



**HAL**  
open science

**Cartographie in vivo des remaniements  
anatomo-fonctionnels de l'architecture des réseaux  
neuronaux dans le système nerveux central au cours du  
développement par Imagerie du Tenseur de Diffusion et  
Imagerie renforcée par le manganèse**

Damien Dupont

► **To cite this version:**

Damien Dupont. Cartographie in vivo des remaniements anatomo-fonctionnels de l'architecture des réseaux neuronaux dans le système nerveux central au cours du développement par Imagerie du Tenseur de Diffusion et Imagerie renforcée par le manganèse. Autre [cond-mat.other]. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112021 . tel-00817187

**HAL Id: tel-00817187**

**<https://theses.hal.science/tel-00817187>**

Submitted on 1 Dec 2014

**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.

ÉCOLE DOCTORALE : *Sciences et Technologies de l'Information des  
Télécommunications et des Systèmes*

Imagerie par Résonance Magnétique Médicale et Multi-Modalités

*Physique*

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 08/02/2013

par

**Damien DUPONT**

**Cartographie in vivo des remaniements anatomo-  
fonctionnels de l'architecture des réseaux  
neuronaux dans le système nerveux central au cours  
du développement par Imagerie du Tenseur de  
Diffusion et Imagerie renforcée par le manganèse**

**Directeur de thèse :**

Brigitte Gillet

Directeur de Recherche (IR4M : Orsay)

**Composition du jury :**

*Président du jury :*

Jean-Claude Beloeil

Directeur de Recherche (CBM : Orléans)

*Rapporteurs :*

Emmanuel Barbier

Directeur de Recherche (Gin : Grenoble)

Jean-Michel Franconi

Professeur (RMSB : Bordeaux)

*Examineurs :*

Luc Darrasse

Directeur de Recherche (IR4M : Orsay)

Isabelle Loubinoux

Directeur de Recherche (ICHN : Toulouse)



Je tiens en premier lieu à remercier les membres du jury : Monsieur Jean-Michel Franconi et Monsieur Emmanuel Barbier qui ont eu la gentillesse et m'ont fait l'honneur d'accepter la lourde tâche d'être rapporteur. Merci à Monsieur Jean-Claude Beloeil, Monsieur Luc Darrasse, Monsieur Mathias Hoehn et Madame Isabelle Loubinoux qui ont accepté de faire partie de la commission d'examen.

Je remercie tout d'abord Brigitte Gillet pour m'avoir accueilli lors de mon stage de master 2 puis lors de ces trois années de thèse.

Thanks to Pr. Mathias Hoehn and all of his research team at the Max Plank Institut for neurological research in Cologne for the six wonderful months I spend working on their brand new 9.4T.

Je tiens à remercier l'IR4M dans son ensemble pour leur accueil et plus particulièrement l'équipe du 104 avec qui j'ai passé trois superbes années.

Un grand merci à Brigitte Gillet et Catherine Sébrié pour m'avoir supporté pendant presque quatre ans et plusieurs dizaines d'opérations. Merci Chrystelle pour le temps passé à prouver que l'un ou l'autre avait raison. Merci Aurore pour nos discussions et pour avoir été mon acolyte de congrès. De façon générale, merci à vous toutes pour votre soutien.

Merci à Georges et Jean-Pierre pour leur disponibilité à toute épreuve.

Je remercie ma famille pour leur soutien constant et inconditionnel ainsi que Damien, Vivian, Myriam, Jeremy, Cedric et les autres pour les heures passées loin de la science et de ses questions.

Enfin, merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ma thèse ...



<b><u>Introduction générale</u></b>	<b><u>p1</u></b>
<b><u>Chapitre I : Introductions</u></b>	<b><u>p3</u></b>
-Partie 1 : Ischémie cérébrale du nouveau-né	p5
-Partie 2 : Imagerie par contraste renforcé par le Manganèse	p15
-Partie 3 : IRM de diffusion	p21
-Partie 4 : Séquence d'imagerie	p39
<b><u>Chapitre II : Etude de l'impact d'une ischémie focale transitoire sur le cerveau de rat en développement</u></b>	<b><u>p51</u></b>
-Partie 1 : Introduction	p53
-Partie 2 : Lésion ischémique	p63
-Partie 3 : Imagerie renforcée par le manganèse	p69
-Partie 4 : Imagerie du tenseur de diffusion	p91
-Partie 5 : Discussion et conclusion	p103
<b><u>Chapitre III : Tractographie</u></b>	<b><u>p109</u></b>
-Partie 1 : Comparaison de l'imagerie Q-ball et de l'imagerie du spectre de diffusion	p111
-Partie 2 : Etude préliminaire chez le rat nouveau-né	p137
<b><u>Conclusion Générale</u></b>	<b><u>p145</u></b>
<b><u>Bibliographie</u></b>	<b><u>p147</u></b>
<b><u>Abréviations</u></b>	<b><u>p155</u></b>
<b><u>Annexes</u></b>	<b><u>p157</u></b>
-1 : Résultats MEMRI	p159
-2 : Résultats DTI	p160



## **Introduction générale**

L'Imagerie par Résonance Magnétique est un outil très puissant pour la recherche biomédicale. Le développement d'une multitude de techniques permet désormais l'étude de phénomènes biologiques complexes, *in vivo* et de manière non invasive.

L'objectif de mes travaux de thèse est d'étudier le développement cérébral du rat nouveau-né dans le cas de rats sains mais aussi dans un cas pathologique. Nous avons choisi d'étudier l'ischémie focale transitoire chez le rat nouveau-né. Ces types de modèles précliniques sont effectivement d'un grand intérêt pour les néonatalogistes dans l'étude des phénomènes entourant les différents types de pathologies périnatales liées à l'apport sanguin cérébral.

Nous avons décidé d'utiliser principalement deux techniques d'imagerie IRM : L'imagerie renforcée par le manganèse (MEMRI) et l'imagerie de diffusion.

Le MEMRI a été mis en œuvre pour étudier l'impact d'une ischémie transitoire corticale sur le tractus cortico-thalamique. Pour ce faire nous avons développé un protocole d'acquisition et de traitement de données nous permettant une évaluation dynamique du transport du manganèse entre le site d'injection corticale et différents noyaux thalamiques.

L'imagerie de diffusion a aussi été utilisée pour l'étude de l'ischémie afin d'apporter des informations structurelles complétant les informations d'ordre fonctionnel obtenues par MEMRI. Dans ce but nous avons choisi d'utiliser l'imagerie du tenseur de diffusion (DTI).

Dans un second temps nous nous sommes focalisés sur les possibilités de traçage de fibres neuronales : la tractographie, liée à l'imagerie de diffusion. L'un des principaux intérêts de l'IRM chez le petit animal par rapport à d'autres techniques d'imagerie est la possibilité de réaliser des études précliniques longitudinale. Nous avons donc choisi de comparer, dans des conditions compatibles avec une étude longitudinale d'animaux pathologiques, les deux principales techniques d'imagerie de diffusion utilisées pour la tractographie : l'Imagerie du spectre de diffusion (DSI) et le l'Imagerie Q-ball (QBI). Pour cette étude comparative nous nous sommes focalisés sur la variabilité de différents paramètres obtenus grâce à ces deux techniques afin de déterminer leurs performances en termes de reproductibilité, point important de toute étude longitudinale.

Les résultats obtenus nous ont permis de réaliser les premiers tests de tractographie *in vivo* chez le rat nouveau-né.

Organisation du manuscrit :

Le premier chapitre est consacré à l'introduction des différentes procédures et méthodes utilisées lors de ces travaux : l'ischémie cérébrale du rat nouveau-né, l'imagerie renforcée par le manganèse, l'imagerie de diffusion ainsi que les différentes séquences d'imagerie utilisées.

Le second chapitre porte sur l'étude principale de cette thèse : l'ischémie focale transitoire chez le rat nouveau-né.

Enfin, le troisième chapitre est dédié à la tractographie par imagerie de diffusion, regroupant la comparaison DSI / QBI et les premiers résultats de tractographie *in vivo* chez le rat nouveau-né.

**Chapitre I :**  
**Introductions**



## **Partie 1 : Ischémie cérébrale du nouveau-né**

Chez les nouveau-nés humains, l'asphyxie périnatale compliquée d'une hypoxie-ischémie reste la source d'une mortalité élevée et de lésions neurologiques graves et définitives (déficit visuel, épilepsie, infirmité motrice cérébrale, surdité, retard mental). Pour les néonatalogistes, il est primordial de pouvoir apprécier très rapidement la gravité de l'atteinte cérébrale post-natale, qu'il s'agisse d'un Accident Vasculaire Cérébral (AVC) ou d'une Encéphalopathie Néonatale Hypoxo-Ischémique (ENHI).

Pour pouvoir décrire les processus biologiques induits lors de ces atteintes cérébrales et mener des études pharmacologiques appropriées, des modèles d'ischémie ont été développés chez des rats de 7 jours (P7) dont le cerveau est à un stade de maturité proche de celui des nouveau-nés humains.

Dans cette partie, après avoir succinctement rappelé les processus généraux intervenant après une ischémie cérébrale transitoire, nous nous intéressons plus particulièrement au cas des accidents périnataux.

### Ischémie

D'une manière générale l'ischémie est définie comme la réduction de la vascularisation artérielle au niveau d'une zone d'un tissu ou d'un organe. Les principales causes d'ischémie sont : l'obstruction par embolie ou thrombose, l'hémorragie en amont sur la chaîne artérielle, la baisse importante de la pression sanguine ainsi que le pincement (externe ou interne) d'une artère.

Suivant l'importance et la durée de cette réduction, les conséquences sur le tissu vont de la récupération totale (ischémie peu profonde et de courte durée) jusqu'à la mort cellulaire généralisée.

### Conséquences d'une ischémie cérébrale transitoire

Le cerveau tire principalement son énergie de l'oxygène et du glucose. La diminution du flux sanguin au niveau du tissu cérébral va donc compromettre son équilibre métabolique. En effet le cerveau ne possède que très peu de réserve énergétique et est donc très sensible à toute



baisse d'apport en glucose ou en oxygène. Ainsi l'impossibilité, pour le tissu cérébral, de maintenir son métabolisme va entraîner une chaîne de réactions aboutissant à la lésion ischémique [Dirnagl et al. 1999]. Dans un premier temps, le manque d'apport en O<sub>2</sub> et la consommation rapide de l'adénosine triphosphate (ATP) va activer la glycolyse anaérobie, consommant le glycogène intracellulaire et diminuant le pH intracellulaire par formation de lactate. Une fois cette réserve énergétique à court terme épuisée, les cellules ne disposent plus d'énergie et les fonctions nécessitant de l'énergie cessent de fonctionner. En particulier, les pompes ioniques "ATP dépendantes" s'arrêtent empêchant le maintien des gradients ioniques. Se produisent alors un relargage de glutamate par les cellules, des influx importants d'ions calcium (Ca<sup>2+</sup>) et sodium (Na<sup>+</sup>) dans ces cellules et une dépolarisation des neurones. L'augmentation de la concentration intracellulaire d'ions Na<sup>+</sup> va provoquer un gonflement cellulaire par osmolarité : l'*œdème cytotoxique* [Qiao et al. 2002]. L'influx d'ions Ca<sup>2+</sup> va déclencher l'activation d'enzymes "Ca<sup>2+</sup> dépendantes" formant des radicaux libres capables d'altérer l'ADN, les lipides, les protéines et les sucres. Ces radicaux libres sont aussi impliqués dans la destruction locale de la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE). Une rupture de la BHE permet l'entrée d'eau et de protéines du sang au niveau de l'espace extracellulaire cérébral : c'est l'*œdème vasogénique* [Tuor et al. 1998 ; Qiao et al. 2001]. Par ailleurs, ces radicaux libres vont entraîner des morts cellulaires par nécrose et apoptose.

