidant pathways. *J. Neurosci.* 15, 7095–7104.
- Choi, J.-K., Carreras, I., Dedeoglu, A., Jenkins, B.G., 2010. Detection of increased scyllo-inositol in brain with magnetic resonance spectroscopy after dietary supplementation in Alzheimer's disease mouse models. *Neuropharmacology* 59, 353–357.
- Chtourou, Y., Trabelsi, K., Fetoui, H., Mkannez, G., Kallel, H., Zeghal, N., 2011. Manganese Induces Oxidative Stress, Redox State Unbalance and Disrupts Membrane Bound ATPases on Murine Neuroblastoma Cells In Vitro: Protective Role of Silymarin. *Neurochem Res* 36, 1546–1557.

- Chua, A.C., Morgan, E.H., 1996. Effects of iron deficiency and iron overload on manganese uptake and deposition in the brain and other organs of the rat. *Biol Trace Elem Res* 55, 39–54.
- Chua, C.E.L., Tang, B.L., 2008. Syntaxin 16 is enriched in neuronal dendrites and may have a role in neurite outgrowth. *Mol. Membr. Biol.* 25, 35–45.
- Chuang, K.-H., Lee, J.H., Silva, A.C., Belluscio, L., Koretsky, A.P., 2009. Manganese enhanced MRI reveals functional circuitry in response to odorant stimuli. *Neuroimage* 44, 363–372.
- Conde, C., Cáceres, A., 2009. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 319–332.
- Connick, R.E., Poulson, R.E., 1959. Effect of Paramagnetic Ions on the Nuclear Magnetic Resonance of O17 in Water and the Rate of Elimination of Water Molecules from the First Coordination Sphere of Cations. *J. Chem. Phys.* 30, 759.
- Couper, J., 1837. Sur les effets du peroxyde de manganèse, in: *Journal De Chimie Médicale, De Pharmacie Et De Toxicologie*. pp. 223–225.
- Critchfield, J.W., Keen, C.L., 1992. Manganese + 2 exhibits dynamic binding to multiple ligands in human plasma. *Metab. Clin. Exp* 41, 1087–1092.
- Crompton, M., 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341, 233–249.
- Cross, D.J., Flexman, J.A., Anzai, Y., Maravilla, K.R., Minoshima, S., 2008. Age-related decrease in axonal transport measured by MR imaging in vivo. *NeuroImage* 39, 915–926.
- Cross, D.J., Flexman, J.A., Anzai, Y., Morrow, T.J., Maravilla, K.R., Minoshima, S., 2006. In vivo imaging of functional disruption, recovery and alteration in rat olfactory circuitry after lesion. *NeuroImage* 32, 1265–1272.
- Cross, D.J., Minoshima, S., Anzai, Y., Flexman, J.A., Keogh, B.P., Kim, Y., Maravilla, K.R., 2004. Statistical mapping of functional olfactory connections of the rat brain in vivo. *NeuroImage* 23, 1326–1335.
- Crossgrove, J.S., Allen, D.D., Bukaveckas, B.L., Rhineheimer, S.S., Yokel, R.A., 2003. Manganese distribution across the blood-brain barrier. I. Evidence for carrier-mediated influx of manganese citrate as well as manganese and manganese transferrin. *Neurotoxicology* 24, 3–13.
- Cruikshank, S.J., Urabe, H., Nurmikko, A.V., Connors, B.W., 2010. Pathway-specific feedforward circuits between thalamus and neocortex revealed by selective optical stimulation of axons. *Neuron* 65, 230–245.
- Cruz, F., Cerdán, S., 1999. Quantitative ¹³C NMR studies of metabolic compartmentation in the adult mammalian brain. *NMR in Biomedicine* 12, 451–462.
- Culotta, V.C., Yang, M., Hall, M.D., 2005. Manganese transport and trafficking: lessons learned from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 4, 1159–1165.
- Damoiseaux, J., Greicius, M., 2009. Greater than the sum of its parts: a review of studies combining structural connectivity and resting-state functional connectivity. *Brain Structure and Function* 213, 525–533.

- Daoust, A., Barbier, E.L., Bohic, S., *in press*. Manganese Enhanced MRI in Rat Hippocampus: a Correlative Study with Synchrotron X-Ray Microprobe. NeuroImage.
- Davies, P., Brown, D.R., 2009. Manganese Enhances Prion Protein Survival in Model Soils and Increases Prion Infectivity to Cells. PLoS ONE 4, e7518.
- Davis, C.D., Greger, J.L., 1992. Longitudinal changes of manganese-dependent superoxide dismutase and other indexes of manganese and iron status in women. Am. J. Clin. Nutr. 55, 747-752.
- De Jonge, M.D., Holzner, C., Baines, S.B., Twining, B.S., Ignatyev, K., Diaz, J., Howard, D.L., Legnini, D., Miceli, A., McNulty, I., Jacobsen, C.J., Vogt, S., 2010. Quantitative 3D elemental microtomography of *Cyclotella meneghiniana* at 400-nm resolution. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 15676-15680.
- Delotterie, D., Ruiz, G., Brocard, J., Schweitzer, A., Roucard, C., Roche, Y., Suaud-Chagny, M.-F., Bressand, K., Andrieux, A., 2010. Chronic administration of atypical antipsychotics improves behavioral and synaptic defects of STOP null mice. Psychopharmacology (Berl) 208, 131-141.
- Denarier, E., Fourest-Lieuvin, A., Bosc, C., Pirollet, F., Chapel, A., Margolis, R.L., Job, D., 1998. Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 6055-6060.
- Desai Shanti, N., Shashikumar, K.C., Desai, P.V., 2004. Influence of Proline on Rat Brain Activities of Alanine Aminotransferase, Aspartate Aminotransferase and Acid Phosphatase. Neurochemical Research 29, 2197-2206.
- Desole, M.S., Sciola, L., Delogu, M.R., Sircana, S., Migheli, R., 1996. Manganese and 1-methyl-4-(2'-ethylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine induce apoptosis in PC12 cells. Neurosci. Lett 209, 193-196.
- Devun, F., 2008. Régulation du pore de transition de perméabilité mitochondrial et toxicité induite par les analogues de l'ubiquinone dans les hépatocytes cancéreux.
- Dietz, M.C., Ihrig, A., Wrazidlo, W., Bader, M., Jansen, O., Triebig, G., 2001. Results of Magnetic Resonance Imaging in Long-Term Manganese Dioxide-Exposed Workers. Environmental Research 85, 37-40.
- Douglas, R.J., Martin, K.A.C., 2004. Neuronal Circuits of the Neocortex. Annual Review of Neuroscience 27, 419-451.
- Drapeau, P., Nachshen, D.A., 1984. Manganese fluxes and manganese-dependent neurotransmitter release in presynaptic nerve endings isolated from rat brain. J. Physiol. (Lond.) 348, 493-510.
- Du, C., MacGowan, G.A., Farkas, D.L., Koretsky, A.P., 2001. Calibration of the calcium dissociation constant of Rhod(2) in the perfused mouse heart using manganese quenching. Cell Calcium 29, 217-227.
- Eastwood, S.L., Lyon, L., George, L., Andrieux, A., Job, D., Harrison, P.J., 2007. Altered expression of synaptic protein mRNAs in STOP (MAP6) mutant mice. J. Psychopharmacol. (Oxford) 21, 635-644.
- Eggert, D.A., Hayden, R.A., 1969. The periodate -tetrabase spot test modified for cellular localization of manganese in plant tissue 44, 161-162.

-
- Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A.D., Vernet, M., Schweitzer, A., Saoudi, Y., Pointu, H., Bosc, C., Salin, P.A., Job, D., Wehland, J., 2005. A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *PNAS* 102, 7853–7858.
- Erikson, K., Dorman, D., Fitsanakis, V., Lash, L., Aschner, M., 2006. Alterations of oxidative stress biomarkers due to *in utero* and neonatal exposures of airborne manganese. *Biological Trace Element Research* 111, 199–215.
- Erikson, K.M., Aschner, M., 2003. Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction. *Neurochemistry International* 43, 475–480.
- Erikson, K.M., Aschner, M., 2006. Increased manganese uptake by primary astrocyte cultures with altered iron status is mediated primarily by divalent metal transporter. *Neurotoxicology* 27, 125–130.
- Eschenko, O., Canals, S., Simanova, I., Logothetis, N.K., 2010. Behavioral, electrophysiological and histopathological consequences of systemic manganese administration in MEMRI. *Magnetic Resonance Imaging* 28, 1165–1174.
- Fitsanakis, V.A., Aschner, M., 2005. The importance of glutamate, glycine, and γ -aminobutyric acid transport and regulation in manganese, mercury and lead neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 204, 343–354.
- Fitsanakis, V.A., Au, C., Erikson, K.M., Aschner, M., 2006. The effects of manganese on glutamate, dopamine and γ -aminobutyric acid regulation. *Neurochemistry International* 48, 426–433.
- Fitsanakis, V.A., Piccola, G., Marreilha dos Santos, A.P., Aschner, J.L., Aschner, M., 2007. Putative proteins involved in manganese transport across the blood-brain barrier. *Hum Exp Toxicol* 26, 295–302.
- Fitsanakis, V.A., Zhang, N., Garcia, S., Aschner, M., 2010. Manganese (Mn) and iron (Fe): interdependency of transport and regulation. *Neurotox Res* 18, 124–131.
- Fournet, V., Jany, M., Fabre, V., Chali, F., Orsal, D., Schweitzer, A., Andrieux, A., Messanvi, F., Giros, B., Hamon, M., Lanfumey, L., Deloulme, J.-C., Martres, M.-P., 2010. The deletion of the microtubule-associated STOP protein affects the serotonergic mouse brain network. *Journal of Neurochemistry* 115, 1579–1594.
- Fournet, V., Schweitzer, A., Chevarin, C., Deloulme, J.-C., Hamon, M., Giros, B., Andrieux, A., Martres, M.-P., 2012. The deletion of STOP/MAP6 protein in mice triggers highly altered mood and impaired cognitive performances. *Journal of Neurochemistry* 121, 99–114.
- Fradley, R.L., O'Meara, G.F., Newman, R.J., Andrieux, A., Job, D., Reynolds, D.S., 2005. STOP knockout and NMDA NR1 hypomorphic mice exhibit deficits in sensorimotor gating. *Behavioural Brain Research* 163, 257–264.
- Frederickson, C.J., 1989. Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int. Rev. Neurobiol.* 31, 145–238.
- Gallagher, J.J., Zhang, X., Ziomek, G.J., Jacobs, R.E., Bearer, E.L., 2012. Deficits in axonal transport in hippocampal-based circuitry and the visual pathway in APP knock-out animals witnessed by manganese enhanced MRI. *NeuroImage* 60, 1856–1866.

- Gallez, B., Baudelet, C., Adline, J., Geurts, M., Delzenne, N., 1997. Accumulation of manganese in the brain of mice after intravenous injection of manganese-based contrast agents. *Chem. Res. Toxicol* 10, 360–363.
- Gallez, B., Demeure, C., Baudelet, C., Geurts, M., Geubel, A., Roels, H., 1999. Evaluation par RMN de l'intoxication cérébrale par le manganèse 165–168.
- Galvani, P., Fumagalli, P., Santagostino, A., 1995. Vulnerability of mitochondrial complex I in PC12 cells exposed to manganese. *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology* 293, 377–383.
- Gianutsos, G., Morrow, G.R., Morris, J.B., 1997. Accumulation of manganese in rat brain following intranasal administration. *Fundam Appl Toxicol* 37, 102–105.
- Gibbons, R.A., Dixon, S.N., Hallis, K., Russell, A.M., Sansom, B.F., Symonds, H.W., 1976. Manganese metabolism in cows and goats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 444, 1–10.
- Gillet, B., Po, C., Dupont, D., Sébrié, C., Méric, P., 2010. Manganèse et imagerie de résonance magnétique du développement cérébral. *Comptes Rendus Chimie* 13, 459–465.
- Giordano, G., Pizzurro, D., VanDeMark, K., Guizzetti, M., Costa, L.G., 2009. Manganese inhibits the ability of astrocytes to promote neuronal differentiation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 240, 226–235.
- Gladden, L.B., 2004. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J Physiol* 558, 5–30.
- Gobbo, O.L., Petit, F., Gurden, H., Dhenain, M., 2012. In vivo detection of excitotoxicity by manganese-enhanced MRI: Comparison with physiological stimulation. *Magnetic Resonance in Medicine* 68, 234–240.
- Golub, M.S., Hogrefe, C.E., Germann, S.L., Tran, T.T., Beard, J.L., Crinella, F.M., Lonnerdal, B., 2005. Neurobehavioral evaluation of rhesus monkey infants fed cow's milk formula, soy formula, or soy formula with added manganese. *Neurotoxicol Teratol* 27, 615–627.
- Gonzalez, L.E., Juknat, A.A., Venosa, A.J., Verrengia, N., Kotler, M.L., 2008. Manganese activates the mitochondrial apoptotic pathway in rat astrocytes by modulating the expression of proteins of the Bcl-2 family. *Neurochem. Int* 53, 408–415.
- Govindaraju, V., Young, K., Maudsley, A.A., 2000. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed* 13, 129–153.
- Graham, D.G., 1984. Catecholamine toxicity: a proposal for the molecular pathogenesis of manganese neurotoxicity and Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 5, 83–95.
- Graverondemilly, D., Diop, A., Briguet, A., Fenet, B., 1993. Product-Operator Algebra for Strongly Coupled Spin Systems. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* 101, 233–239.
- Greene, L.A., Tischler, A.S., 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2424–2428.
- Guillaud, L., Bosc, C., Fourest-Lieuvin, A., Denarier, E., Pirollet, F., Lafanechère, L., Job, D., 1998. STOP Proteins are Responsible for the High Degree of Microtubule Stabilization Observed in Neuronal Cells. *J Cell Biol* 142, 167–179.

- Gunter, T.E., Puskin, J.S., 1972. Manganous ion as a spin label in studies of mitochondrial uptake of manganese. *Biophys. J* 12, 625–635.
- Halestrap, A.P., McStay, G.P., Clarke, S.J., 2002. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 84, 153–166.
- Hamm, B., Vogl, T.J., Branding, G., Schnell, B., Taupitz, M., Wolf, K.J., Lissner, J., 1992. Focal liver lesions: MR imaging with Mn-DPDP--initial clinical results in 40 patients. *Radiology* 182, 167–174.
- Hanaya, R., Koning, E., Ferrandon, A., Schweitzer, A., Andrieux, A., Nehlig, A., 2008. Deletion of the STOP gene, a microtubule stabilizing factor, leads only to discrete cerebral metabolic changes in mice. *J Neurosci Res* 86, 813–820.
- Hare, D.J., Lee, J.K., Beavis, A.D., van Gramberg, A., George, J., Adlard, P.A., Finkelstein, D.I., Doble, P.A., 2012. Three-Dimensional Atlas of Iron, Copper, and Zinc in the Mouse Cerebrum and Brainstem. *Anal. Chem.* 84, 3990–3997.
- Haug, F.M., 1967. Electron microscopical localization of the zinc in hippocampal mossy fibre synapses by a modified sulfide silver procedure. *Histochemie* 8, 355–368.
- Hauser, R.A., Zesiewicz, T.A., Rosemurgy, A.S., Martinez, C., Olanow, C.W., 1994. Manganese intoxication and chronic liver failure. *Ann. Neurol.* 36, 871–875.
- Hazell, A.S., Normandin, L., Nguyen, B., Kennedy, G., 2003. Upregulation of “peripheral-type” benzodiazepine receptors in the globus pallidus in a sub-acute rat model of manganese neurotoxicity. *Neuroscience Letters* 349, 13–16.
- He, L., Girijashanker, K., Dalton, T.P., Reed, J., Li, H., Soleimani, M., Nebert, D.W., 2006. ZIP8, Member of the Solute-Carrier-39 (SLC39) Metal-Transporter Family: Characterization of Transporter Properties. *Mol Pharmacol* 70, 171–180.
- Hernández, R.B., Farina, M., Espósito, B.P., Souza-Pinto, N.C., Barbosa, F., Suñol, C., 2011. Mechanisms of Manganese-Induced Neurotoxicity in Primary Neuronal Cultures: The Role of Manganese Speciation and Cell Type. *Toxicol. Sci.* 124, 414–423.
- Higashi, Y., Asanuma, M., Miyazaki, I., Hattori, N., Mizuno, Y., Ogawa, N., 2004. Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death. *Journal of Neurochemistry* 89, 1490–1497.
- Hirata, Y., 2002. Manganese-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicology and Teratology* 24, 639–653.
- Hottinger, A.F., Azzouz, M., Déglon, N., Aebischer, P., Zurn, A.D., 2000. Complete and Long-Term Rescue of Lesioned Adult Motoneurons by Lentiviral-Mediated Expression of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in the Facial Nucleus. *J. Neurosci.* 20, 5587–5593.
- Houseweart, M.K., Cleveland, D.W., 1999. Cytoskeletal linkers: New MAPs for old destinations. *Current Biology* 9, R864–R866.
- Huang, E., Ong, W.-Y., Go, M.-L., Connor, J.R., 2006. Upregulation of iron regulatory proteins and divalent metal transporter-1 isoforms in the rat hippocampus after kainate induced neuronal injury. *Exp Brain Res* 170, 376–386.
- Hurley, L.S., Keen, C.L., Baly, D.L., 1984. Manganese deficiency and toxicity: effects on carbohydrate metabolism in the rat. *Neurotoxicology* 5, 97–104.

- Husain, R., Seth, P.K., Chandra, S.V., 1976. Early inhibition of succinic dehydrogenase by manganese in rat gonads. *Bull Environ Contam Toxicol* 16, 118-121.
- Ironside, J.W., 2012. Variant Creutzfeldt-Jakob disease: an update. *Folia Neuropathol* 50, 50-56.
- Ishizuka, N., Cowan, W.M., Amaral, D.G., 1995. A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 362, 17-45.
- Ito, Y., Oh-hashii, K., Kiuchi, K., Hirata, Y., 2006. p44/42 MAP kinase and c-Jun N-terminal kinase contribute to the up-regulation of caspase-3 in manganese-induced apoptosis in PC12 cells. *Brain Research* 1099, 1-7.
- Jackson, S.J., Hussey, R., Jansen, M.A., Merrifield, G.D., Marshall, I., MacLulich, A., Yau, J.L.W., Bast, T., 2011. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) of rat brain after systemic administration of MnCl₂: Hippocampal signal enhancement without disruption of hippocampus-dependent behavior. *Behavioural Brain Research* 216, 293-300.
- Janssens, K.H.A., Adams, F.C.V., Rindby, A., 2000. Evaluation and calibration of micro-XRF data, in: *Microscopic X-ray Fluorescence Analysis*. Chichester, pp. 155-207.
- Jiang, Y., Zheng, W., 2005. Cardiovascular toxicities upon manganese exposure. *Cardiovasc. Toxicol.* 5, 345-354.
- Jiang, Y.-M., Mo, X.-A., Du, F.-Q., Fu, X., Zhu, X.-Y., Gao, H.-Y., Xie, J.-L., Liao, F.-L., Pira, E., Zheng, W., 2006. Effective treatment of manganese-induced occupational Parkinsonism with p-aminosalicylic acid: a case of 17-year follow-up study. *J. Occup. Environ. Med.* 48, 644-649.
- Job, D., 1988. Le système microtubulaire: Vers une approche moléculaire de la motilité et de la morphogenèse cellulaires, in: *Hématologie*. Presented at the Cellules dendritiques. Réunion, John Libbey Eurotext, pp. 419-430.
- Job, P., 1925. Etude Spectrographique de la Formation des Complexes en Solution et de leur Stabilité. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 180, 928-930.
- Josephs, K.A., Ahlskog, J.E., Klos, K.J., Kumar, N., Fealey, R.D., Trenerry, M.R., Cowl, C.T., 2005. Neurologic manifestations in welders with pallidal MRI T1 hyperintensity. *Neurology* 64, 2033-2039.
- Jouve, H., Jouve, H., Melgar, E., Lizárraga, B., 1975. A study of the binding of Mn²⁺ to bovine pancreatic deoxyribonuclease I and to deoxyribonucleic acid by electron paramagnetic resonance. *J. Biol. Chem.* 250, 6631-6635.
- Kalia, K., Jiang, W., Zheng, W., 2008. Manganese Accumulates Primarily in Nuclei of Cultured Brain Cells. *Neurotoxicology* 29, 466-470.
- Kato, M., 1963. Distribution and excretion of radiomanganese administered to the mouse. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 48, 355-369.
- Kemp, K., Danscher, G., 1979. Multi-element analysis of the rat hippocampus by proton induced X-ray emission spectroscopy (phosphorus, sulphur, chlorine, potassium, calcium, iron, zinc, copper, lead, bromine, and rubidium). *Histochemistry* 59, 167-176.
- Kiebertz, K., Kurlan, R., 2005. Welding and Parkinson disease: is there a bond? *Neurology* 64, 2001-2003.

- Kim, J., Choi, I.-Y., Michaelis, M.L., Lee, P., 2011. Quantitative in vivo measurement of early axonal transport deficits in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease using manganese-enhanced MRI. *Neuroimage* 56, 1286–1292.
- Kishi, K., Wariishi, H., Marquez, L., Dunford, H.B., Gold, M.H., 1994. Mechanism of Manganese Peroxidase Compound II Reduction. Effect of Organic Acid Chelators and pH. *Biochemistry* 33, 8694–8701.
- Köles, L., Leichsenring, A., Rubini, P., Illes, P., 2011. P2 receptor signaling in neurons and glial cells of the central nervous system. *Adv. Pharmacol.* 61, 441–493.
- Koller, W.C., Lyons, K.E., Truly, W., 2004. Effect of levodopa treatment for parkinsonism in welders: A double-blind study. *Neurology* 62, 730–733.
- Kolman, A., 2004. BMS-310705 Bristol-Myers Squibb/GBF. *Curr Opin Investig Drugs* 5, 1292–1297.
- Kontur, P.J., Fechter, L.D., 1988. Brain regional manganese levels and monoamine metabolism in manganese-treated neonatal rats. *Neurotoxicol Teratol* 10, 295–303.
- Koretsky, A.P., Silva, A.C., 2004. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *NMR Biomed* 17, 527–531.
- Kowara, R., Moraleja, K.L., Chakravarthy, B., 2006. Involvement of nitric oxide synthase and ROS-mediated activation of L-type voltage-gated Ca²⁺ channels in NMDA-induced DPYSL3 degradation. *Brain Research* 1119, 40–49.
- Kwik-Urbe, C.L., Reaney, S., Zhu, Z., Smith, D., 2003. Alterations in cellular IRP-dependent iron regulation by in vitro manganese exposure in undifferentiated PC12 cells. *Brain Research* 973, 1–15.
- Lai, J.C., Lim, L., Davison, A.N., 1982. Effects of Cd²⁺, Mn²⁺, and Al³⁺ on rat brain synaptosomal uptake of noradrenaline and serotonin. *J. Inorg. Biochem.* 17, 215–225.
- Lauterbur, P.C., 1973. Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. , Published online: 16 March 1973; | doi:10.1038/242190a0 242, 190–191.
- Le Bas, J.F., Estève, F., Grand, S., Rubin, C., Rémy, C., Benabid, A.L., Décorps, M., 1998. NMR spectroscopy and brain diseases. Clinical applications. *J Neuroradiol* 25, 55–69.
- Lee, T., Zhang, X., Dhar, S., Faas, H., Lippard, S.J., Jasanoff, A., 2010. In vivo imaging with a cell-permeable porphyrin-based MRI contrast agent. *Chem. Biol* 17, 665–673.
- Leergaard, T.B., Bjaalie, J.G., Devor, A., Wald, L.L., Dale, A.M., 2003. In vivo tracing of major rat brain pathways using manganese-enhanced magnetic resonance imaging and three-dimensional digital atlasing. *NeuroImage* 20, 1591–1600.
- Lehallier, B., Coureaud, G., Maurin, Y., Bonny, J.-M., 2012. Effects of manganese injected into rat nostrils: implications for in vivo functional study of olfaction using MEMRI. *Magnetic Resonance Imaging* 30, 62–69.
- Lein, P., Gallagher, P.J., Amodeo, J., Howie, H., Roth, J.A., 2000. Manganese induces neurite outgrowth in PC12 cells via upregulation of alpha(v) integrins. *Brain Res.* 885, 220–230.