### Ischémie et mort cellulaire

Au niveau cellulaire, un certain nombre de processus délétères coexistent lors d'une ischémie.

A court terme, les cellules dont le métabolisme se trouve complètement bloqué mourront par *nécrose*. Il y a alors rupture de la membrane plasmique et libération du contenu cytoplasmique dans l'espace extracellulaire, entraînant une réponse inflammatoire du tissu.

Certaines cellules entreront en *apoptose* (mort programmée). Ce processus nécessite de l'énergie et n'aura lieu que pour les cellules situées dans des zones où les atteintes ischémiques sont plus faibles et susceptibles d'être reperfusées. Pour ces cellules qui récupèrent un minimum de capacité de production énergétique lors de la reperfusion, l'apoptose serait déclenchée par la surcharge calcique induite par l'ischémie.

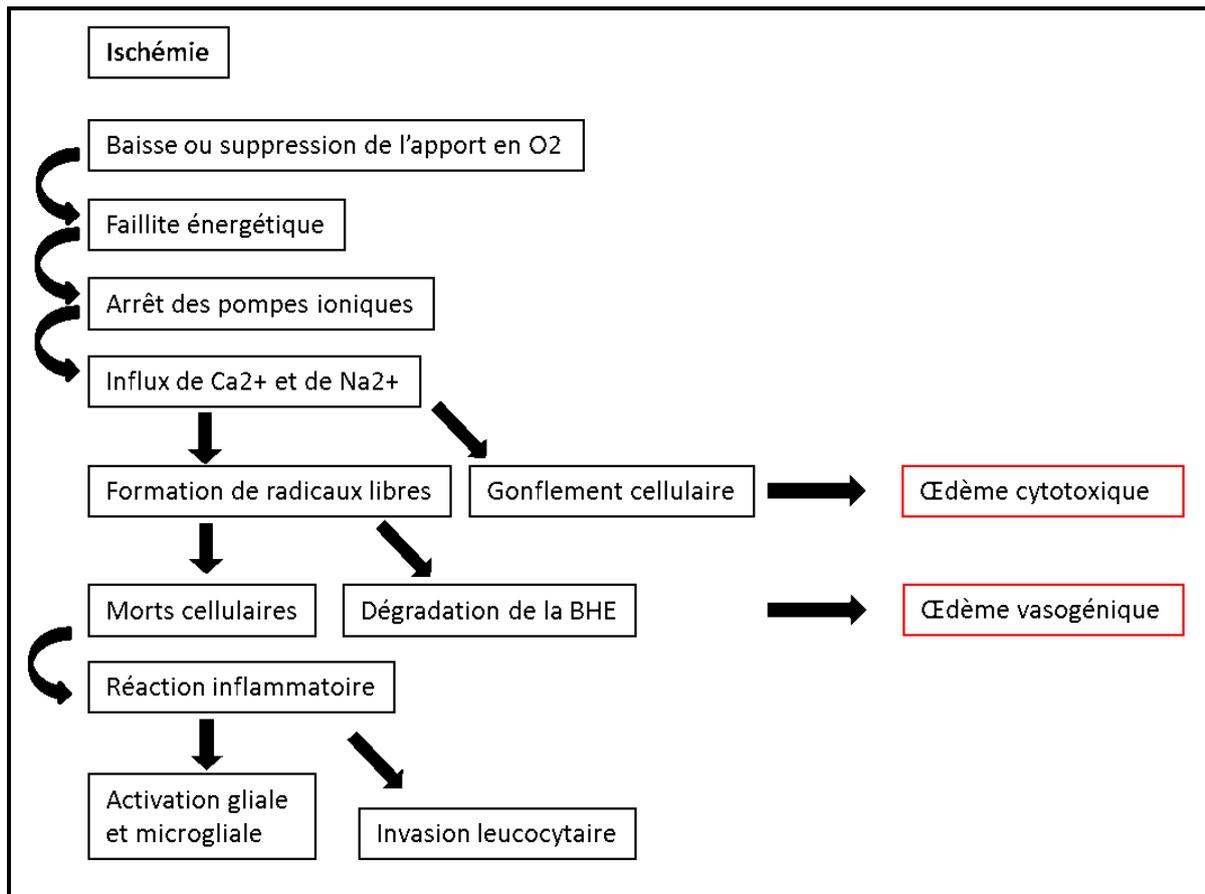


Figure 1 : Schéma de la cascade d'évènements liés à une ischémie cérébrale.

Enfin des phénomènes inflammatoires entrent en jeu. Ils résultent de la libération de facteurs pro-inflammatoires dus à la surcharge calcique et la mort des premières cellules et de la production de radicaux libres. La réponse inflammatoire est constituée principalement de l'activation gliale et microgiale ainsi que l'invasion leucocytaire.

Les cellules gliales astrocytaires activées participent à l'effet néfaste de l'ischémie, particulièrement en émettant des messagers pro-apoptotiques et pro-inflammatoires. Elles ont, a contrario, un effet bénéfique sur le tissu cérébral en produisant des facteurs de croissance neuroprotecteurs et des cytokines protectrices. De plus ces cellules activées forment une cicatrice gliale entourant le tissu cérébral lésé. Cette cicatrice a elle aussi des conséquences positives, car elle isole le tissu lésé et donc limite l'extension de la réponse immunitaire mais également des conséquences négatives, car elle empêche la récupération potentielle d'une partie du tissu cérébral.

Les cellules microgiales sont les macrophages spécifiques au système nerveux central. Leur rôle principal est de phagocyter les débris cellulaires. Ces cellules sont aussi capables de détruire des neurones par cytotoxicité. Elles participent aussi à la réparation tissulaire en recrutant des astrocytes et des neurones vers la zone lésée.

Entre quatre et six heures après ischémie le tissu lésé est envahi de leucocytes. Ces cellules ont un rôle délétère sur le tissu par libération, entre autres, de radicaux libres, de cytokines. Les neutrophiles sont les premiers à répondre à l'inflammation, puis les lymphocytes interviennent.

L'inflammation tissulaire faisant suite à l'ischémie a donc des effets ambivalents puisqu'elle participe à la fois à la préservation et à la réparation du tissu mais également à sa détérioration. En effet elle participe à la préservation ainsi qu'à la réparation du tissu mais aussi à sa détérioration [Wang et al. 2007 ; Barone et al. 1999].

La reperfusion a elle aussi un rôle ambivalent, le retour de la circulation, donc de l'oxygène et des substrats métaboliques, permettant de sauver les tissus peu touchés mais également de favoriser l'apoptose et l'inflammation.

La Figure 1 récapitule cette cascade d'évènements suivant une ischémie cérébrale.

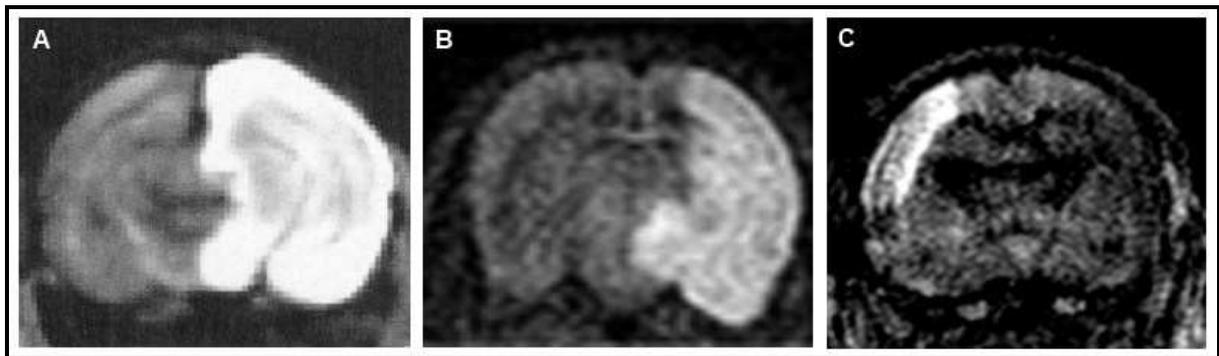


Figure 2 : Images pondérées en diffusion de trois différents modèles d'ischémie chez le rat nouveau-né p7 montrant la lésion ischémique en hyper-signal. A : modèle d'hypoxie-ischémie Vannucci (clampage d'une carotide + 2 heures d'hypoxie) [Williams et al. 1997], B : modèle d'ischémie Derugin (clampage d'une carotide + occlusion intraluminaire d'une artère cérébrale moyenne) [Faustino et al. 2011] et C : modèle Renolleau/Buchan (clampage des deux carotides + électrocoagulation d'une artère cérébrale moyenne).

Ischémie cérébrale du nouveau-né.

Les modèles d'ischémie présentés ici se limitent à ceux utilisés chez le rat (les plus utilisés), ceux utilisés chez la souris étant plus restreints.

Les modèles d'ischémie, hypoxie-ischémie sont en majorité développés sur des rats de 7 jours (p7) car, à cet âge le développement cérébral du rat est similaire à celui du nouveau-né humain. [Roohey et al. 1997] . La Figure 2 illustre les effets cérébraux des 3 modèles décrits dans ce document.

Le modèle le plus utilisé est celui de Rice et Vannucci [Rice et al. 1981]. Il consiste en une ligature unilatérale d'une artère carotide commune (CCA) couplée à une hypoxie par exposition à une atmosphère pauvre en O<sub>2</sub> (8%). Il s'agit d'une adaptation du modèle de Levine [Levine, 1960] conçu pour les animaux adultes. Selon les équipes ayant utilisé ce modèle, le temps d'hypoxie varie entre 90 minutes et 210 minutes, cette valeur étant celle donnée dans l'article de référence. Ce modèle cause une lésion ischémique occupant presque un hémisphère cérébral. Au niveau de la matière grise, le cortex, le striatum et l'hippocampe sont atteints et l'ensemble de la matière blanche est touchée. La relative facilité d'application de ce modèle, permet d'inclure un grand nombre d'animaux ce qui le rend très attractif et donc très utilisé. Toutefois il faut noter (Figure 2a) que la lésion est le résultat de la combinaison d'une atteinte globale due à l'hypoxie avec une diminution locale du flux sanguin (ischémie) induite par ligature d'une carotide commune, et qu'il est difficile de distinguer la contribution des deux phénomènes.