- Lenaz, G., Baracca, A., Fato, R., Genova, M.L., Solaini, G., 2006. New Insights Into Structure and Function of Mitochondria and Their Role in Aging and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 8, 417–437.
- Lewis, D.A., Lieberman, J.A., 2000. Catching Up on Schizophrenia: Natural History and Neurobiology. *Neuron* 28, 325–334.
- Liccione, J.J., Maines, M.D., 1988. Selective vulnerability of glutathione metabolism and cellular defense mechanisms in rat striatum to manganese. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 247, 156–161.
- Liddelow, S.A., 2011. Fluids and barriers of the CNS: a historical viewpoint. *Fluids Barriers CNS* 8, 2.
- Lieuvin, A., Labbé, J.C., Dorée, M., Job, D., 1994. Intrinsic microtubule stability in interphase cells. *J Cell Biol* 124, 985–996.
- Lin, Y.J., Koretsky, A.P., 1997. Manganese ion enhances T1-weighted MRI during brain activation: an approach to direct imaging of brain function. *Magn Reson Med* 38, 378–388.
- Lippens, G., Warrass, R., Wieruszeski, J., Rousselot-Pailley, P., Chessari, G., 2001. High Resolution Magic Angle Spinning NMR in Combinatorial Chemistry, in: *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. pp. 333–351.
- Liu, J.F., Jiang, G.B., Feng, Y.D., 2000. Flow injection spectrophotometric determination of copper, iron, manganese, and zinc in animal feeds using a common manifold. *J AOAC Int* 83, 1293–1298.
- Lu, J., Ma, S., Sun, J., Xia, C., Liu, C., Wang, Z., Zhao, X., Gao, F., Gong, Q., Song, B., Shuai, X., Ai, H., Gu, Z., 2009. Manganese ferrite nanoparticle micellar nanocomposites as MRI contrast agent for liver imaging. *Biomaterials* 30, 2919–2928.
- Lynam, D.R., Roos, J.W., Pfeifer, G.D., Fort, B.F., Pullin, T.G., 1999. Environmental effects and exposures to manganese from use of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT) in gasoline. *Neurotoxicology* 20, 145–150.
- Malecki, E.A., 2001. Manganese toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and DNA fragmentation in rat primary striatal neurons. *Brain Res. Bull* 55, 225–228.
- Malthankar, G.V., White, B.K., Bhushan, A., Daniels, C.K., Rodnick, K.J., Lai, J.C.K., 2004. Differential Lowering by Manganese Treatment of Activities of Glycolytic and Tricarboxylic Acid (TCA) Cycle Enzymes Investigated in Neuroblastoma and Astrocytoma Cells Is Associated with Manganese-Induced Cell Death. *Neurochemical Research* 29, 709–717.
- McKenna, M.C., Waagepetersen, H.S., Schousboe, A., Sonnewald, U., 2006. Neuronal and astrocytic shuttle mechanisms for cytosolic-mitochondrial transfer of reducing equivalents: Current evidence and pharmacological tools. *Biochemical Pharmacology* 71, 399–407.
- Mertz, W., 2009. Risk Assessment of Essential Trace Elements: New Approaches to Setting Recommended Dietary Allowances and Safety Limits. *Nutrition Reviews* 53, 179–185.
- Mildvan, A.S., Cohn, M., 1963. Magnetic Resonance Studies of the Interaction of the Manganous Ion with Bovine Serum Albumin*. *Biochemistry* 2, 910–919.

- Minoshima, S., Cross, D., 2008. In vivo imaging of axonal transport using MRI: aging and Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 35 Suppl 1, S89–92.
- Mirnics, K., Middleton, F.A., Lewis, D.A., Levitt, P., 2001. Analysis of complex brain disorders with gene expression microarrays: schizophrenia as a disease of the synapse. *Trends in Neurosciences* 24, 479–486.
- Missiaen, L., Raeymaekers, L., Dode, L., Vanoevelen, J., Van Baelen, K., Parys, J.B., Callewaert, G., De Smedt, H., Segaert, S., Wuytack, F., 2004. SPCA1 pumps and Hailey-Hailey disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322, 1204–1213.
- Moffett, J.R., Ross, B., Arun, P., Madhavarao, C.N., Namboodiri, M.A.A., 2007. N-Acetylaspartate in the CNS: From Neurodiagnostics to Neurobiology. *Prog Neurobiol* 81, 89–131.
- Mok, S.I., Munasinghe, J.P., Young, W.S., 2011. Infusion-based manganese-enhanced MRI: a new imaging technique to visualize the mouse brain. *Brain Structure and Function* 217, 107–114.
- Mukhopadhyay, S., Bachert, C., Smith, D.R., Linstedt, A.D., 2010. Manganese-induced trafficking and turnover of the cis-Golgi glycoprotein GPP130. *Mol. Biol. Cell* 21, 1282–1292.
- Mustafa, S.J., Chandra, S.V., 1971. Levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine and norepinephrine in whole brain of rabbits in chronic manganese toxicity. *J. Neurochem.* 18, 931–933.
- Nairismägi, J., Pitkänen, A., Narkilahti, S., Huttunen, J., Kauppinen, R.A., Gröhn, O.H.J., 2006. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging of mossy fiber plasticity in vivo. *Neuroimage* 30, 130–135.
- Narita, K., Kawasaki, F., Kita, H., 1990. Mn and Mg influxes through Ca channels of motor nerve terminals are prevented by verapamil in frogs. *Brain Res* 510, 289–295.
- Navarro, A., López-Cepero, J.M., Bández, M.J., Sánchez-Pino, M.-J., Gómez, C., Cadenas, E., Boveris, A., 2008. Hippocampal mitochondrial dysfunction in rat aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294, R501–R509.
- Nelson, M., Huggins, T., Licorish, R., Carroll, M.A., Catapane, E.J., 2010. Effects of p-Aminosalicylic acid on the neurotoxicity of manganese on the dopaminergic innervation of the cilia of the lateral cells of the gill of the bivalve mollusc, *Crassostrea virginica*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 151, 264–270.
- Newland, M.C., 1999. Animal models of manganese's neurotoxicity. *Neurotoxicology* 20, 415–432.
- Newland, M.C., Cox, C., Hamada, R., Oberdörster, G., Weiss, B., 1987. The clearance of manganese chloride in the primate. *Fundam Appl Toxicol* 9, 314–328.
- Nordhøy, W., Anthonsen, H.W., Bruvold, M., Jynge, P., Krane, J., Brurok, H., 2003. Manganese ions as intracellular contrast agents: proton relaxation and calcium interactions in rat myocardium. *NMR in Biomedicine* 16, 82–95.
- Olmsted, J.B., Carlson, K., Klebe, R., Ruddle, F., Rosenbaum, J., 1970. Isolation of Microtubule Protein from Cultured Mouse Neuroblastoma Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65, 129–136.

- Ortega, R., Devès, G., Carmona, A., 2009. Bio-metals imaging and speciation in cells using proton and synchrotron radiation X-ray microspectroscopy. *J R Soc Interface* 6, S649–S658.
- Pang, H., Bartlam, M., Zeng, Q., Miyatake, H., Hisano, T., Miki, K., Wong, L.-L., Gao, G.F., Rao, Z., 2004. Crystal Structure of Human Pirin an Iron-Binding Nuclear Protein and Transcription cofactor. *J. Biol. Chem.* 279, 1491–1498.
- Pautler, R.G., 2004. In vivo, trans-synaptic tract-tracing utilizing manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *NMR Biomed* 17, 595–601.
- Pautler, R.G., Koretsky, A.P., 2002. Tracing odor-induced activation in the olfactory bulbs of mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 16, 441–448.
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Deluxe Edition), Second Edition, 2nd ed.* Academic Press.
- Paxinos, G., Watson, C., 2004. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - The New Coronal Set, Fifth Edition, 5th ed.* Academic Press.
- Pellerin, L., Magistretti, P.J., 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10625–10629.
- Powell, K.J., Hori, S.E., Leslie, R., Andrieux, A., Schellinck, H., Thorne, M., Robertson, G.S., 2007. Cognitive impairments in the STOP null mouse model of schizophrenia. *Behav. Neurosci.* 121, 826–835.
- Prohaska, J.R., 1987. Functions of trace elements in brain metabolism. *Physiol. Rev.* 67, 858–901.
- Quintanar, L., 2008. Manganese neurotoxicity: A bioinorganic chemist's perspective. *Inorganica Chimica Acta* 361, 875–884.
- Rabeson, H., Fauvelle, F., Testylier, G., Foquin, A., Carpentier, P., Dorandeu, F., van Ormondt, D., Graveron-Demilly, D., 2008. Quantitation with QUEST of brain HRMAS-NMR signals: Application to metabolic disorders in experimental epileptic seizures. *Magnetic Resonance in Medicine* 59, 1266–1273.
- Rama Rao, K.V., Reddy, P.V.B., Hazell, A.S., Norenberg, M.D., 2007. Manganese induces cell swelling in cultured astrocytes. *Neurotoxicology* 28, 807–812.
- Ramos, M., del Arco, A., Pardo, B., Martínez-Serrano, A., Martínez-Morales, J.R., Kobayashi, K., Yasuda, T., Bogóñez, E., Bovolenta, P., Saheki, T., Satrústegui, J., 2003. Developmental changes in the Ca²⁺-regulated mitochondrial aspartate–glutamate carrier aralar1 in brain and prominent expression in the spinal cord. *Developmental Brain Research* 143, 33–46.
- Ratiney, H., Coenradie, Y., Cavassila, S., van Ormondt, D., Graveron-Demilly, D., 2004. Time-domain quantitation of 1H short echo-time signals: background accommodation. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 16, 284–296.
- Raveh, L., Chapman, S., Cohen, G., Alkalay, D., Gilat, E., Rabinovitz, I., Weissman, B.A., 1999. The involvement of the NMDA receptor complex in the protective effect of anticholinergic drugs against soman poisoning. *Neurotoxicology* 20, 551–559.

- Richard, M., Sacquet, J., Jany, M., Schweitzer, A., Jourdan, F., Andrieux, A., Pellier-Monnin, V., 2009. STOP proteins contribute to the maturation of the olfactory system. *Molecular and Cellular Neuroscience* 41, 120–134.
- Rivera-Mancía, S., Ríos, C., Montes, S., 2011. Manganese accumulation in the CNS and associated pathologies. *BioMetals* 24, 811–825.
- Roth, J.A., Feng, L., Walowitz, J., Browne, R.W., 2000. Manganese-induced rat pheochromocytoma (PC12) cell death is independent of caspase activation. *Journal of Neuroscience Research* 61, 162–171.
- Schmidt, K.C., Smith, C.B., 2005. Resolution, sensitivity and precision with autoradiography and small animal positron emission tomography: implications for functional brain imaging in animal research. *Nuclear Medicine and Biology* 32, 719–725.
- Schmitt, C., Strazielle, N., Richaud, P., Bouron, A., Ghersi-Egea, J.-F., 2011. Active transport at the blood-CSF barrier contributes to manganese influx into the brain. *J. Neurochem.* 117, 747–756.
- Sen, S., Flynn, M.R., Du, G., Tröster, A.I., An, H., Huang, X., 2011. Manganese accumulation in the olfactory bulbs and other brain regions of “asymptomatic” welders. *Toxicol. Sci.* 121, 160–167.
- Sepúlveda, M.R., Vanoevelen, J., Raeymaekers, L., Mata, A.M., Wuytack, F., 2009. Silencing the SPCA1 (Secretory Pathway Ca²⁺-ATPase Isoform 1) Impairs Ca²⁺ Homeostasis in the Golgi and Disturbs Neural Polarity. *J. Neurosci.* 29, 12174–12182.
- Serrano, F., Deshazer, M., Smith, K.D.B., Ananta, J.S., Wilson, L.J., Pautler, R.G., 2008. Assessing transneuronal dysfunction utilizing manganese-enhanced MRI (MEMRI). *Magn Reson Med* 60, 169–175.
- Shacklette, H.T., Boerngen, J.G., 1984. Element Concentrations in Soils and Other Surficial Materials of the Conterminous United States.
- Shen, H., Wang, F., Zhang, Y., Xu, J., Long, J., Qin, H., Liu, F., Guo, J., 2007. Zinc Distribution and Expression Pattern of ZnT3 in Mouse Brain. *Biological Trace Element Research* 119, 166–174.
- Shinotoh, H., Snow, B.J., Hewitt, K.A., Pate, B.D., Doudet, D., Nugent, R., Perl, D.P., Olanow, W., Calne, D.B., 1995. MRI and PET studies of manganese-intoxicated monkeys. *Neurology* 45, 1199–1204.
- Shull, G.E., Miller, M.L., Prasad, V., 2011. Secretory Pathway Stress Responses as Possible Mechanisms of Disease Involving Golgi Ca²⁺ Pump Dysfunction. *Biofactors* 37, 150–158.
- Sievers, J., Hartmann, D., Pehlemann, F.W., Berry, M., 1992. Development of astroglial cells in the proliferative matrices, the granule cell layer, and the hippocampal fissure of the hamster dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 320, 1–32.
- Silva, A.C., Lee, J.H., Aoki, I., Koretsky, A.P., 2004. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI): methodological and practical considerations. *NMR Biomed* 17, 532–543.
- Simpson, P.B., Challiss, R.A., Nahorski, S.R., 1995. Divalent cation entry in cultured rat cerebellar granule cells measured using Mn²⁺ quench of fura 2 fluorescence. *Eur. J. Neurosci.* 7, 831–840.

- Slout, W.N., Gramsbergen, J.-B.P., 1994. Axonal transport of manganese and its relevance to selective neurotoxicity in the rat basal ganglia. *Brain Research* 657, 124-132.
- Slout, W.N., Korf, J., Koster, J.F., de Wit, L.E.A., Gramsbergen, J.B.P., 1996. Manganese-Induced Hydroxyl Radical Formation in Rat Striatum Is Not Attenuated by Dopamine Depletion or Iron Chelation in Vivo. *Experimental Neurology* 138, 236-245.
- Smith, K.D.B., Kallhoff, V., Zheng, H., Pautler, R.G., 2007a. In vivo axonal transport rates decrease in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimage* 35, 1401-1408.
- Smith, K.D.B., Paylor, R., Pautler, R.G., 2011. R-Flurbiprofen Improves Axonal Transport in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease as Determined by MEMRI. *Magn Reson Med* 65, 1423-1429.
- Smith, Kallhoff, V., Zheng, H., Pautler, R.G., 2007b. In vivo axonal transport rates decrease in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimage* 35, 1401-1408.
- Sole, V., Papillon, E., Cotte, M., Walter, P., Susini, J., 2007. A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy* 62, 63-68.
- Soria, G., Wiedermann, D., Justicia, C., Ramos-Cabrera, P., Hoehn, M., 2008. Reproducible imaging of rat corticothalamic pathway by longitudinal manganese-enhanced MRI (L-MEMRI). *NeuroImage* 41, 668-674.
- Sotak, C.H., Sharer, K., Koretsky, A.P., 2008. Manganese cell labeling of murine hepatocytes using manganese(III)-transferrin. *Contrast Media & Molecular Imaging* 3, 95-105.
- Spratlin, J.L., Serkova, N.J., Gail Eckhardt, S., 2009. Clinical Applications of Metabolomics in Oncology: A Review. *Clin Cancer Res* 15, 431-440.
- Stauber, J.L., Florence, T.M., 1989. Manganese in scalp hair: problems of exogenous manganese and implications for manganese monitoring in groote eylandt aborigines. *Science of The Total Environment* 83, 85-98.
- Sugranyes, G., Kyriakopoulos, M., Dima, D., O'Muircheartaigh, J., Corrigall, R., Pendelbury, G., Hayes, D., Calhoun, V.D., Frangou, S., 2012. Multimodal analyses identify linked functional and white matter abnormalities within the working memory network in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 138, 136-142.
- Sumino, K., Hayakawa, K., Shibata, T., Kitamura, S., 1975. Heavy metals in normal Japanese tissues. Amounts of 15 heavy metals in 30 subjects. *Arch. Environ. Health* 30, 487-494.
- Takeda, A., Kodama, Y., Ishiwatari, S., Okada, S., 1998. Manganese transport in the neural circuit of rat CNS. *Brain Res. Bull* 45, 149-152.
- Tan, G.H., Yang, B., Tan, G., Lan, L., Deng, X., Tao, H., 2007. [Effects of manganese on proliferation of neural stem cells in mice's hippocampus]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 25, 282-285.
- Tan, J., Zhang, T., Jiang, L., Chi, J., Hu, D., Pan, Q., Wang, D., Zhang, Z., 2011. Regulation of Intracellular Manganese Homeostasis by Kufor-Rakeb Syndrome-associated ATP13A2 Protein. *J. Biol. Chem.* 286, 29654-29662.

- Tarohda, T., Ishida, Y., Kawai, K., Yamamoto, M., Amano, R., 2005. Regional distributions of manganese, iron, copper, and zinc in the brains of 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian rats. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 383, 224–234.
- Tholey, G., Bloch, S., Ledig, M., Mandel, P., Wedler, F., 1987. Chick brain glutamine synthetase and Mn^{2+} - Mg^{2+} interactions. *Neurochem. Res.* 12, 1041–1047.
- Tholey, G., Ledig, M., Kopp, P., Sargentini-Maier, L., Leroy, M., Grippo, A.A., Wedler, F.C., 1988. Levels and sub-cellular distribution of physiologically important metal ions in neuronal cells cultured from chick embryo cerebral cortex. *Neurochemical Research* 13, 1163–1167.
- Tiago, T., Marques-da-Silva, D., Samhan-Arias, A.K., Aureliano, M., Gutierrez-Merino, C., 2011. Early disruption of the actin cytoskeleton in cultured cerebellar granule neurons exposed to 3-morpholinopyridone-oxidative stress is linked to alterations of the cytosolic calcium concentration. *Cell Calcium* 49, 174–183.
- Tjälve, H., Henriksson, J., Tallkvist, J., Larsson, B.S., Lindquist, N.G., 1996. Uptake of manganese and cadmium from the nasal mucosa into the central nervous system via olfactory pathways in rats. *Pharmacol. Toxicol.* 79, 347–356.
- Tracqui, A., Tayot, J., Kintz, P., Alves, G., Bosque, M.A., Mangin, P., 1995. Determination of manganese in human brain samples. *Forensic Science International* 76, 199–203.
- Tucciarone, J., Chuang, K.-H., Dodd, S.J., Silva, A., Pelled, G., Koretsky, A.P., 2009. Layer specific tracing of corticocortical and thalamocortical connectivity in the rodent using manganese enhanced MRI. *NeuroImage* 44, 923–931.
- U.S. EPA, 2003. Health Effects Support Document for Manganese.
- Van Baelen, K., Dode, L., Vanoevelen, J., Callewaert, G., De Smedt, H., Missiaen, L., Parys, J.B., Raeymaekers, L., Wuytack, F., 2004. The Ca^{2+}/Mn^{2+} pumps in the Golgi apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1742, 103–112.
- Van der Linden, A., Van Meir, V., Tindemans, I., Verhoye, M., Balthazart, J., 2004. Applications of manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) to image brain plasticity in song birds. *NMR in Biomedicine* 17, 602–612.
- Van der Linden, A., Verhoye, M., Van Meir, V., Tindemans, I., Eens, M., Absil, P., Balthazart, J., 2002. In vivo manganese-enhanced magnetic resonance imaging reveals connections and functional properties of the songbird vocal control system. *Neuroscience* 112, 467–474.
- van der Zijden, J.P., Wu, O., van der Toorn, A., Roeling, T.P., Bleys, R.L.A.W., Dijkhuizen, R.M., 2007. Changes in neuronal connectivity after stroke in rats as studied by serial manganese-enhanced MRI. *NeuroImage* 34, 1650–1657.
- Vandenhoute, E., 2011. Établissement et caractérisation de nouveaux modèles in vitro de barrière hémato-encéphalique : de la recherche fondamentale à la recherche appliquée.
- Vanoevelen, J., Dode, L., Van Baelen, K., Fairclough, R.J., Missiaen, L., Raeymaekers, L., Wuytack, F., 2005. The secretory pathway Ca^{2+}/Mn^{2+} -ATPase 2 is a Golgi-localized pump with high affinity for Ca^{2+} ions. *J. Biol. Chem.* 280, 22800–22808.

- Vezér, T., Kurunczi, A., Náray, M., Papp, A., Nagymajtényi, L., 2007. Behavioral effects of subchronic inorganic manganese exposure in rats. *American Journal of Industrial Medicine* 50, 841–852.
- Viant, M.R., Lyeth, B.G., Miller, M.G., Berman, R.F., 2005. An NMR metabolomic investigation of early metabolic disturbances following traumatic brain injury in a mammalian model. *NMR in Biomedicine* 18, 507–516.
- Vimard, F., Saucet, M., Nicole, O., Feuilloley, M., Duval, D., 2011. Toxicity induced by cumene hydroperoxide in PC12 cells: Protective role of thiol donors. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 25, 205–215.
- Vogtherr, M., Limmer, S., 1998. NMR study on the impact of metal ion binding and deoxynucleotide substitution upon local structure and stability of a small ribozyme. *FEBS Lett.* 433, 301–306.
- Voisin, A., 1959. Soil, grass and cancer. Health of animals and men is linked to the mineral balance of the soil.
- Wahlsten, D., Bishop, K.M., Ozaki, H.S., 2006. Recombinant inbreeding in mice reveals thresholds in embryonic corpus callosum development. *Genes, Brain and Behavior* 5, 170–188.
- Wasserman, G.A., Liu, X., Parvez, F., Ahsan, H., Levy, D., Factor-Litvak, P., Kline, J., van Geen, A., Slavkovich, V., LoIacono, N.J., Cheng, Z., Zheng, Y., Graziano, J.H., 2006. Water Manganese Exposure and Children's Intellectual Function in Araihasar, Bangladesh. *Environ Health Perspect* 114, 124–129.
- Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J., 2001. Mapping of retinal projections in the living rat using high-resolution 3D gradient-echo MRI with Mn²⁺-induced contrast. *Magn Reson Med* 46, 424–429.
- Watanabe, T., Radulovic, J., Spiess, J., Natt, O., Boretius, S., Frahm, J., Michaelis, T., 2004. In vivo 3D MRI staining of the mouse hippocampal system using intracerebral injection of MnCl₂. *NeuroImage* 22, 860–867.
- Wedler, F.C., Denman, R.B., 1984. Glutamine synthetase: the major Mn(II) enzyme in mammalian brain. *Curr. Top. Cell. Regul.* 24, 153–169.
- Wedler, F.C., Vichnin, M.C., Ley, B.W., Tholey, G., Ledig, M., Copin, J.C., 1994. Effects of Ca(II) ions on Mn(II) dynamics in chick glia and rat astrocytes: potential regulation of glutamine synthetase. *Neurochem. Res.* 19, 145–151.
- Weiss, B., 2006. Economic implications of manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology* 27, 362–368.
- Woolf, A., Wright, R., Amarasiriwardena, C., Bellinger, D., 2002. A child with chronic manganese exposure from drinking water. *Environ. Health Perspect.* 110, 613–616.
- Wright, A.J., Fellows, G.A., Griffiths, J.R., Wilson, M., Bell, B.A., Howe, F.A., 2010. Ex-vivo HRMAS of adult brain tumours: metabolite quantification and assignment of tumour biomarkers. *Mol Cancer* 9, 66.
- Xu, B., Xu, Z.-F., Deng, Y., 2009. Effect of manganese exposure on intracellular Ca²⁺ homeostasis and expression of NMDA receptor subunits in primary cultured neurons. *NeuroToxicology* 30, 941–949.
- Yasui, M., Ota, K., Garruto, R.M., 1995. Effects of calcium-deficient diets on manganese deposition in the central nervous system and bones of rats. *Neurotoxicology* 16, 511–517.

- Ye, B., Zhang, Y., Song, W., Younger, S.H., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 2007. Growing dendrites and axons differ in their reliance on the secretory pathway. *Cell* 130, 717-729.
- Yin, D.-M., Huang, Y.-H., Zhu, Y.-B., Wang, Y., 2008. Both the Establishment and Maintenance of Neuronal Polarity Require the Activity of Protein Kinase D in the Golgi Apparatus. *J. Neurosci.* 28, 8832-8843.
- Yokel, R.A., 2006. Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. *J. Alzheimers Dis.* 10, 223-253.
- Yokel, R.A., Crossgrove, J.S., Bukaveckas, B.L., 2003. Manganese distribution across the blood-brain barrier. II. Manganese efflux from the brain does not appear to be carrier mediated. *Neurotoxicology* 24, 15-22.
- Yu, X., Chung, S., Chen, D.-Y., Wang, S., Dodd, S.J., Walters, J.R., Isaac, J.T.R., Koretsky, A.P., 2012. Thalamocortical Inputs Show Post-Critical-Period Plasticity. *Neuron* 74, 731-742.
- Yu, X., Glen, D., Wang, S., Dodd, S., Hirano, Y., Saad, Z., Reynolds, R., Silva, A.C., Koretsky, A.P., 2012. Direct imaging of macrovascular and microvascular contributions to BOLD fMRI in layers IV-V of the rat whisker-barrel cortex. *NeuroImage* 59, 1451-1460.
- Zhang, S., Zhou, Z., Fu, J., 2003. Effect of manganese chloride exposure on liver and brain mitochondria function in rats. *Environ. Res* 93, 149-157.
- Zhang, Z., He, R., Yan, K., Guo, Q., Lu, Y., Wang, X., Lei, H., Li, Z., 2009. Synthesis and in vitro and in vivo evaluation of manganese(III) porphyrin-dextran as a novel MRI contrast agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett* 19, 6675-6678.
- Zheng, W., Aschner, M., Gherzi-Egea, J.-F., 2003. Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 192, 1-11.
- Zheng, W., Zhao, Q., 2001. Iron overload following manganese exposure in cultured neuronal, but not neuroglial cells. *Brain Research* 897, 175-179.
- Zwingmann, C., Leibfritz, D., 2003. Regulation of glial metabolism studied by ¹³C-NMR. *NMR in Biomedicine* 16, 370-399.
- Zwingmann, C., Leibfritz, D., Hazell, A.S., 2003. Energy metabolism in astrocytes and neurons treated with manganese: relation among cell-specific energy failure, glucose metabolism, and intercellular trafficking using multinuclear NMR-spectroscopic analysis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 756-771.
- Zwingmann, C., Leibfritz, D., Hazell, A.S., 2004. Brain energy metabolism in a sub-acute rat model of manganese neurotoxicity: an ex vivo nuclear magnetic resonance study using [1-¹³C]glucose. *Neurotoxicology* 25, 573-587.
- Zwingmann, C., Leibfritz, D., Hazell, A.S., 2007. Nmr spectroscopic analysis of regional brain energy metabolism in manganese neurotoxicity. *Glia* 55, 1610-1617.