Le modèle de Derugin [Derugin et al. 1998] (Figure 2b) consiste en occlusion de l'artère cérébrale moyenne (ACM) par introduction d'un filament jusqu'à la naissance de l'ACM en passant par la carotide homologue. Le temps d'occlusion reste voisin de 60 minutes quelles que soient les études. Ce modèle, adapté du modèle d'ischémie le plus utilisé chez le rat adulte, provoque des lésions corticales, striatales et de la matière blanche de l'aire vasculaire de l'ACM. La principale difficulté réside dans le fait que le diamètre des artères des rats nouveau-nés présente une fluctuation assez importante. Il est donc difficile d'occlure convenablement l'ACM sans provoquer de dommage sur le trajet, ce qui se traduit par une faible reproductibilité de l'amplitude de la lésion. Les modèles de Buchan (rat adultes) et de Renolleau (rat p7) combinent le clampage d'une ACC [Renolleau et al. 1998] ou des deux ACC [Buchan et al. 1992] durant 60 minutes à l'électrocoagulation de l'ACM. La zone lésée est limitée au cortex ipsilatéral

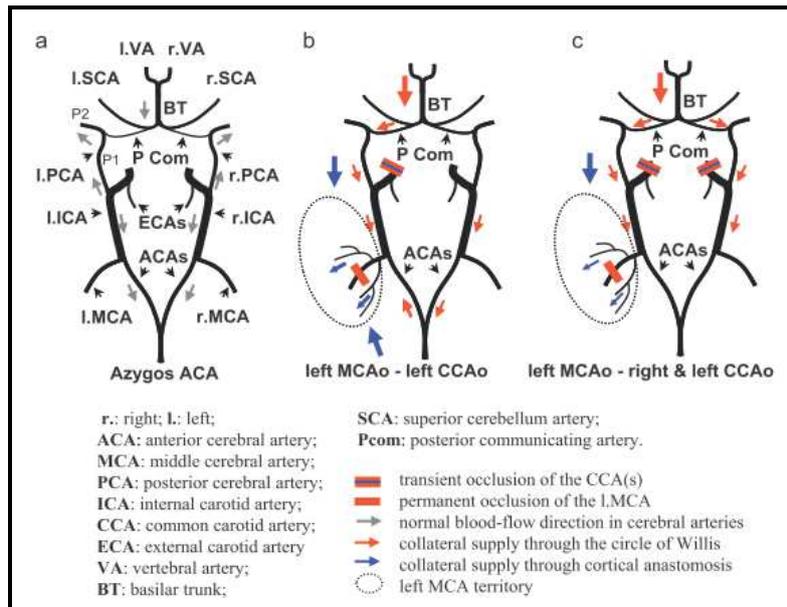


Figure 3 : Schémas de la vascularisation cérébrale. A : cas de circulation cérébrale normale, B : clampage de la carotide gauche et électrocoagulation de l'artère cérébrale moyenne gauche et C : clampage des deux carotides et électrocoagulation de l'artère cérébrale moyenne gauche. [Bonnin et al. 2011]

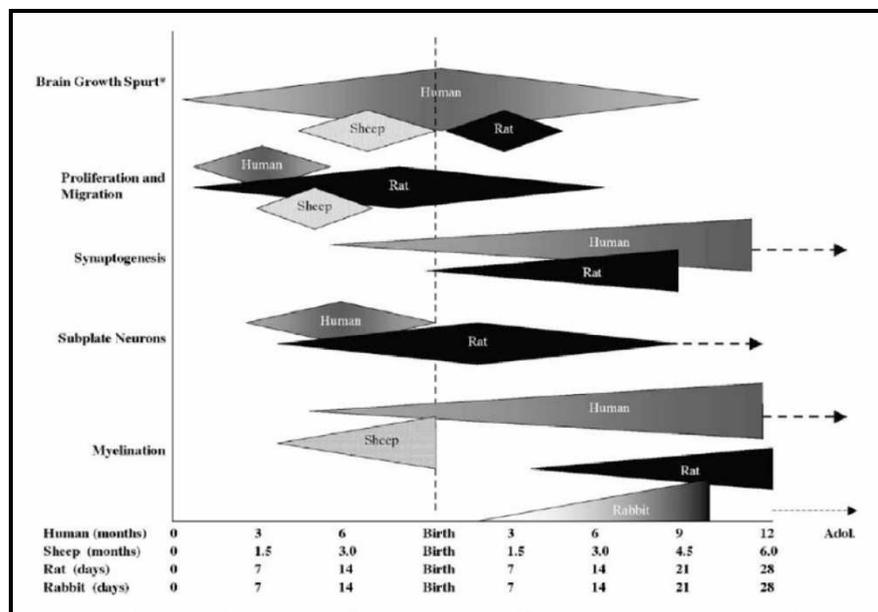


Figure 4 : Schéma comparant le développement cérébral de plusieurs espèces (Homme, mouton, rat et lapin) [Yager and Ashwald 2009]

avec, dans un faible pourcentage de cas, une atteinte striatale. Le principal inconvénient de ces modèles est la nécessité d'effectuer une craniotomie afin d'exposer l'ACM pour l'électrocoagulation. Toutefois cet inconvénient peut être réduit par une chirurgie minutieuse. Ces modèles présentent l'avantage d'avoir des protocoles chirurgicaux de plus courte durée (10 à 15 min) et sont plus faciles à mettre en œuvre que le modèle de Derugin. (Figure 3 : schéma de la vascularisation pour ces 2 modèles).

Pour cette thèse nous avons choisi d'utiliser le modèle d'ischémie focale transitoire issu de celui de Buchan, double clampage des ACC de 50 minutes couplé à l'électrocoagulation de l'ACM gauche. Le caractère très localisé de la lésion (cortex) ainsi que sa bonne reproductibilité ont été les facteurs les plus importants. Nous avons opté pour un double clampage des ACC pour augmenter le pourcentage de lésions obtenues [Bonnin et al. 2011].

L'ischémie cérébrale du rat nouveau-né diffère de celle du rat adulte par plusieurs points qui devront être pris en compte lors de cette étude.

Le plus important est l'état de maturation cérébrale. Chez l'adulte, le cerveau a atteint un stade stationnaire alors que chez le nouveau-né les différents processus comme la prolifération et la migration neuronale, la croissance axonale, la synaptogénèse et la myélinisation sont dans une phase intense (Figure 4 : développement cérébral de plusieurs espèces) [Yager et al. 2009]. On peut aussi noter que, durant cette phase de maturation, une apoptose « naturelle » des cellules cérébrales [Riley et al. 1986] s'ajoute à celle induite par l'ischémie. Ainsi, la pathologie du rat nouveau-né diffère de celle de l'adulte car les processus de maturation vont avoir un impact sur les processus post-ischémiques. Un autre point est la croissance, qui a des répercussions sur le protocole d'examen IRM. En effet, la croissance globale des rats nouveau-nés oblige à une adaptation des différents systèmes (contention) et à une modification des paramètres expérimentaux IRM (champ de vue, résolution). Par ailleurs les caractéristiques IRM du tissu cérébral comme les temps de relaxation T1 et T2 ou les paramètres liés à la diffusion (ADC, FA) évoluent lors de la maturation cérébrale.

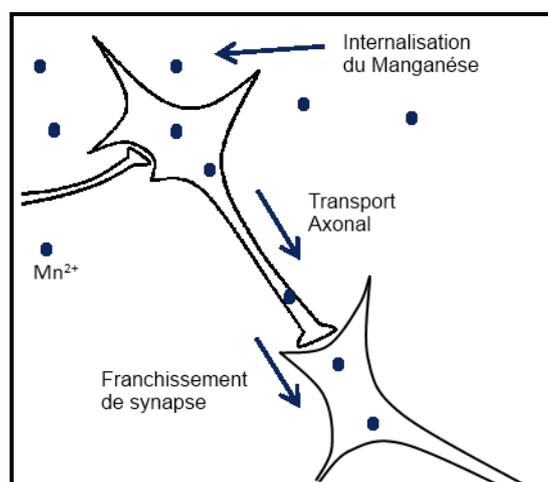


Figure 5 : Schéma du cheminement des ions manganèse dans le système nerveux central.

## **Partie 2 : Imagerie par contraste renforcé par le Manganèse**

Le manganèse, présent sous forme ionique ( $Mn^{2+}$ ) fait partie des éléments essentiels au fonctionnement biologique des mammifères. Il est impliqué dans la détoxification des radicaux libres, la synthèse de neurotransmetteurs et le transport d'électrons en tant que cofacteur enzymatique. Il a été montré qu'une déficience en manganèse perturbe le métabolisme osseux chez le rat [Strause et al. 1986]. De manière générale un régime alimentaire dépourvu de manganèse provoque des lésions de la peau, des malformations osseuses, des crises d'épilepsie et une augmentation des niveaux de calcium et de phosphore [Friedman et al. 1987]. Si le manque de manganèse est délétère, c'est son excès qui apparaît être le plus problématique. En effet, à de fortes concentrations, le manganèse est neurotoxique. Il pénètre dans le système nerveux central par les neurones du système olfactif ou à partir du sang, principalement via les régions ne présentant pas de barrière hémato-encéphalique, puis il se propage par diffusion et transport actif. Il s'accumule principalement au niveau du striatum provoquant des troubles moteurs, des hallucinations et des pertes de mémoire [Crossgrove et al. 2004].

L'ion  $Mn^{2+}$  est un analogue du calcium ( $Ca^{2+}$ ) ce qui lui confère la capacité d'entrer à l'intérieur des cellules excitables via les canaux calciques voltage-dépendants et les échangeurs  $Na^+/Ca^{2+}$ . Cette caractéristique a d'abord été utilisée comme indicateur du calcium en microscopie de fluorescence, le manganèse bloquant alors la fluorescence du fura-2 [Simpson et al. 1995].

Les ions  $Mn^{2+}$ , une fois internalisés par les neurones, sont transportés le long des axones par transport "microtubule-dépendant". Ces ions sont de plus capables de franchir les synapses [Tjälve et al. 1996]. (Figure 5)

Le manganèse possède aussi une caractéristique très intéressante d'un point de vue de la résonance magnétique nucléaire (RMN) : il est paramagnétique. Il induit un raccourcissement des temps de relaxation T1 et T2 des noyaux environnants par interaction dipolaire. Cette caractéristique a été utilisée très tôt en RMN afin d'étudier les vitesses d'échange de l'eau entre l'intérieur et l'extérieur de la sphère de coordination du  $Mn^{2+}$  [Connick et al. 1959] ainsi que pour l'étude structurale de macromolécules [Mildvan et al. 1963]. Le manganèse est un bon agent de contraste IRM : les temps de relaxation T1 et T2 des protons des molécules d'eau qui l'environnent sont réduits. Ces zones sous l'influence du manganèse apparaissent

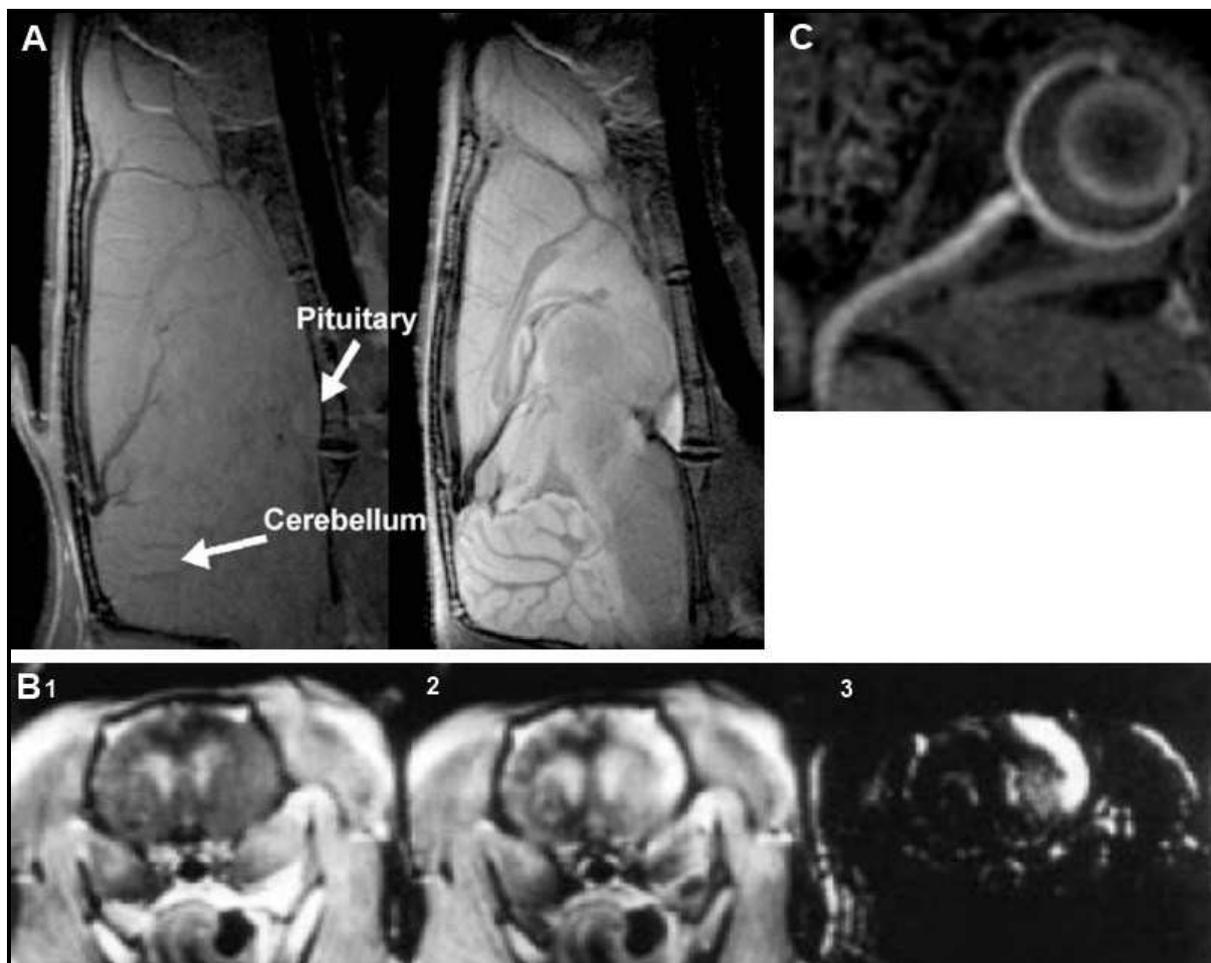


Figure 6 : Exemple d'Images issues des trois principales applications du manganèse en IRM. A : Imagerie anatomique pondérée T1 avant ainsi qu'un jour après injection intra-veineuse de  $MnCl_2$ . La glande pituitaire est mise en évidence par accumulation de manganèse, le cervelet montre la prise de contraste obtenue grâce à cette technique [Aoki et al. 2004]. B : images pondérées T1 après injection de manganèse et stimulation électrique au niveau de la paume de la patte avant gauche sans altération de la BHE (1), avec altération de la BHE (2), ainsi que la soustraction ( $3=2-1$ ) [Aoki et al. 2004]. Cette figure montre la nécessité d'ouvrir la BHE pour la mise en évidence de zones activées. C : image pondérée T1 acquise un jour après injection intravitréale de manganèse montrant son transport le long du nerf optique [Thuen et al. 2005].

en hypersignal en imagerie pondérée T1 et en hyposignal en imagerie pondérée T2.

Le paramagnétisme du manganèse et sa capacité à être internalisé en font un agent de contraste IRM très intéressant, mais sa neurotoxicité exclue toute utilisation sous forme non-chélatée chez l'Homme. Cependant, en prenant de grandes précautions au niveau des solutions injectées (en terme de concentration, de pH, d'osmolarité, de volume et de mode d'injection), il est possible de l'utiliser pour des études pré-cliniques chez le petit animal (souris, rats, oiseaux, petit singes, grenouilles, poissons). [Sandig et al. 2011, Van der Linden et al. 2004, Simmons et al. 2008]

L'Imagerie par contraste renforcé par le manganèse (MEMRI) est maintenant principalement utilisée dans trois types d'applications (Figure6):

- La mise en évidence de contrastes anatomiques: l'accumulation du manganèse n'étant pas uniforme au niveau cérébral, son utilisation permet l'obtention de contrastes au niveau de zones présentant normalement un isosignal comme les bulbes olfactifs, l'hippocampe le cortex et le cervelet [Watanabe et al. 2004]. Dans ce cas, le manganèse est injecté de façon non spécifique : en intra veineux, en intra péritonéal ou en sous cutané. [Aoki et al. 2004, Yu et al. 2005, Shazeeb et al. 2012]

-La mise en évidence de zones cérébrales activées: après administration le manganèse aura tendance à s'accumuler au niveau des zones présentant une activité élevée. [Lin et al. 1997] Comme en cas de contraste anatomique, le manganèse est administré de façon non spécifique. Afin de permettre l'entrée du manganèse au niveau du système nerveux central la barrière hémato-encéphalique doit être altérée.

-Le traçage des voies neuronales: la combinaison des propriétés biologiques du manganèse et plus particulièrement sa capacité, une fois internalisé, à être transporté le long des neurones et à traverser les synapses en font un agent de contraste privilégié pour le traçage de voies neuronales actives. Après administration du manganèse au niveau d'une zone d'intérêt (bulbe olfactif, œil, striatum, cortex), il est internalisé dans les neurones via les canaux calciques "voltage dépendants" puis est acheminé le long des voies neuronales actives. [Pautler et al. 1998 ;

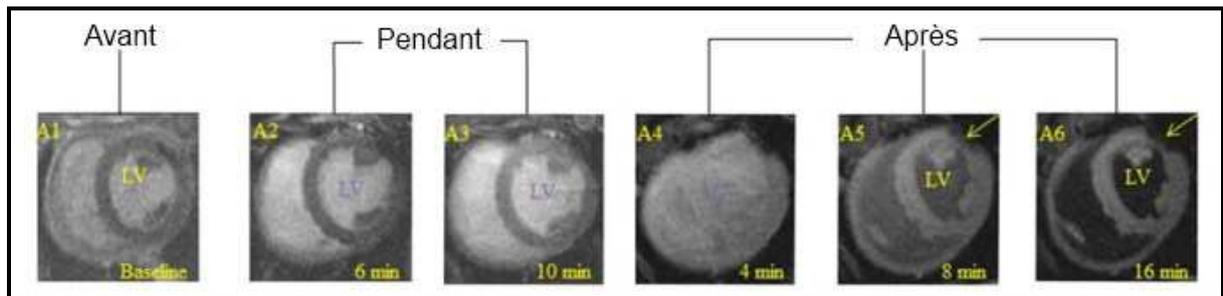


Figure 7 : Imagerie cardiaque réalisée avant, pendant et après infusion intra veineuse de MnCl<sub>2</sub> dans un modèle de cryo-lésion porcine. [Yang et al. 2011]

Leergaard et al. 2003]. Pour les études de traçage neuronal le manganèse est administré de façon spécifique: vaporisation nasale, injection intracérébrale ou intravitréale.

Le MEMRI est aussi utilisé en dehors du système nerveux central et plus particulièrement pour l'imagerie pathologique cardiaque où l'activité calcique est de grand intérêt. [Yang et al. 2011, Hu et al. 2010] (Figure 7)

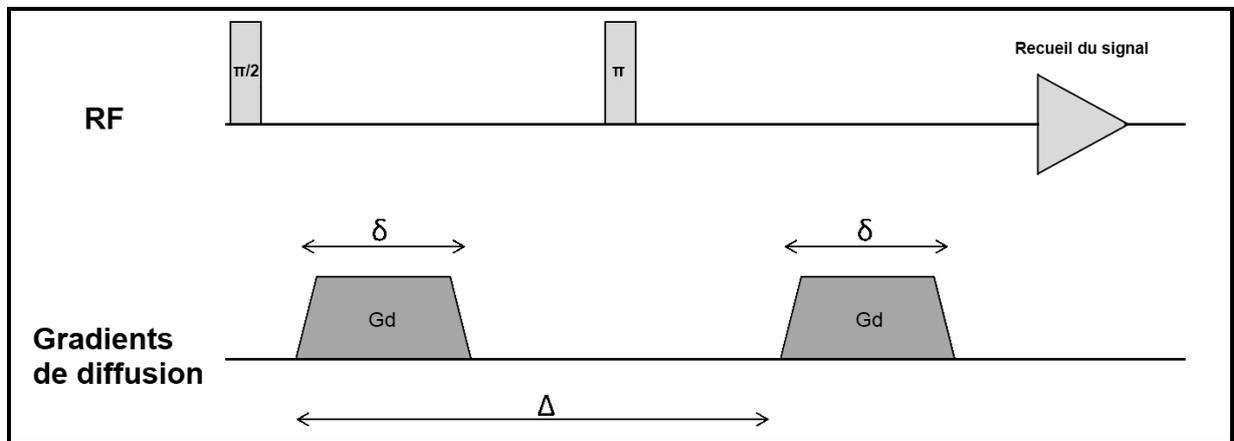


Figure 8 : Schéma du module de pondération développé par Stejskal et Tanner en 1965.  $\pi$ : impulsion de refocalisation, Gd : gradients de diffusion,  $\delta$  temps d'application des gradients Gd et  $\Delta$  temps séparant l'application des gradients Gd.

### **Partie 3 : IRM de DIFFUSION**

#### *Principe*

La diffusion des molécules d'eau induite par le mouvement brownien peut être mesurée par IRM, grâce à une expérience de type écho de spin. Le principe en a été découvert par Edwin Hahn en 1950 puis développé par Carr et Purcell en 1954.