Documents Annexes

Principe de l'IRM

L'imagerie par résonance magnétique est une technique d'imagerie médicale permettant d'obtenir des images de haute résolution des tissus de l'organisme. Elle est couramment utilisée chez l'homme pour aider au diagnostic clinique, chez l'animal en imagerie vétérinaire et en imagerie pré-clinique dans la recherche scientifique. L'IRM repose sur les principes de la résonance magnétique nucléaire (RMN).

La RMN

La RMN est basée sur l'interaction de deux champs magnétiques avec la matière :

- Un champ magnétique statique (B_0) pour la levée de dégénérescence des niveaux d'énergie des spins nucléaires (des noyaux ayant un spin nucléaire non nul, comme ^1H , ^{13}C , ^{31}P ou ^{15}N). En effet, en absence de champ magnétique statique, les spins nucléaires sont sur un même niveau d'énergie. Concernant le noyau ^1H , l'application d'un champ magnétique B_0 entraîne une répartition des spins sur deux niveaux d'énergie.
- Une onde radiofréquence (RF) excitatrice (et son champ électromagnétique associé), est émise perpendiculairement au champ statique B_0 . La RF appliquée modifie l'orientation des spins permettant de mesurer les temps de relaxation longitudinale et transversale (**Figure 83**).

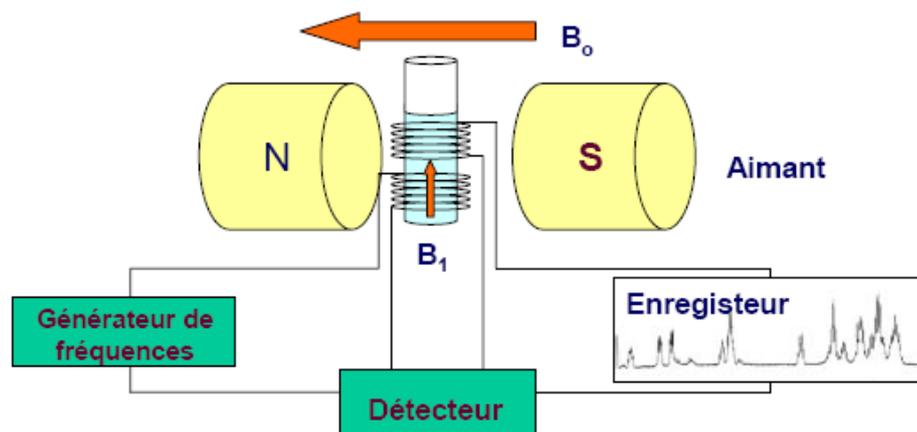


Figure 83 : Schéma de mesure du signal RMN.

Il est composé d'un aimant supraconducteur, d'un générateur de fréquence créant le champ radiofréquence d'excitation (B_1), un détecteur et un enregistreur relié à un ordinateur.

En IRM, nous utilisons les atomes d'hydrogène. Il est très abondant dans les tissus biologiques et a un moment nucléaire fort permettant de le détecter facilement.

La particularité de l'IRM est la localisation spatiale du signal par application de champ magnétique qui induit des fréquences de précession différentes en fonction de la position des atomes. Il est alors possible de créer une image 2 ou 3D.

Relaxation longitudinale (T_1)

Au fur et à mesure que les moments magnétiques retrouvent la direction du champ statique B_0 , le signal oscillant qu'ils émettent va en diminuant, jusqu'à disparaître quand tous les moments magnétiques ont retrouvés leurs états d'énergie d'origine. Le temps que mettent les moments magnétiques nucléaires à retrouver leur alignement longitudinal est nommé temps de relaxation et est noté T_1 . En réalité, le T_1 correspond au temps mis pour retrouver 63% de l'aimantation longitudinale à l'équilibre. Le temps de relaxation T_1 est court dans les tissus tels que la substance blanche par exemple.

Relaxation transversale (T_2)

Les différents moments magnétiques vont avoir tendance à se désynchroniser (dû aux inhomogénéités du champ magnétique local). Cela se traduit par une diminution du signal lié à leur rotation synchrone au cours du temps, dit temps de relaxation T_2 . Ce temps T_2 mesure la disparition de l'aimantation transversale, c'est-à-dire de l'aimantation résultant du fait que les moments magnétiques sont synchrones dans leur rotation dans le plan transversal, perpendiculaire à B_0 , où ils ont été amenés par l'onde excitatrice oscillante B_1 .

Relaxation des spins nucléaires en présence de Mn

Les produits de contraste paramagnétiques, tels que le Mn, diminuent les temps de relaxation T_1 et/ou T_2 , autrement dit, ils accélèrent les vitesses de relaxation des aimantations tissulaires $1/T_1$ et $1/T_2$.

Le taux de relaxation d'un spin nucléaire I à proximité d'un spin nucléaire électronique S est la somme d'une contribution diamagnétique, due à la relaxation des noyaux en l'absence de composés paramagnétiques, et d'une contribution paramagnétique. La capacité d'un agent de contraste paramagnétique (tel que le Mn) à modifier le taux de relaxation est quantitativement représentée par la relaxivité (r) définie dans l'équation ci dessous (avec [Mn] en mM, r_1 en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et T_1 , T_2 en s). $1/T_1$ est proportionnel à la concentration de Mn^{2+} dans les tissus.

$$1/T_1 = 1/T_{1\text{eau}} + r_1 [\text{Mn}]$$

Les relaxivités r_1 et r_2 du Mn, sont définies par les pentes des droites des vitesses de relaxation $1/T_1$ et $1/T_2$ en fonction de la concentration. Les relaxivités dépendent du champ magnétique, de la température et du milieu dans lequel on travail.

Principe de l'imagerie élémentaire par fluorescence X excitée par le rayonnement synchrotron

L'imagerie élémentaire par fluorescence X excitée par le rayonnement synchrotron offre la possibilité d'une micro-imagerie chimique extrêmement sensible, liée à l'utilisation d'une source de rayonnement synchrotron disponible uniquement dans quelques endroits dans le monde (environ 45 centres). Les trois synchrotrons les plus grands et les plus puissants du monde dit de 3^{ème} génération sont l'APS aux Etats-Unis, Spring-8 au Japon et l'ESRF en France (Grenoble). Des synchrotrons récents tels Diamond (Angleterre), Soleil (France) ou Petra3 (Allemagne) sont également des sources de 3^{ème} génération mais plus petites.

Le rayonnement synchrotron est produit de la façon suivante (les valeurs sont celles de la machine à l'ESRF) : des électrons produits par un canon à électrons, sont d'abord accélérés dans un accélérateur linéaire (*linac*) long de 16 m qui amène les électrons jusqu'à une énergie de 200 MeV. Ils sont ensuite transférés dans un accélérateur circulaire (booster synchrotron) de 300 m de circonférence où ils sont accélérés à l'aide de cavités radiofréquences jusqu'à une énergie de 6 GeV. Ils sont alors injectés dans l'anneau de stockage, de 844 m de circonférence, dans lequel ils tournent à une vitesse proche de celle de la lumière et à énergie constante pendant plusieurs heures à l'intérieur d'une chambre à vide. Dans les parties courbes de l'anneau de stockage se trouvent des *aimants de courbures*. A leur niveau, le faisceau d'électrons est soumis à la force de Lorentz et émet de la lumière tangentiellement à la courbure. Le rayonnement X est ainsi émis sous la forme d'un cône d'ouverture angulaire vertical très faible. L'anneau de stockage contient 64 dipôles, chacun déviant le faisceau de 5.625° . Les segments de droite (entre 2 aimants de courbure) contiennent des systèmes appelés *dispositifs d'insertion*. Ils comprennent une succession de petits aimants dont l'aimantation est alternée de façon à produire un champ magnétique dont la force et l'orientation varient périodiquement le long de la structure magnétique. Le champ magnétique alterné produit par ces aimants force les électrons à osciller autour de leur trajectoire qui reste néanmoins globalement rectiligne. Du fait que les cônes de lumière émis à chaque courbure se superposent, la lumière émise est beaucoup plus intense qu'à la sortie de l'aimant de courbure. Il existe deux types de dispositifs d'insertion à l'ESRF: les *wigglers* et les *onduleurs*. Un schéma illustrant ces différentes étapes est proposé en **Figure 84**.

Pour nos expériences, nous avons essentiellement travaillé sur des lignes à onduleur. Pour ces derniers, le cône de lumière est très fin et un phénomène d'interférence modifie le spectre de longueurs d'ondes émises, donnant un « spectre de raie », avec une brillance nettement renforcée par rapport aux aimants de courbure.

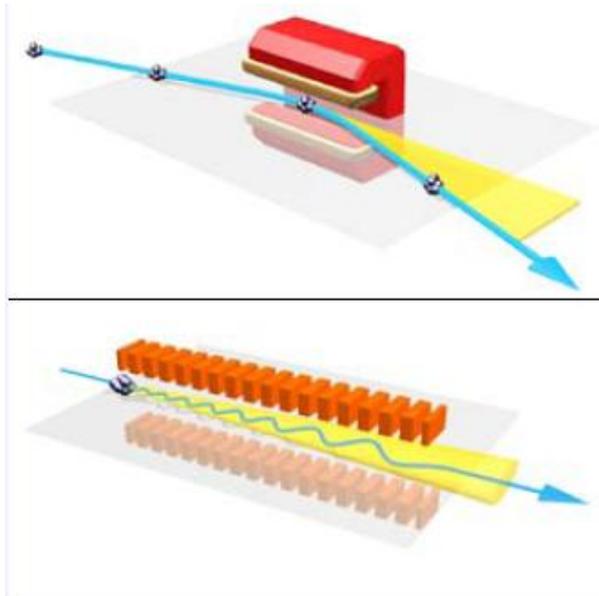


Figure 84 : Dessin du dispositif expérimental d'une ligne de lumière sur un anneau synchrotron.

Rayonnement émis par un aimant de courbure (centre) et par un élément d'insertion type onduleur (bas).

Différents modes de remplissage de l'anneau de stockage sont possibles. Les plus extrêmes sont les modes multi-paquets (plusieurs paquets d'électrons se répartissent sur la circonférence de l'anneau de stockage) et le mode mono-paquet. Le mode multi-paquets fournit un flux maximal aux lignes de lumières. Dans le mode de fonctionnement multi-paquets, l'anneau de stockage procure un courant de 200 mA pour une durée approximative de 50 h. Les énergies perdues par le faisceau d'électrons sont compensées par 6 cavités accélératrices, opérant à la fréquence de 352 MHz.

Le faisceau de lumière issu de l'onduleur passe alors par des jeux de filtres et de fentes qui permettent de moduler son intensité et modifier sa taille si nécessaire. La source est très faiblement divergente, néanmoins, à 40 m, celle-ci donne un faisceau de dimension horizontale $\sim 1,2-1,5$ mm. Un premier élément est un miroir plan en silicium permettant de filtrer les harmoniques de hautes énergies et d'atténuer la puissance délivrée par le faisceau (**Figure 85**). Le bloc de Si présente deux bandes revêtues par de fines couches de Pd ou de Pt. Le miroir peut travailler dans une gamme d'angle critique pour la réflexion spéculaire allant de 2,3 à 2,6 mrad, ce qui permet une coupure en énergie allant de 12-14 keV pour le Si, 24-26 keV pour le Pd et 32-37 keV pour le Pt. Le deuxième élément important est le monochromateur à sortie fixe qui utilise deux paires de cristaux Si(111) ou Si(311). Le premier cristal est refroidi par une boucle d'azote liquide. Ce système permet une sélection de la longueur d'onde par réflexion de Bragg. La résolution en énergie est très fine $\Delta E/E = 10^{-4}$.

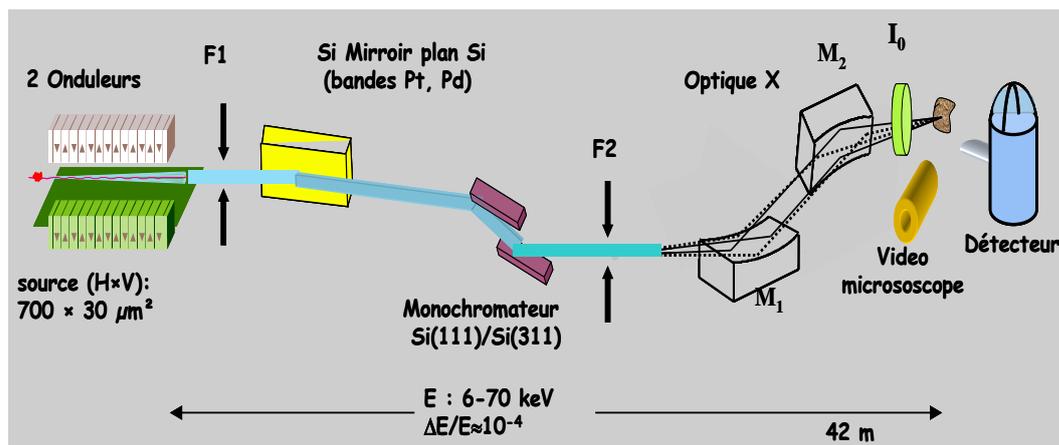


Figure 85 : Schéma de la ligne de lumière ID22 - station expérimental.

L'emploi de deux cristaux plans parallèles permet l'obtention d'un faisceau monochromatique parallèle à la direction du faisceau incident et dont la position reste inchangé lors du balayage en énergie (gamme de 1 keV pour de l'EXAFS). Le monochromateur peut être escamoté pour laisser la place à un faisceau polychromatique, aussi appelé faisceau rose (« pink beam ») qui utilise 1 à 3 % de bande passante du pic sélectionné de l'onduleur pour une très haute intensité.

Pour les applications qui nous ont intéressées, la microsonde est composée de 3 parties principales (Figure 86) : le système de focalisation dont nous avons parlé ci-dessus, les systèmes de positionnement et visualisation de l'échantillon et le système de détection.

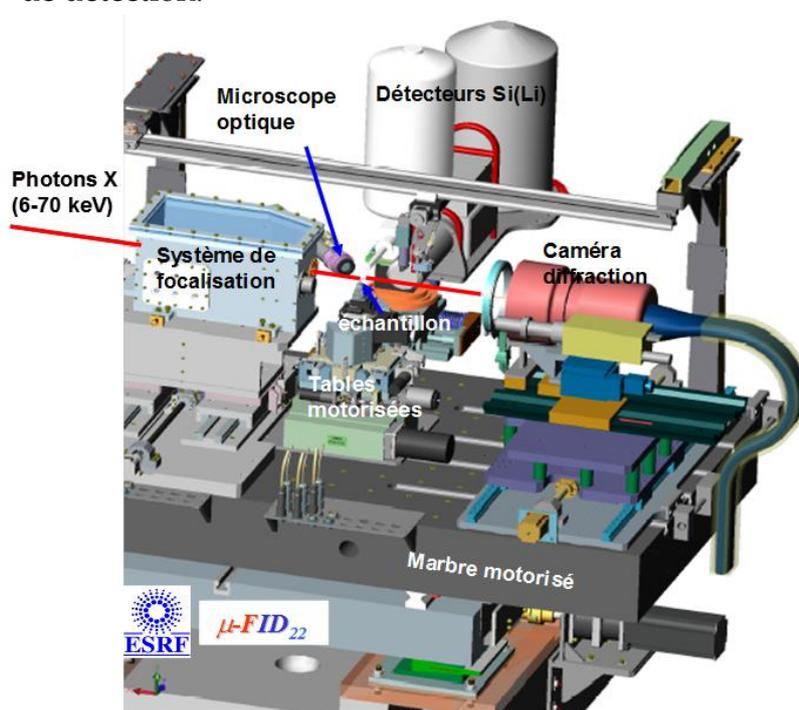


Figure 86 : Dispositif expérimental de la microsonde ID22 pour les études de microfluorescence, microdiffraction et microtomographie.

Le positionnement de l'échantillon dans le microfaisceau est obtenu par des platines motorisées (précision $< 0,1 \mu\text{m}$). Une table piézoélectrique se trouve montée dans la partie supérieure de l'assemblage mécanique et est utilisée pour réaliser les déplacements fins et rapides nécessaires à la cartographie 2D. Cette table de résolution nanométrique permet une course de 300 microns suivant les 2 axes X et Z, ainsi que l'utilisation d'un mode de balayage continu à la manière du balayage des électrons sur l'écran de télévision. La visualisation de l'échantillon se fait en ligne par le biais d'un microscope video-zoom motorisé et couplé à une caméra vidéo numérique couleur. Le champ de vue disponible va de 2 mm à 200 microns. Le microscope placé au zoom maximum est ensuite préalablement aligné dans le plan focal du microfaisceau à partir d'un objet test micrométrique, la précision de l'alignement étant de quelques microns.

Dans la gamme d'énergie qui nous intéresse, le phénomène physique prépondérant résultant d'une interaction rayonnement X/matière est l'effet photoélectrique. Il se manifeste par l'éjection d'un électron des couches internes de l'atome cible, puis, lors du réarrangement du cortège atomique, par l'émission de photons X de fluorescence caractéristiques ou d'électrons Auger (**Figure 87**).

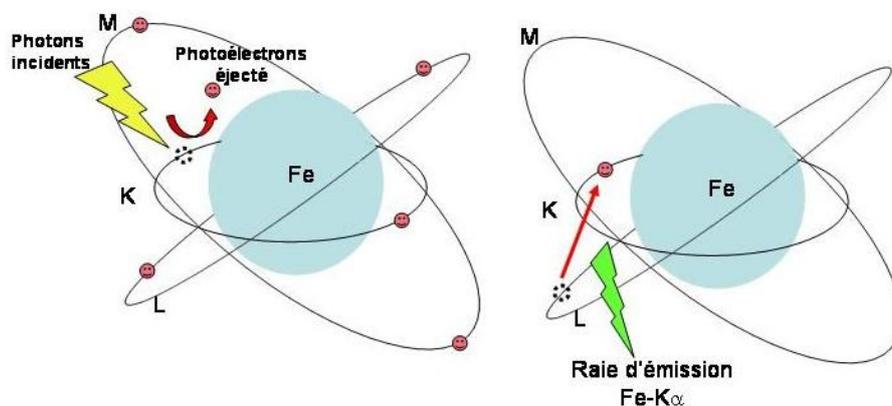


Figure 87 : Effet photoélectrique.

Un électron peut être éjecté de son orbitale par des photons incidents d'énergie $E > E_i$ son énergie de liaison. Il y a création d'une lacune (pointillés) et d'un photoélectron d'énergie $E_p = E - E_i$. La lacune électronique peut être comblée par un électron d'une couche d'énergie supérieure. L'énergie perdue par l'atome peut être dissipée notamment par un mode radiatif : la fluorescence X.

En dehors des discontinuités d'absorption, la section efficace d'ionisation par des photons peut être représentée par la relation :

$$\sigma_{\phi} \approx C Z^4 / E^3$$

Avec C constante, Z le numéro atomique de l'élément, E_0 l'énergie du photon incident et E l'énergie de liaison de la couche visée.

Quelle que soit le type de faisceau incident (des photons, protons, électrons), le spectre de fluorescence X apparaît comme des raies superposées à un fond. Ce sont les fluctuations statistiques sur ce fond qui limitent la sensibilité. La limite de détection (LD), calculée comme statistiquement crédible, est calculée en postulant que la surface (S) du pic de fluorescence doit être supérieure à 3 fois les fluctuations affectant le fond (B) sous ce pic : $LD = S/3B^{1/2}$.

Dans le cas de la microsonde synchrotron, qui utilise des photons X incident, les limites de détection sont inférieures au $\mu\text{g/g}$ de matière sèche (ppm) pour les éléments traces tels que le Fe, Cu, Zn et ce pour un faisceau de $1 \mu\text{m}^2$ et pour 1 seconde de temps d'intégration.

La détection est assurée par un détecteur semi-conducteur solide Si(Li) dispersif en énergie. Il est associé à un préamplificateur, un amplificateur et un analyseur multicanal qui va répartir chaque photon détecté dans un canal correspondant à une tranche d'énergie donnée (**Figure 88**), le plus souvent pour les réglages que nous utilisons cela correspond à $\sim 10 \text{ eV/canal}$ et nous utilisons une gamme de 2048 canaux.

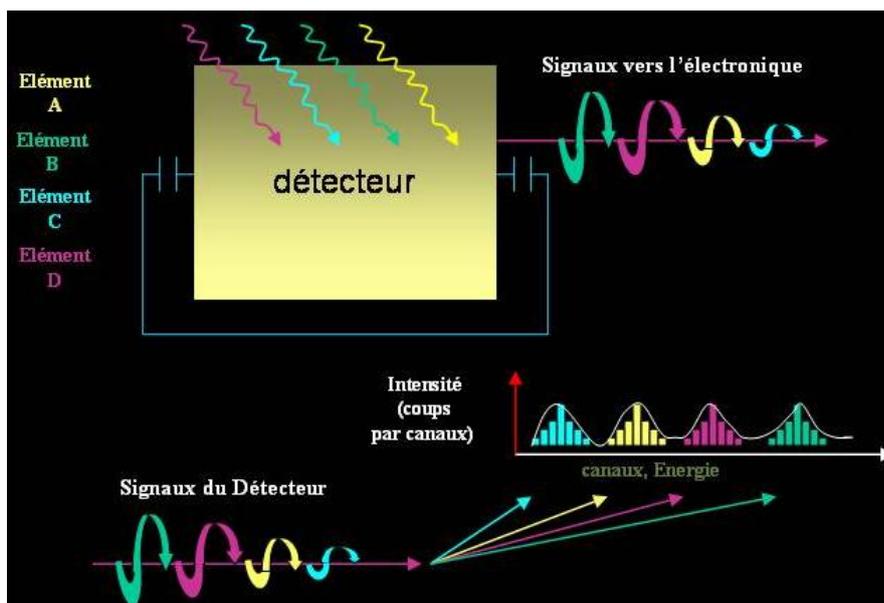


Figure 88 : Détection des photons de fluorescence.

Les photons sont émis par un échantillon composé des éléments A, B, C, D, excité par un rayonnement incident d'énergie fixe. Les événements créés au sein du cristal polarisé par une haute tension sont traités par une chaîne électronique puis triés par tranche d'énergie par un analyseur multicanal.

L'ensemble de la chaîne de détection électronique est calibré selon la gamme d'énergie que l'on aura à détecter. Le système enregistrera sur un même spectre (**Figure 89**) tous les éléments contenus dans l'échantillon et qui seront excités par le rayonnement incident d'énergie fixée par l'expérimentateur.

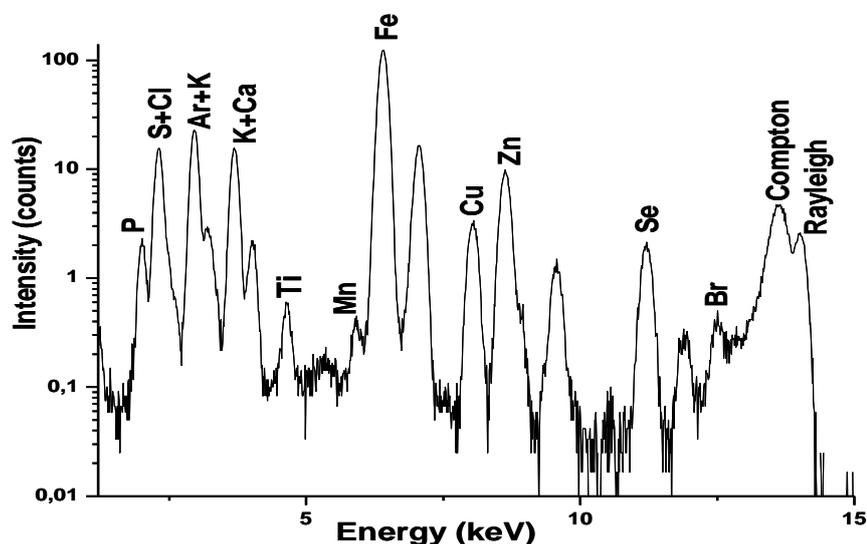


Figure 89 : Spectre somme moyen de fluorescence X obtenu à partir d'une cartographie d'une cellule neuronale.

Ce spectre somme moyenné résulte du traitement des 2500 spectres de la cartographie, chaque spectre ayant été collecté en 1 seconde.

A partir des spectres collectés en chaque point de l'échantillon, des images d'éléments sont générées ou, dans le cas de la spectroscopie X, la détection se concentre sur un élément particulier dont l'évolution est reportée en fonction de l'énergie qui est balayée par le biais du monochromateur (**Figure 90**).

Généralement pour réduire le bruit de fond dû aux photons diffusés (inélastique ou Compton et élastique ou Rayleigh) dans l'air ou du support environnant, le détecteur sera muni d'un collimateur conique d'ouverture 1-2 mm centré sur le microvolume défini par le faisceau et l'échantillon sera placé à 45° du faisceau incident.

L'angle solide de détection peut alors être augmenté en jouant sur la distance de travail du détecteur (le plus souvent 10-20 mm) et/ou sur la surface de détection. Comme on peut le constater sur la **Figure 90**, la détection ne tire parti que de quelque % du signal de fluorescence qui repose sur une émission isotrope. Les progrès récents des détecteurs SDD (silicon drift detector) qui permettent un taux de comptage extrêmement élevé (~ millions cps) et un encombrement très limité de part leur refroidissement par effet Peltier, sont très largement utilisés actuellement.