L'IRM de diffusion repose sur la possibilité d'obtenir un contraste issu du mouvement des molécules d'eau dans le voxel étudié. Ainsi l'expérience PGSE (Pulse Gradient Spin Echo), introduite par Stejskal et Tanner en 1965, [Stejskal et Tanner, 1965] permet d'obtenir une pondération en diffusion des images : Une paire de gradients de courte durée - les gradients de diffusion- est appliquée de part et d'autre de l'impulsion  $\pi$  de l'écho de spin. Le premier gradient induit un déphasage des spins plus ou moins important en fonction de leur position, le second, après application de l'impulsion  $\pi$  les rephase (Figure 8). Pour des spins « immobiles », ce rephasage est complet et le signal obtenu est maximum. Plus les spins « diffusent » pendant le délai séparant les deux gradients plus le signal obtenu sera atténué. On obtient ainsi des images pondérées en diffusion.

La température, la géométrie de l'environnement immédiat, voire les interactions entre les molécules d'eau et d'autres macromolécules affectent la diffusion des molécules d'eau, donc affecte le contraste obtenu par imagerie pondérée en diffusion (DWI).

L'Imagerie pondérée en diffusion étant basée sur une séquence d'écho de spin, le signal obtenu est essentiellement pondéré en diffusion et en T2:

$$\text{Equation : } S_{es} = \rho (1 - e^{-TR/T1}) e^{-TE/T2} e^{-B \times ADC}$$

Avec :

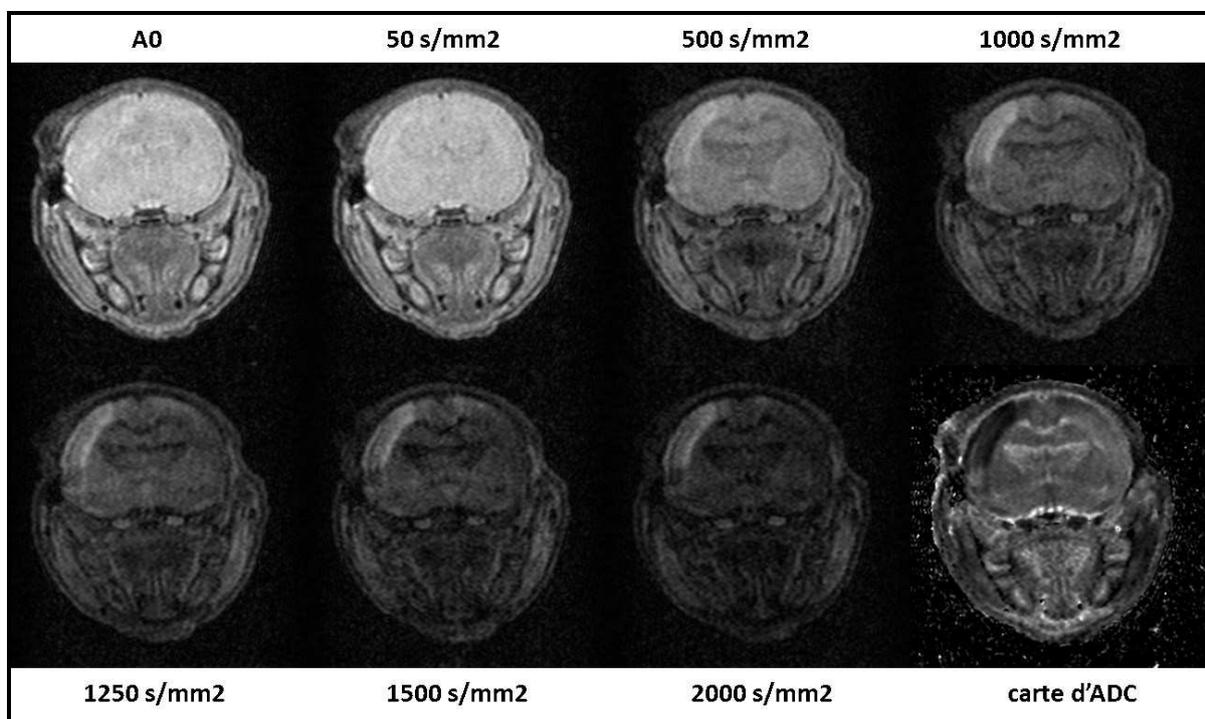
-  $S_{es}$  : signal obtenu utilisant une séquence d'écho de spin

-  $\rho$  : densité protonique

-  $B$  : valeur de  $B$  utilisée lors de ton oral c'était  $b$  à changer peut être suivant les remarques des rapporteurs et mettre ce qu'est  $b$

-  $ADC$  : coefficient de diffusion apparent

Le degré de pondération en diffusion est directement lié à la valeur de  $B$  utilisée. Cette valeur de  $B$  a été introduite par Le Bihan et Breton en 1985. Définir  $B$  [Le Bihan et al. 1985]



**Figure 9** : Images d'un cerveau de rat p7 trois heures après ischémie. A0 : image non pondérée en diffusion, X s/mm<sup>2</sup> : images pondérées en diffusion utilisant la valeur de B = X et la carte d'ADC calculée à partir des images précédentes.

Elle est liée à l'intensité, la durée ainsi qu'au temps séparant les gradients de diffusion mais dépend aussi de l'ensemble des gradients d'imagerie (elle est exprimée en  $s/m^2$ ).

Afin de s'affranchir de l'influence de la relaxation transversale sur les images il est possible de calculer des cartes d'ADC (Apparent Diffusion Coefficient) à partir d'images acquises avec au moins 2 valeurs de B différentes, en appliquant les gradients de diffusion dans une direction donnée.

$$\text{Log}(S/S_0) = -B * \text{ADC}$$

Avec S le signal obtenu, S<sub>0</sub> le signal sans pondération en diffusion,

$$B = \gamma^2 g_D^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$$

Avec  $\gamma$  : rapport gyromagnétique,  $g_D$  : intensité des gradients de diffusion,  $\delta$  : durée d'application des gradients, et  $\Delta$  délai séparant l'application des gradients :

Cette valeur d'ADC représente la diffusion moyenne dans une direction donnée, dans le voxel étudié, incluant l'apport de la circulation et de la microcirculation. Elle est exprimée en  $mm^2/s$ .

#### *Diffusion et études in vivo*

La technique d'IRM de diffusion est particulièrement efficace pour détecter les œdèmes cérébraux, comme c'est le cas lors d'ischémie cérébrale. Dans ce cas, l'acquisition d'un ensemble d'images simplement pondérées en diffusion suffit à visualiser la lésion qui apparaît en hypersignal, car la diffusion est limitée par le gonflement cellulaire. (Figure 9)

En ce qui concerne l'ADC, sa valeur est élevée au niveau des ventricules où elle est proche de celle de l'eau libre (ventricule :  $2,3 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/s$ ) et est beaucoup plus faible dans le tissu lésé et au niveau de la matière blanche (lésion :  $0,4 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/s$ , matière blanche :  $0,6 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/s$ ).

Dans l'eau libre la diffusion est isotrope, la valeur d'ADC est indépendante de l'orientation des gradients de diffusion. Dans les tissus biologiques comme le muscle ou la matière blanche cérébrale l'eau n'a plus la possibilité de diffuser de la même façon dans toutes les directions. Dans ces tissus très structurés, les membranes cellulaires ainsi que certaines macromolécules (filaments d'actine, microtubules) contraignent les mouvements de l'eau libre, la diffusion



devient anisotrope (Figure 10). Dans ce cas, le résultat sera différent suivant la direction d'application des gradients de diffusion. S'ils sont orientés parallèlement à la structure tissulaire leur effet sur l'atténuation du signal sera grand, au contraire s'ils sont orientés perpendiculairement, le mouvement de l'eau étant limité dans cette direction, l'atténuation du signal sera faible.

Dans le cerveau, outre les ventricules, on peut distinguer deux types de tissus correspondant à deux types de diffusion :

-La matière grise, composée principalement de corps cellulaires neuronaux et de leurs dendrites ainsi que de cellules gliales, est peu orientée et présente une diffusion quasi isotrope.

-La matière blanche, composée de faisceaux axonaux entourés de gaines de myéline, est un tissu très anisotrope. L'association d'un grand nombre d'axones myélinisés contraint très fortement le mouvement des molécules d'eau dans la direction perpendiculaire aux fibres.

Cette orientation des fibres axonales ne peut pas être estimée ni représentée à partir des cartes d'ADC. La première technique utilisée pour étudier l'orientation de la matière blanche cérébrale par IRM est l'Imagerie du Tenseur de Diffusion (DTI, Diffusion Tensor Imaging). Basée sur un modèle de distribution gaussienne de la diffusion à l'intérieur du voxel et sur l'hypothèse que l'ensemble des fibres est orienté de la même manière dans le voxel, cette approche ne permet pas de détecter des populations de fibres différentes au sein d'un voxel. Au niveau de ces voxels « compliqués » le résultat du DTI sera une moyenne de l'ensemble des types de fibres présents dans le voxel.

Pour dépasser ces limitations plusieurs techniques ont vu le jour, l'Imagerie de diffusion à haute résolution angulaire (HARDI High Angular Resolution Diffusion Imaging), l'Imagerie du spectre de diffusion (DSI Diffusion Spectrum Imaging), QBI (Q-Ball Imaging), GQI (Generalized Q-sampling Imaging). Les données de direction des fibres obtenues par ces techniques pour chaque voxel, et les algorithmes de suivi de fibres (*fiber tracking*) permettent de reconstruire le trajet d'un faisceau de fibres nerveuses sur toute sa longueur et de représenter la connectivité cérébrale *in vivo* de manière non invasive.



Ces techniques d'Imagerie de Diffusion nécessitent un grand nombre de directions ou/et de valeurs de  $B$ , et ont des temps d'acquisition prohibitifs dans le cadre de techniques d'acquisition « standard ». Leur utilisation *in vivo* a été rendue possible grâce à la mise en place de techniques d'acquisition très rapides, basées notamment sur l'Imagerie d'écho planar (EPI Echo Planar Imaging).

L'EPI, introduite par Peter Mansfield en 1977 [Mansfield, 1977], est une technique d'acquisition très rapide mais très exigeante au niveau matériel. Ceci a ralenti son utilisation jusqu'au début des années 1980. Elle est maintenant utilisée pour toutes les approches d'Imagerie de Diffusion. Un autre avantage de l'EPI est la réduction du temps d'acquisition de chaque incrément ce qui limite les problèmes de mouvement, problèmes majeurs en Imagerie de Diffusion.

Les principes généraux des différentes techniques d'Imagerie de Diffusion, leur intérêt et leurs limitations sont succinctement présentées dans le paragraphe suivant.

### Techniques d'Imagerie des directions de Diffusion

#### DTI

En 1994, Basser, Mattiello et Le Bihan [Basser et al. 1994] ont proposé puis développé la technique de l'Imagerie du Tenseur de Diffusion. Il s'agit de la première technique permettant d'étudier l'anisotropie de la diffusion. Elle nécessite l'acquisition d'ensembles d'images avec au moins 6 directions non colinéaires de gradients de diffusion, permettant de décrire la diffusion de l'eau dans chaque voxel d'un point de vue tridimensionnel. Les différentes directions de gradient sont classiquement obtenues par « tessellation » d'une sphère unitaire, permettant d'obtenir des directions équidistantes et réparties de façon homogène. L'augmentation du nombre de directions conduit à une amélioration du rapport signal sur bruit et permet une caractérisation plus précise et fidèle à la réalité physiologique de la diffusion dans chaque voxel.