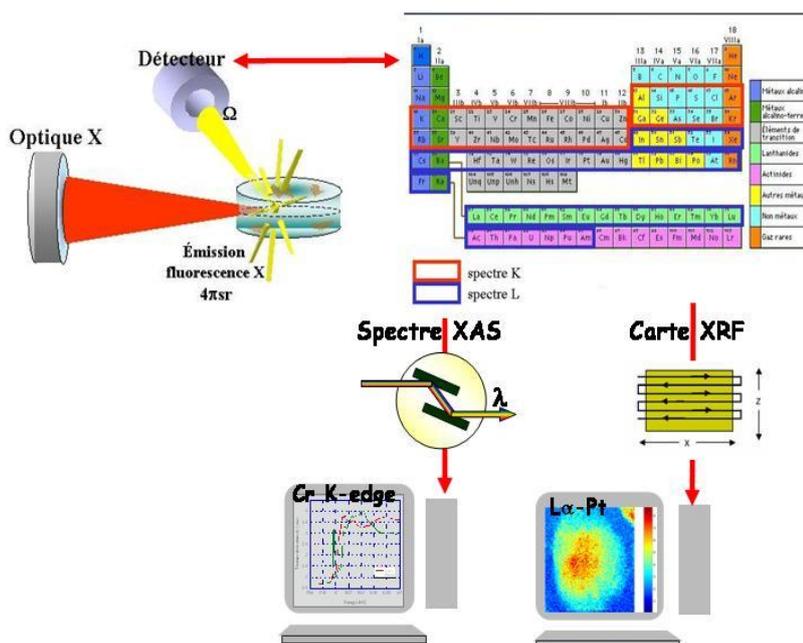


Figure 90 : Schéma descriptif de la collection des données pour la réalisation de cartographie par fluorescence X et de spectroscopie d'absorption par rayons X.

On note qu'une petite fraction (quelques %) du signal de fluorescence, émis de manière isotrope, est collectée par le détecteur dans un angle solide. La gamme d'énergie de la microsonde ID22 permet d'accéder à la détection de tous les éléments de $Z > 23$ soit en utilisant leur spectre X des raies K ou L. Les cartes de fluorescence X sont générées par balayage continu de l'échantillon devant le faisceau focalisé.

Travaux annexes réalisés

I. Etude IRM de la perfusion cérébrale par une technique d'ASL après injection de Mn

Ce projet (en cours), consiste à évaluer l'influence des variations du T1 sur les mesures de perfusion cérébrale. Le T1 est un des paramètres des équations de quantifications utilisées pour calculer le flux sanguin cérébral (CBF) à partir de mesure ASL. Des variations du T1 peuvent être observées dans certains cas (oedème, tumeur, AVC...), pouvant ainsi influencer les mesures du CBF. Dans cette étude, nous injectons du MnCl₂ par voie IC chez le rat sain, dans le but d'induire une variation du T1. Des mesures de perfusion cérébrale sont ensuite réalisées afin de caractériser l'influence des variations du T1 sur les mesures du CBF.

Ce projet est mené par Clément Debacker (doctorant, équipe 5, GIN) et dirigé par Emmanuel Barbier et Jan Warnking (CR, équipe 5, GIN).

Nous avons joint, ci-après le résumé soumis à l'ISMRM (work shop perfusion, 2012), intitulé « Impact of tissue T1 on perfusion measurement obtained with ASL », qui donnera lieu à un oral.

II. Etude de la modulation des dysfonctions mitochondriale par l'érythropoïétine (EPO) après un traumatisme crânien diffus.

Des études récentes démontrent que l'inhibition de l'ouverture du mPTP (voire chapitre 4) permet de maintenir l'intégrité mitochondriale ainsi que l'homéostasie du Ca, réduisant ainsi l'induction de l'apoptose. Il est connu que l'érythropoïétine recombinante humaine (rhEPO) a un effet neuroprotecteur sur les modèles animaux de traumatisme. La prévention de l'apoptose par l'EPO via le mPTP suite à un traumatisme crânien (traumatic brain injury, TBI) n'est pas encore connue. Dans ce travail, des rats TBI ont été traités avec ou sans EPO. Des mesures de la CRC mitochondriale (voire chapitre 4) et des marquages immunofluorescent de la caspase-3 (marqueur de l'apoptose) ont été effectuées à partir des tissus des animaux TBI traités ou non. Nous avons montré une augmentation de la CRC suite au traitement avec EPO ainsi qu'une diminution du marquage caspase-3. Ces résultats suggèrent que les effets protecteurs de l'EPO pourraient être médiés par une inhibition du mPTP.

Ce projet est mené par Anne Millet (pédiatre, CHU Grenoble, équipe 5, GIN) et dirigé par Jean François Payen (PU-PH, CHU Grenoble, équipe 5, GIN).

Nous avons joint, ci-après, le résumé soumis à la SFAR 2012, intitulé « Effet de l'Erythropoïétine sur la dysfonction mitochondriale post traumatique », qui a donné lieu à un poster.

Le travail est en cours de rédaction pour publication.

Impact of tissue T_1 on perfusion measurement obtained with ASL

C.Debacker^{1,2,3}, A.Daoust^{1,2}, J. Warnings^{1,2}, J. Voiron³, E.L.Barbier^{1,2}

¹Grenoble Institut des Neurosciences, Université Joseph Fourier, Grenoble, France, ²U836, Inserm, Grenoble, France, ³Bruker Biospin MRI, Ettlingen, Germany

Target audience: MRI Methodologists.

PURPOSE: In the existing equations for Arterial Spin Labelling (ASL) quantification, some uses a tissue T_1 map and some do not. In this study, we evaluate the effect of a change in tissue T_1 on the cerebral blood flow (CBF) estimated with ASL. To modify brain T_1 , we injected a low dose of Mn^{2+} . This contrast agent enters cells [1] which yields a tissue T_1 stable during the ASL measurement.

METHODS: Anesthetized (isoflurane) rats (male wistar, 241 ± 12 g) received an 80nL intra-cerebral injection (S1 cortex) of either Mn^{2+} diluted in tris-HCL (group A, n=5) or tris-HCL only (group B, n=5) (injection speed: 8nl/min). Six hours after injection, MRI was performed on a 7T horizontal scanner (Bruker Biospec 70/20 USR AV III) with a volume transmit/surface receive coil configuration. A MDEFT sequence was performed to delineate the Mn enhanced area (Fig.1). The subsequent images were acquired with an EPI sequence (64x64 matrix in 3x3cm FOV). ASL was performed with a continuous ASL scheme (Spin-echo EPI, TE=17.2ms, Labeling duration: $\tau=4$ s, postlabeling delay: $\omega=0.2$ s, 30 pairs). A T_1 -map was acquired with selective inversion and EPI acquisition (18 inversion times). To ensure that Mn does not perturb the tissue perfusion, a dynamic susceptibility contrast (DSC) protocol was performed (Gradient-echo EPI, TE=15ms, TR=250ms, 300 dynamics, Gd-DOTA: 0.2mmol/kg.). To obtain CBF from ASL data, we used Eq.1, which accounts for tissue T_1 [2], and Eq.2

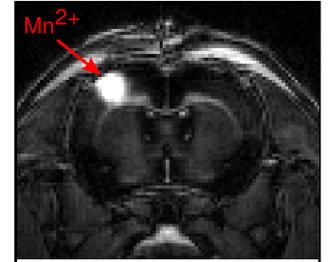


Fig. 1: T_1 -weighed MDEFT sequence.

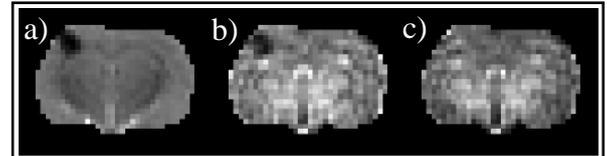


Fig. 2: a) Map of T_1^{app} b) CBFwo map calculated with Eq.2 c) CBFw map calculated with Eq.1

$$CBF^w = \frac{\Delta M \lambda}{2\alpha M_0 T_1^{app}} \quad (1) \quad \left| \quad CBF^{wo} = \frac{\Delta M \lambda \exp(\omega/T_1^b)}{2\alpha M_0 T_1^b (1 - \exp(-\tau/T_1^b))} \quad (2)$$

which does not [3]. To analyze the DSC data, we fitted the change in R_2^* over time with a gamma-variate function.

ΔM is the signal difference between control and label acquisitions, λ is the blood/tissue water partition coefficient (0.9ml/g), α is the labeling efficiency (0.76), M_0 is approximated by the control image intensity, T_1^{app} is the apparent longitudinal relaxation time, T_1^b is the longitudinal relaxation time of blood (2.1s). For each animal, two cortical regions of interest were manually drawn: the Mn enhanced area and its contralateral counterpart.

RESULTS: Fig.3a shows a significant reduction in tissue T_1 after Mn injection (Mn: $T_1^{app} \approx 1081 \pm 150$ ms versus control: $T_1^{app} \approx 1610 \pm 20$ ms). Fig.3b shows CBF values obtained with Eq.2. The CBF in the Mn injected area is lower than in all control situations. This is no longer true when tissue T_1 is accounted for (Eq. 1) (Fig. 3c). The later result is in agreement with Fig.3d, which shows that the mean transit time (MTT) is constant across all situations. In addition, the Tris-HCL injection had no impact on tissue perfusion (Fig.3).

DISCUSSION: This study demonstrates that tissue T_1 has a strong impact of the CBF estimates obtained with ASL and should therefore be accounted for, especially in pathological situations. The results also suggest that Eq.1 properly accounts for this impact and yields robust CBF estimates in case of tissue T_1 variation.

CONCLUSION: A change in tissue T_1 has a strong impact on CBF estimated with ASL. Using Eq.1 properly accounts for this effect.

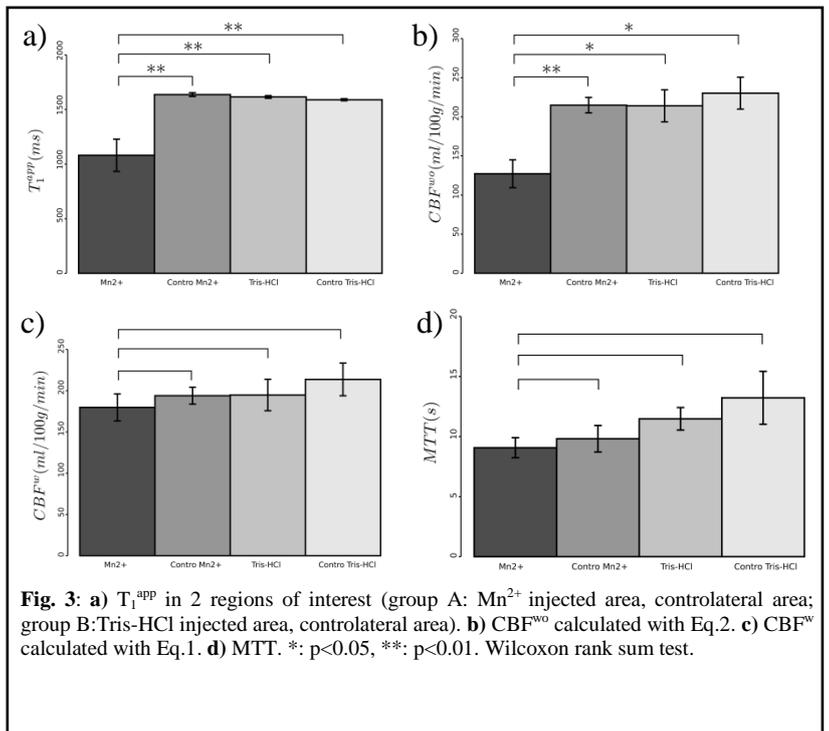


Fig. 3: a) T_1^{app} in 2 regions of interest (group A: Mn^{2+} injected area, controlateral area; group B: Tris-HCL injected area, controlateral area). b) CBF^{wo} calculated with Eq.2. c) CBF^w calculated with Eq.1. d) MTT. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$. Wilcoxon rank sum test.

REFERENCES: 1. Lin YJ, Koretsky AP. Magn Reson Med. 1997; 38(3):378-388. 2. Alsop DC, Detre JA. J. Cereb. Blood Flow Metab. 1996; 12(6):1236-1249. 3. Wang J, Alsop DC, Li L et al. Magnetic Resonance in Medicine. 2002 ; 48(2) :242-254.