Après l'acquisition d'un tel ensemble d'images pondérées en diffusion il est possible de calculer, pour chaque voxel, un tenseur de diffusion  $[D]$  représenté par une matrice  $3 \times 3$  diagonalisable.

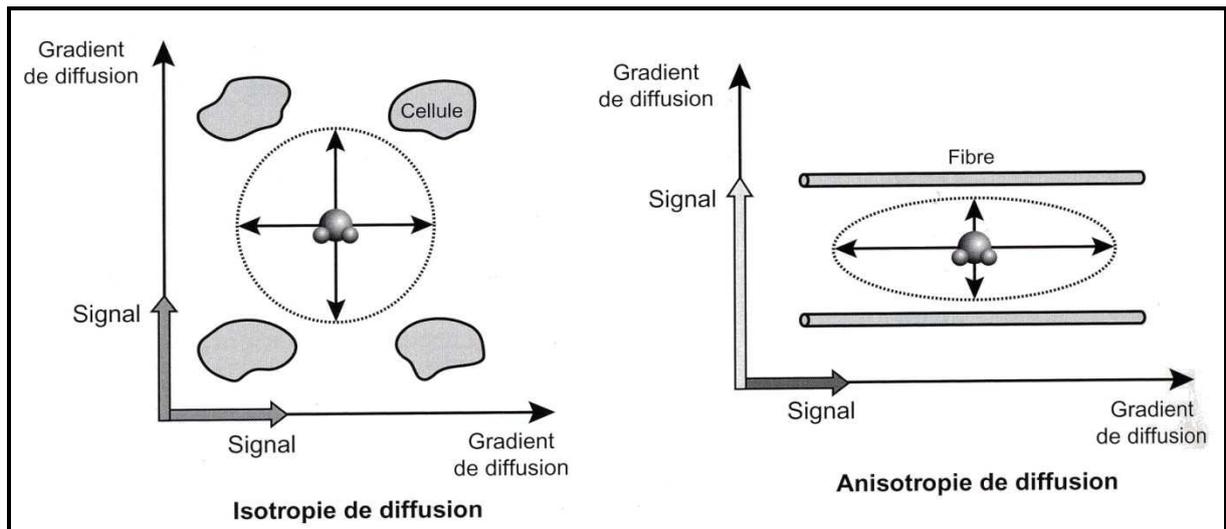


Figure 10 : schéma du signal obtenu en fonction de la direction des gradients de diffusion et de la géométrie du tissu. [Kastler et al. 2006]

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

$$[D'] = \begin{bmatrix} ADC_{max} & 0 & 0 \\ 0 & ADC_{med} & 0 \\ 0 & 0 & ADC_{min} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \lambda_1 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3 \end{bmatrix}$$

[D] tenseur de diffusion et [D'] tenseur de diffusion diagonalisé.

Après diagonalisation de cette matrice on peut extraire 3 vecteurs propres orthogonaux (V1, V2, V3) et leurs valeurs propres ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$ ,  $\lambda_3$ ) permettant une représentation ellipsoïdale. Le premier vecteur propre (V1), celui dont la valeur propre est maximale, donne la direction préférentielle de la diffusion donc l'orientation principale des fibres nerveuses dans le voxel, les deux autres vecteurs définissant le plan perpendiculaire à cette direction principale. (Figure 3)

A partir de ces valeurs on peut définir un certain nombre de paramètres caractéristiques de la diffusion intra-voxel et en reconstruire des cartes permettant de rendre compte des propriétés de diffusion dans l'ensemble de l'organe étudié :

-La trace du tenseur correspond à la somme des valeurs propres du tenseur, elle est indépendante du repère considéré. On peut en déduire la diffusivité moyenne.

$$\langle D' \rangle = Tr([D']) / 3 = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3}$$

$\langle D' \rangle$  : diffusivité moyenne et  $Tr([D'])$  : trace du tenseur

La diffusivité moyenne est analogue à un ADC calculé en utilisant les trois composantes de l'ellipsoïde.

-La fraction d'anisotropie (FA) est un nombre sans dimension, compris entre 0 et 1, caractéristique de « l'excentricité » de la diffusion dans chaque voxel. Pour une diffusion isotrope la valeur de la FA sera de 0 alors que pour une diffusion très anisotrope, elle sera proche de 1

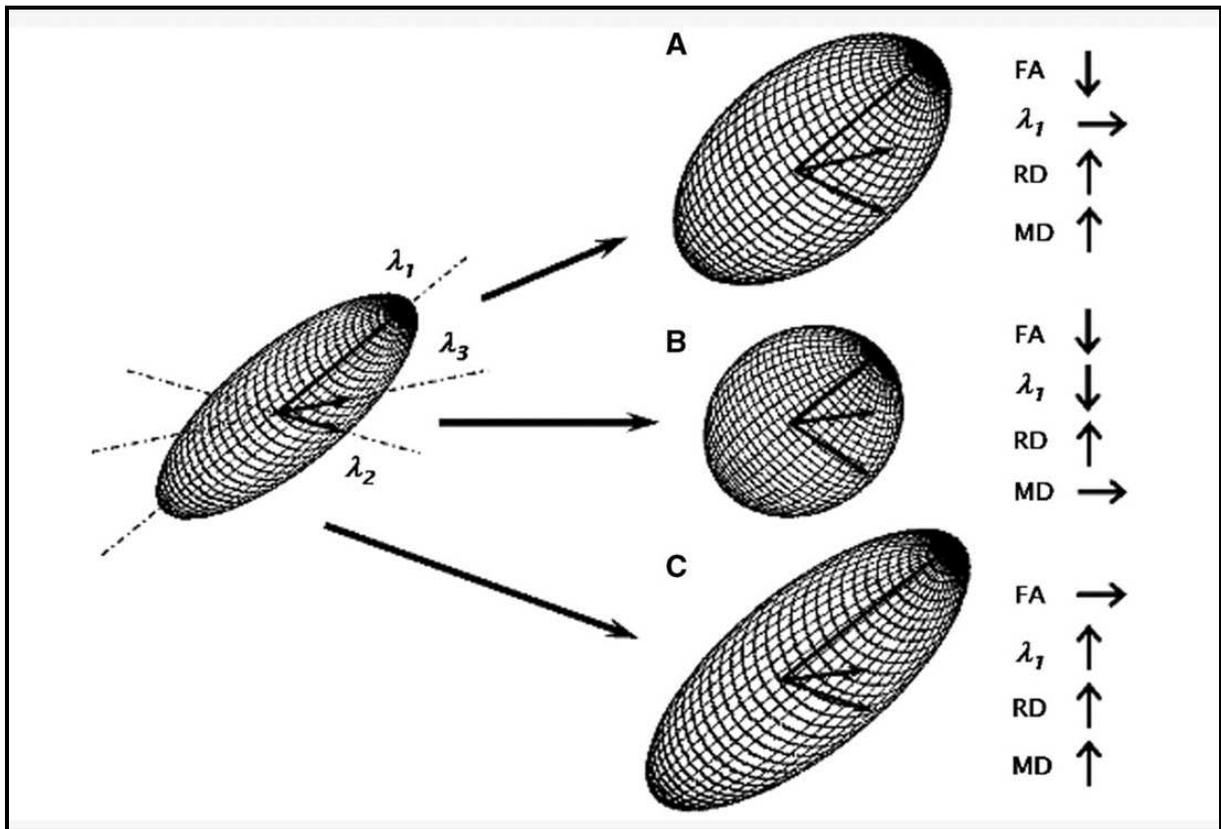


Figure 11 : schéma montrant l'effet de l'évolution d'un ellipsoïde selon trois cas ainsi que son effet sur quatre paramètres. FA : fraction d'anisotropie,  $\lambda_1$  : première valeur propre, RD : valeur propre perpendiculaire à  $\lambda_1$   $RD = (\lambda_2 + \lambda_3)/2$  et MD : diffusivité moyenne.

$$FA = \sqrt{\frac{(\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2 + (\lambda_3 - \lambda_1)^2}{2(\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2)}}$$

-De plus la comparaison des valeurs propres permet également d'obtenir des informations importantes. Ainsi, dans le cas de la matière blanche une augmentation locale des valeurs propres correspondant aux vecteurs définissant le plan perpendiculaires à la direction principale ( $\lambda_{\perp}$ ) pourrait être un signe de démyélinisation. [Basser et Pierpaoli, 1996] (Figure 11)

### HARDI

Cette technique [Tuch et al. 2002] utilise un grand nombre de directions et une valeur de B élevée, rendant ainsi possible la détermination de plusieurs axes de diffusion intra-voxel. L'hypothèse principale est qu'un voxel présentant une distribution non-gaussienne de la diffusion est en fait composé d'un mélange d'ensembles, ayant chacun une distribution gaussienne de la diffusion, en échange lent. On peut alors considérer un voxel comme constitué d'un ensemble discret de tenseurs, chacun de ces tenseurs ayant une direction principale et ainsi obtenir plusieurs directions principales de diffusion par voxel donc résoudre les cas complexes de croisement de fibres axonales.

Même si la technique HARDI supprime l'un des principaux défauts du DTI, (une direction des fibres par voxel), elle s'appuie sur un modèle gaussien de la diffusion. Hors, cette vision s'est avérée erronée [De Santis et al. 2011], et une nouvelle technique, baptisée DKI (Diffusion Kurtosis Imaging), analysant l'écart à la gaussienne de la diffusion dans chaque voxel a été proposée par Jensen et al. en 2005.

Les données initiales DTI, HARDI et DKI sont recueillies dans l'espace de Fourier ou espace-K, qui échantillonne l'espace. Les autres techniques comme le DSI, le Q-ball ou le DGI utilise l'espace-Q qui échantillonne le déplacement des spins, donc des molécules, tant en terme de direction que d'amplitude. [Cohen et Y. Assaf. 2002]

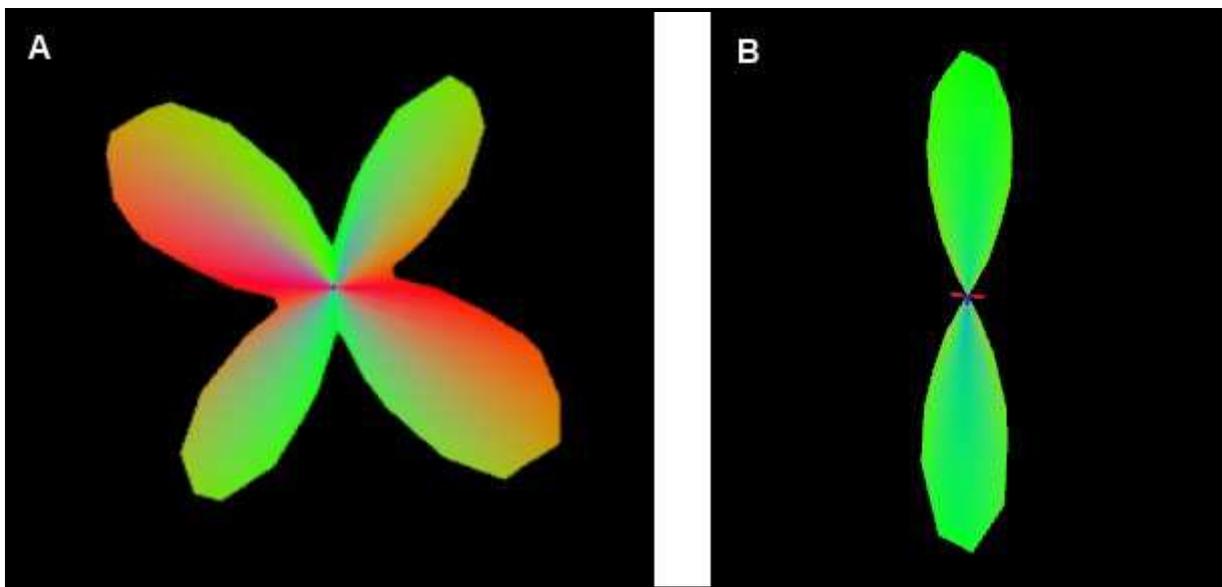


Figure 12 : Exemples d'ODFs obtenues *in vivo* par QBI, A cas d'un croisement de fibre, B cas d'une seule population de fibres. Les couleurs correspondes aux directions de diffusion (haut/bas=vert, droite/gauche=rouge et dans le plan/hors du plan=bleu).

## Diffusion et espace-Q

Les techniques d'imagerie reposant sur l'espace-Q ne sont pas limitées par la modélisation mono-exponentielle comme peut l'être le DTI, elles sont capables de distinguer plusieurs directions de diffusion dans un même voxel donc de décrire des croisements de fibres neuronales. Alors que l'espace-K est lié à la localisation des spins, l'espace-Q est lui lié à leurs déplacements dynamiques. Elles reposent sur le principe que l'atténuation du signal due à la pondération en diffusion est directement liée au déplacement des molécules observées pendant le temps de diffusion. Dans ce cas on parlera de valeurs de  $q$ , analogue aux valeurs de  $B$  pour le DTI, et exprimées en  $m^{-1}$ . En effectuant la transformée de Fourier de la décroissance du signal en fonction de  $q$  on est capable d'obtenir la fonction de densité de probabilité de diffusion de l'eau dans toutes les directions dans chaque voxel étudié (PDF probability density function). A partir des PDFs il est utile de calculer les ODFs (Orientations Distribution Function), analogues de des ellipsoïdes du DTI. Mais dans ce cas les directions de diffusion sont obtenues par calcul des maxima locaux. Le système n'est ici pas limité à une direction, il est donc possible de décrire des cas complexes de croisement de fibres (Figure 12).

$$q = (2\pi)^{-1} \gamma \delta g$$

Avec  $\gamma$  : le rapport gyromagnétique,  $\delta$  : le temps d'application des gradients et  $g$  l'intensité des gradients.

En théorie, à partir de l'espace Q, il est possible de décrire complètement le comportement des molécules étudiées. Pour cela, la pondération de diffusion doit être réalisée en utilisant des temps très courts pour les gradients de diffusion et des temps de diffusion très longs. Malheureusement cela n'est pas possible en pratique. En effet, des durées très courtes d'application des gradients nécessitent d'augmenter la puissance, ce qui se heurte à des limitations techniques. Par ailleurs l'utilisation de temps de diffusion longs entraîne une perte importante de signal due à la relaxation transversale ( $T_2$ ). Cependant Mitra et al [Mitra PP, 1995] ont montré que l'erreur commise en ne remplissant pas ces conditions optimales de durée est une minimisation des distances parcourues par les spins durant le temps de diffusion et peut donc être négligée.

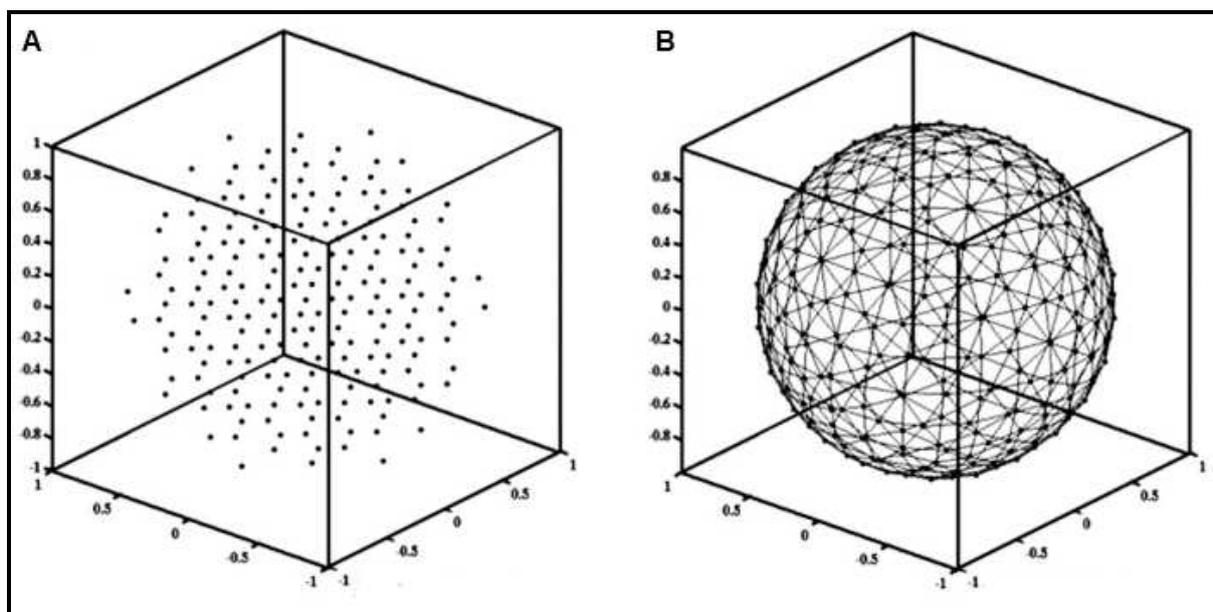


Figure 13 : Orientation des gradients de diffusion pour une acquisition : A- DSI à 203 directions (forme de grille), B- QBI à 252 directions (forme sphérique). [Kuo et al. 2008]

A partir des différentes techniques d'imagerie de diffusion reposant sur l'espace Q, les paramètres importants accessibles sont :

-La fraction d'anisotropie généralisée (GFA, Generalized fractional anisotropy) qui correspond exactement à la FA. Plus la diffusion dans le voxel d'intérêt est anisotrope plus la valeur de la GFA est proche de 1.

$$\text{GFA} = \text{std}(\psi) / \text{rms}(\psi)$$

Avec  $\psi$  l'ODF, std = déviation standard et rms = racine carrée de la moyenne des carrés.

-L'anisotropie quantitative (QA, Quantitative Anisotropy) [Yeh et al. 2010]. Les valeurs de QA décrivent la population de spins dans une direction spécifique. Elles correspondent aux différents maxima (lobes) des ODFs. Plus la valeur de QA est élevée, plus la diffusion est importante dans cette direction. Par ailleurs, plus les valeurs de QA sont basses plus les directions de diffusion correspondantes sont sujettes au bruit et peuvent être de faux positifs. Pour obtenir un traçage plus fiable, on élimine les faibles valeurs de QA par seuillage et on définit les « axes » utilisés pour la tractographie.

$$\text{QA}(\mathbf{a}) = Z_0(\psi_Q(\mathbf{a}) - I(\psi_Q))$$

Avec  $Z_0$  la constante de normalisation,  $\psi_Q(\mathbf{a})$  la fonction de distribution des spins dans la direction et  $I(\psi_Q)$  l'« arrière-plan » isotrope.

## Expériences basées sur l'espace-Q

### DSI

L'Imagerie du Spectre de Diffusion utilise un échantillonnage des valeurs de  $q$  sous forme de grille (Figure 13). Cela revient à utiliser plusieurs valeurs de  $B$  (ex : 12) et pour chacune appliquer plusieurs directions (6-30 directions). De cette façon il est possible de décrire de façon globale l'espace-Q. Ici les PDFs sont obtenues par transformée de Fourier 3D des données recueillies dans l'espace-Q. [Wedeen et al. 2005]



## Q-ball

La technique de l'imagerie Q-ball a été proposée en 2004 par TUCH et al. Elle repose sur la transformée de Funk-Radon. Cette technique nécessite l'utilisation d'une seule valeur de B élevée (donc de q) et d'un grand nombre de directions de gradients de diffusion (réparties, comme pour le DTI, sur une sphère : Figure 13). La transformée de Funk-Radon est utilisée en lieu et place de la transformée de Fourier. Cette technique est capable de reconstruire l'espace-Q grâce à l'interpolation sphérique réalisée.

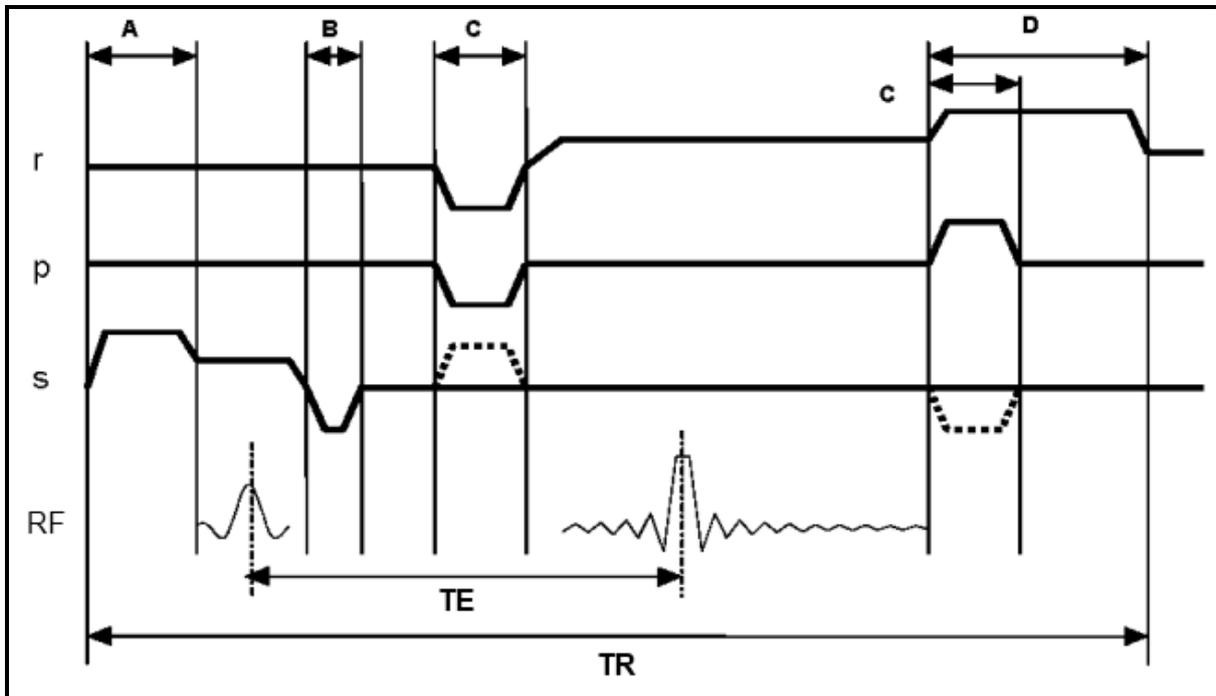
Trois autres méthodes de reconstruction de données acquises avec seulement une valeur de B ont été proposées. [Anderson et al. 2005 ; Hess et al. 2006 ; Descoteaux et al. 2007]. Elles utilisent toutes les trois les harmoniques sphériques afin de calculer les ODFs.