Effet de l'Erythropoïétine sur la dysfonction mitochondriale post traumatique

A. Millet^{1,2,*}, P. Bouzat^{2,3}, C. Batandier⁴, A. Daoust², R. Farion², L. Gaide Chevronnay³, E. Barbier², T. Debillon¹, E. Fontaine^{4,5}
et J. F. Payen^{2,3}

¹Réanimation Pédiatrique, Hôpital Couple Enfant, CHU Grenoble, France, ²INSERM U836 Institut Neurosciences, Grenoble, France, ³Pôle d'Anesthésie Réanimation, CHU Grenoble, France, ⁴INSERM U1055, Laboratoire de Biologie Fondamentale et Appliquée, Grenoble, ⁵Unité de Nutrition parentérale, CHU Grenoble, France

Type de soumission: Médecin

Catégorie Transversale: Réanimation/Urgences

Thème: Neurologie, neurosciences, sédation

Type d'étude: Etude expérimentale

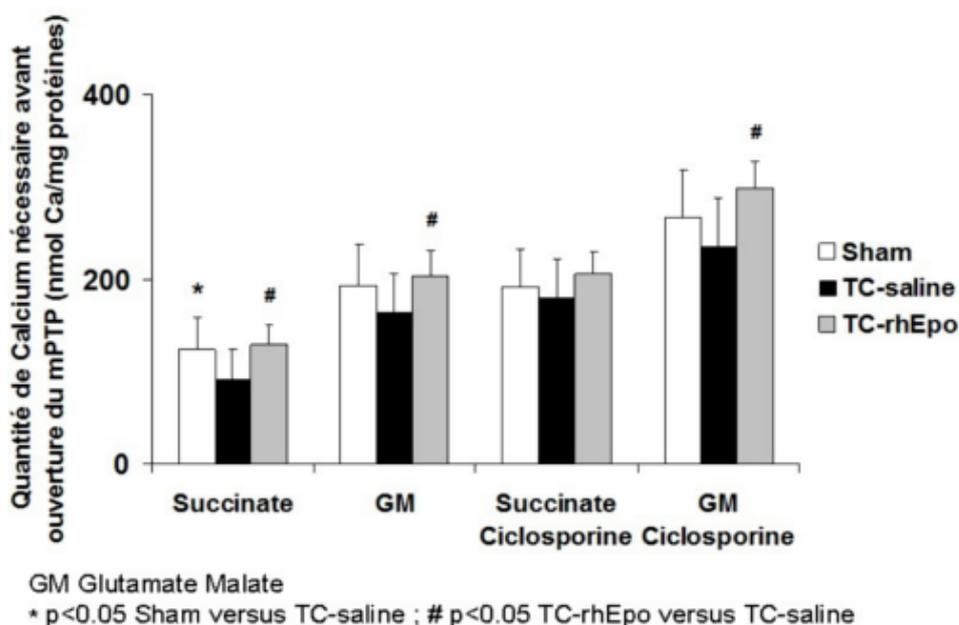
Numéro d'autorisation: 3851610008

Introduction: Des travaux récents ont démontré que l'inhibition de l'ouverture du pore de perméabilité mitochondriale transmembranaire (mPTP), en plus de maintenir le potentiel membranaire mitochondrial et l'homéostasie calcique, pouvait réduire l'apoptose cellulaire (1,2,3). Malgré une action anti apoptotique connue, l'effet de l'Erythropoïétine humaine recombinante (rhEpo) sur le mPTP après un traumatisme crânien (TC) reste inconnu à l'heure actuelle.

Matériel et Méthodes: 30 minutes après un TC diffus selon un modèle de type impact accélération, des rats Wistar mâles ont reçu soit une solution saline isotonique (TC-saline), soit 5000 UI/Kg de rhEpo IV (TC-rhEpo). Un 3ème groupe de rats ne recevait pas de TC (Sham). A 2 heures du TC, les mitochondries ont été isolées et l'étude de l'ouverture du mPTP a été obtenue par l'analyse de la capacité de rétention calcique mitochondriale (CRC) par spectrofluorimétrie, correspondant à la charge calcique minimum nécessaire pour permettre une ouverture du pore. Cette étude utilise différents substrats de la chaîne respiratoire (Succinate et Glutamate Malate) et le principal inhibiteur du mPTP, la Ciclosporine. Dans une série d'expériences concomitantes, l'étude de l'apoptose cellulaire a été réalisée à 24 heures du TC par une étude immuno histochimique de fixation de la caspase 3 cellulaire. Les résultats (moy ± SD) ont été comparés par test de Kruskal Wallis et Mann-Whitney.

Résultats: Comparés aux rats TC-saline, les rats TC-rhEpo ont présenté un seuil d'ouverture du mPTP significativement supérieur avec l'utilisation du Succinate comme substrat ($129,1 \pm 22,5$ versus $92,7 \pm 31,3$ nmol calcium/mg protéines, respectivement, $p < 0,05$), ainsi qu'une réduction de l'expression de la caspase 3 ($8,8 \pm 1,2$ versus $13,6 \pm 2,6\%$, respectivement, $p < 0,01$).

Image:



Discussion: Ces résultats sont en faveur d'un effet anti-apoptotique de la rhEpo pouvant passer par le biais d'une modulation de l'ouverture du mPTP et d'une régulation de l'homéostasie mitochondriale. Cette étude confirme les propriétés neuroprotectrices de la rhEpo et renforce le rationnel conduisant à étudier le mPTP comme cible thérapeutique potentielle dans le cadre d'un TC expérimental.

Références: 1. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006 Nov;26(11):1407-18 2. *Neurol Res.* 2009 Jun; 31(5): 496-502 3. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2008 Jul;35, 812–819

Liste des publications et communications

Liste des articles se rapportant à la thèse

Daoust A., Barbier E. L. and Bohic S. Distribution of Mn in rat hippocampus: A correlative study between MEMRI and Synchrotron X-Ray Microprobe, *NeuroImage*, *in press*.

Daoust A., Bohic S., Collomb N., Saoudi Y., Andrieux A. and Barbier E. L.. Subcellular distribution of Mn in neurons assessed by synchrotron X-ray Microprobe, *Manuscript in preparation*.

Autres articles et livre

Bohic S., Hare D., **Daoust A.**, Cloetens P and Barbier E. L. Chapter "Spatially resolved imaging methods to probe metals in the brain: from sub-cellular to organ level", in "Metal ions in Neurological systems"; Linert W. and Kozlowski H (Eds.). Springer edition, 400p. *In Press*, ISBN 978-3-7091-1000-3.

Millet A., Bouzat P., Batandier C., **Daoust A.**, Farion R., Barbier E., Debillon T., Fontaine E., Payen J.F. Erythropoietin modulates mitochondrial dysfunction after disuse traumatic brain injury, *Submitted*.

Tang S., Verdurand M., Joseph B., Lemoine L., **Daoust A.**, Billard T., Fournet G., Le Bars D., Zimmer L. (2007) Synthesis and biological evaluation in rat and cat of [18F]12ST05 as a potential 5-HT₆ PET radioligand. *Nuclear medicine and biology*, 34 : 995-1002.

Communications orales

C. Debacker, **A. Daoust**, J. Warnking, J. Voiron and E. L. Barbier. Impact of tissue T1 on perfusion measurement obtained with ASL. ISMRM workshop on perfusion MRI 2012, Amsterdam (Pays Bas).

A. Daoust, E. L. Barbier, A. Andrieux, S. Bohic and J.C. Deloulme. Evaluation of functional connectivity in a cold-microtubule deficient mice using manganese enhance magnetic resonance imaging in vivo. 20ème congrès annuel de l'ISMRM 2012, Melbourne (Australie).

A. Daoust, E. L. Barbier, S. Bohic, S. Maunoir-Regimba and F. Fauvelle. Effect of manganese chloride on rat hippocampus metabolism studied by proton HRMAS NMR. SFRMBM 2012, Marseille (France).

A. Daoust, E. L. Barbier, S. Bohic. Mn Distribution in rat hippocampus: Correlative use of Synchrotron X-Ray Microprobe and MEMRI. ISMRM 2011, Montréal (Canada).

A. Daoust, S. Bohic et E. L. Barbier. Distribution sub-cellulaire du Mn dans les neurones évaluée par imagerie synchrotron. RITS 2011, Rennes (France).

Communications affichées

A. Daoust, E. L. Barbier, S. Bohic, S. Maunoir-Regimba and F. Fauvelle. Effect of manganese on rat hippocampus metabolism studied by proton HRMAS NMR. ESMRMB 2012, Lisbonne (Portugal).

A. Millet, P. Bouzat, C. Batandier, **A. Daoust**, R. Farion, L. Gaide Chevronnay, E. Barbier, T. Debillon, E. Fontaine, J. F. Payen. Effet de l'érythropoïétine sur la dysfonction mitochondriale post traumatique. SFAR 2012, Paris (France).

A. Daoust, E. L. Barbier, A. Andrieux, Y. Saoudi, S. Bohic, and J. C. Deloulme. Evaluation of functional connectivity in a cold-microtubule deficient mice using manganese enhance magnetic resonance imaging in vivo. SFRMBM 2012, Marseille (France).

A. Daoust, S. Bohic, E. L. Barbier. Subcellular distribution of Mn in neurons assessed by synchrotron X-ray Microprobe. ISMRM 2011, Montréal (Canada).

A. Daoust, E. L. Barbier, S. Bohic. Distribution du Mn dans l'hippocampe de rat: couplage de l'imagerie IRM du manganèse (MEMRI) avec l'imagerie microsonde synchrotron. RITS 2011, Rennes (France).

Curriculum vitae

Neurobiologiste, spécialisée en imagerie moléculaire

Formation

2009-2012 Thèse de physique pour les sciences du vivant, Université Joseph Fourier (UJF) - Grenoble, France

2007-2009 Master de Neurobiologie, Université Claude Bernard (UCBL) - LYON 1, France

2006-2007 Licence professionnelle en physiologie et physiopathologie animale - Grenoble, France

2004-2006 BTS Biochimie - LYON 1, France

Expériences Professionnelle

2009-2012 Doctorat en imagerie moléculaire - Grenoble Institut des neurosciences - Inserm U836, France

Sujet : IRM du manganèse (MEMRI) : couplage à l'imagerie chimique par microsonde synchrotron pour optimiser l'imagerie fonctionnelle du transport neuronal

Techniques: MEMRI/IRM chez le rongeur sur un aimant 7T Bruker, chirurgie stéréotaxique, imagerie à fluorescence X au « European Synchrotron Radiation Facility » (ESRF-Grenoble), immuno-fluorescence et -histologie, culture cellulaire animale, microscopie optique/fluorescence, extraction de mitochondries de cellules et cerveau, détermination de la capacité de rétention calcique mitochondriale, RMN-Hrmas.

Directeurs: Dr. E. BARBIER and Dr. S. BOHIC

2008-2009 Stage de master recherche en neurobiology - CERMEP, Bron Hôpital, France

Sujet : peptides β -amyloïde (1-40) et neurotransmission sérotoninergique 5-HT_{1A}

Techniques: chirurgie stéréotaxique, travail sur model de rat Alzheimer, autoradiographie *in vitro*, immunohistologie, hybridation *in situ*

Directeur : Pr L. ZIMMER

2008 Stage de master 1 - Laboratoire de neuropharmacologie CNRS 3006, université Lyon 1, France

Sujet : Etude comportementale de l'effet de la p-EPA, un inhibiteur de la tryptophane hydroxylase.

Techniques: Comportement du rat, test du labyrinthe en croix surélevé et de Porsolt (nage forcée)

Directeur : Dr. L. LAMBAS SENAS

2006-2007 Contrat d'apprentissage d'un an - CERMEP, Hôpital de Bron, France

Sujet : Validation préclinique de nouveaux radiotraceurs sérotoninergique PET
Techniques: Chirurgie stéréotaxique, autoradiographie *in vitro* et *ex vivo*,
 microdialyse, cinétique radioactive, PET clinique chez le chat, microPET chez le
 rat

Directeur : Pr L. ZIMMER

Encadrement d'étudiants

- ☞ Etudiants en Master : Violaine Hubert « Influence de Mn sur le phénotype neuronal »
 (Mars-Juin 2012)
 Mathilde Maisonnette "Etude de l'influence du Mn sur la
 capacité de rétention calcique mitochondriale" (Mars-Mai 2011)
- ☞ Etudiant en BTS : Jennifer Carraud, "Développement d'une technique d'imagerie
 IRM du manganèse : étude de la toxicité du Mn à son
 application » (Mai-Oct 2011)

Compétences

Langues *Français* (langue natale), *Anglais* : niveau scientifique, *Espagnol* : à réactiver

Informatics Image J, MetaVue, MetaMorph, Microsoft Office, notion de Matlab

Animal Niveau I d'experimentation animal
 Diplôme de chirurgie animal

Services académiques et associatifs

- ☞ Membre du comité d'éthique local (1an)
- ☞ Réalisation et publication d'un livret sur le sommeil pour la fête de la science 2010 et 2011
 (5 pages, édition en 500 exemplaires).
- ☞ Participation à l'association "remue méninges" 2011 ayant pour but d'intéresser les
 enfants à la science.
- ☞ Membre de l'association des Neurodocs (groupe de doctorant de l'institut des
 neurosciences de Grenoble).
- ☞ Organisation des "Neurodocs Hebdo" (présentation hebdomadaire d'un sujet de thèse).