## GQI

(Generalized Q-sampling Imaging) [Yeh et al. 2010]

Cette technique, comme le DSI, repose sur la relation, par transformée de Fourier, entre les données d'IRM de diffusion et la diffusion de l'eau. Le GQI utilise la fonction sinc comme base pour la reconstruction. Le caractère général de cette méthode vient du fait qu'elle est capable de reconstruire des données acquises avec des directions réparties selon plusieurs modèles: sur une sphère, plusieurs sphères et donc plusieurs valeurs de B ou selon une grille comme pour le DSI.

a)



b)



Figure 14 : a) schéma de la séquence Flash. A et D : « spoilers » permettant de supprimer les composants du signal incohérents avec l'Etat d'équilibre du signal. B : refocalisation du signal issu de la coupe. C : encodage de phase. (Source : Bruker) b) exemple d'images obtenues utilisant la séquence de positionnement. Rat p7 sain.

## Partie 4 : Séquences d'imagerie

Abréviations :

-TR : temps de répétition

-TE : temps d'écho

-T acq : temps d'acquisition

-Dummy scans : scans «factices » utilisés en début d'acquisition afin d'amener l'aimantation vers un état stable

-r : gradient de lecture

-p : gradient de codage de phase

-s : gradient de sélection de coupe

-RF : signal radio fréquence

### 1- Séquence de positionnement

Afin de vérifier le bon positionnement de l'échantillon (fantôme/rat) une séquence présentant les caractéristiques suivante a été utilisée :

-un temps d'acquisition court

-un contraste suffisant pour se repérer

-un champ de vue large

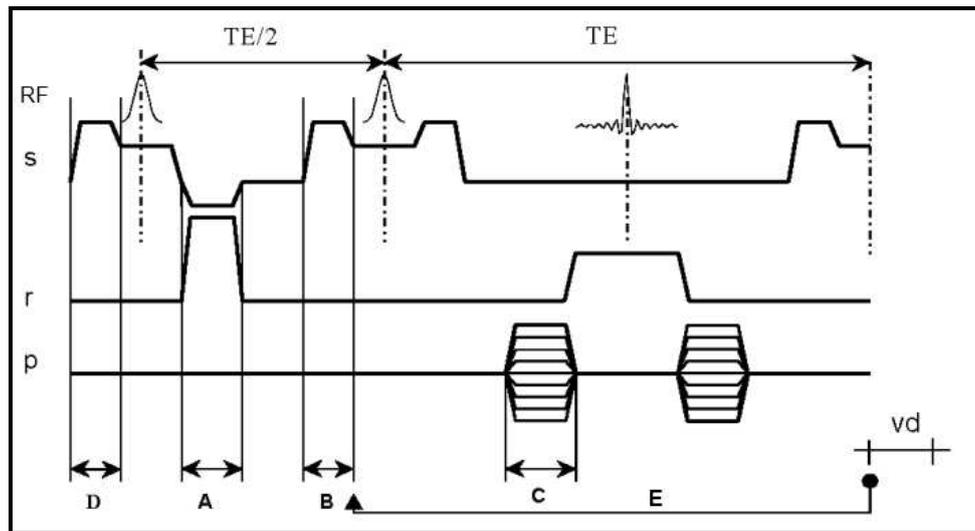
-une information tridimensionnelle

La séquence utilisée est une FLASH (Fast Low Angle SHot), écho de gradient à faible angle de bascule. Trois coupes orthogonales sont acquises utilisant un champ de vue large et une matrice raisonnable, pour un temps d'acquisition inférieur à 20 secondes.

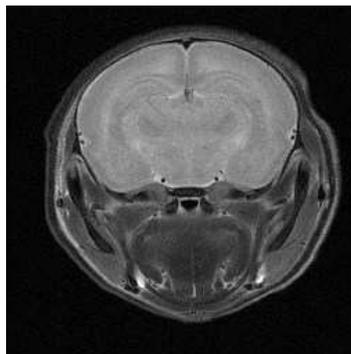
Paramètres	TR	TE	Angle	T acq	Champ de vue	Matrice	Résolution	Coupes	Dummy scans
/	100 ms	6 ms	30°	13 s	40*40 mm	128*128	0.312*0.312*2 mm	3 coupes orthogonales de 2 mm	10

(Voir [figure 14](#))

a)



b)



c)

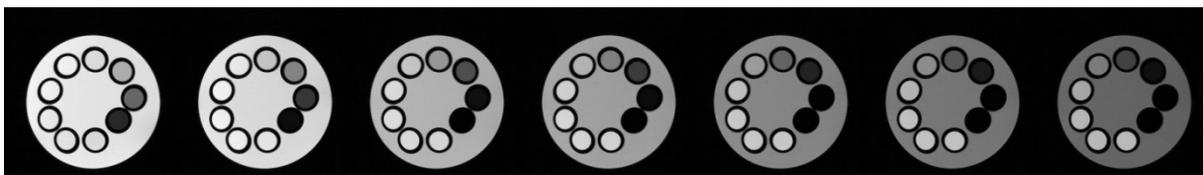


Figure 15 : a) schéma de la séquence RARE. A : refocalisation du signal provenant de la coupe. B : « spoiler » suppression des signaux issus de la refocalisation. C : encodage de phase. D : « spoiler » suppression des échos issus du cycle précédent (TR court). E : boucle permettant l'obtention de plusieurs échos par TR. vd : délai incrémentable utilisé pour l'acquisition d'images avec des TR différents. (Source : Bruker) b) exemple d'image anatomique. Rat p7 sain. c) exemple d'images *in vitro* utilisant la séquence RARE, plusieurs TR et TE, les images présentées ont été acquises avec un TR de 5s et 7 différents TE : 11-22-33-44-55-66-77 ms

## 2- Séquence anatomique

L'acquisition d'une image anatomique a été incluse lors de chaque session d'imagerie afin de fournir une référence anatomique aux scans d'intérêts. Dans ce but, on a utilisé une séquence RARE 2D (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) pondérée T2. Elle est dérivée de la séquence CPMG (Carr Purcell Meiboom Gill) produisant un train d'échos de spin par des impulsions successives de 180°. Pour chaque écho un incrément d'encodage de phase est appliqué permettant l'acquisition de plusieurs lignes de l'espace K par temps de répétition TR.

Paramètres	TR	TE	TE eff	Rare facteur	T acq	Champ de vue
p7	4000 ms	12.5 ms	50 ms	8	6min 24 s	20*20 mm
p14-21 DTI	4000 ms	12.5 ms	50 ms	8	6min 24 s	30*30 mm
p14-21 MEMRI	4000 ms	12.5 ms	50 ms	8	6min 24 s	30*30 mm

Paramètres	matrice	résolution	coupes	Dummy scans	Acumulations
p7	256*256	0.78*0.78*1 mm	10 x 1 mm	2	3
p14-21 DTI	256*256	0.117*0.117*1 mm	10 x 1 mm	2	3
p14-21 MEMRI	256*256	0.117*0.117*0.5 mm	20 x 0.5 mm	2	3

(Voir [figure 15](#))

Paramètres propre à la séquence RARE :

-Temps d'écho effectif : délai entre l'impulsion d'excitation et le milieu des étapes d'encodage de phase. Ce TE définit la pondération T2 de l'image.

-Rare factor : nombre d'échos, donc de pas d'encodage de phase par TR.

## 3- Séquence de relaxométrie T1/T2

Pour les expériences de relaxométrie T1/T2 une séquence RARE, saturation/récupération, avec plusieurs temps de répétition ainsi que plusieurs temps d'écho a été utilisée. Ici le Rare facteur est 1, la séquence n'est donc pas accélérée mais dans ce cas les différents échos sont utilisés pour la formation d'images avec des temps d'échos différents. Les calculs T1 sont



réalisés en utilisant le premier écho ainsi que les différents temps de répétition alors que les calculs T2 utilisent le temps de répétition maximum ainsi que chaque temps d'écho.

Paramètres	TR	TE	Rare facteur	T acq	Champ de vue
/	5000-3000-1500-800 -400-200-100 ms	11-22-33-44 -55-66-77 ms	1	2h20min48s	35*35mm

Paramètres	Matrice	Résolution	Coupes	Dummy scans	accumulations
/	256*256	0.137*0.137*1 mm	1 x 1 mm	2	4

(Voir [figure 15](#))

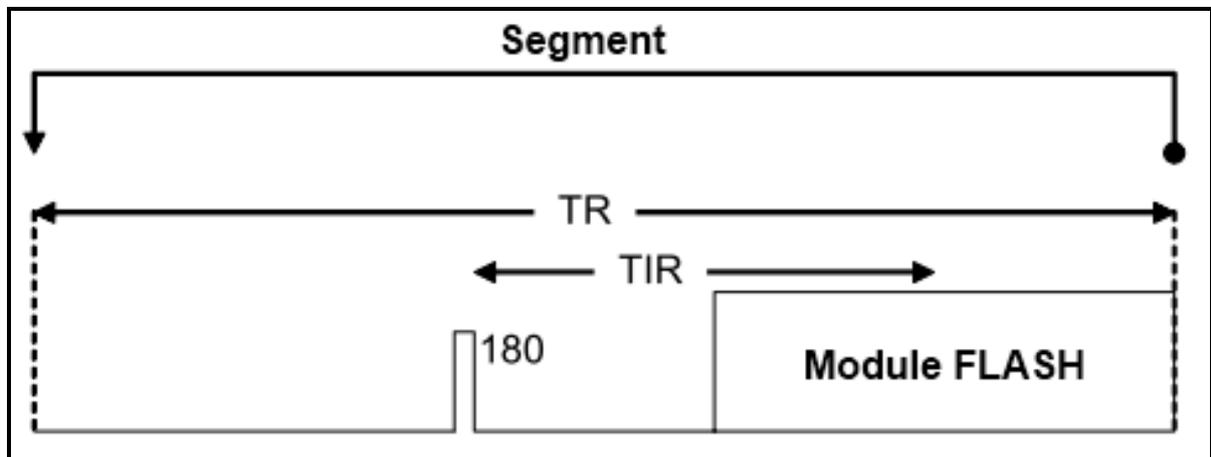
#### 4- Séquence pondérée T1 pour MEMRI

Les principales caractéristiques nécessaires pour l'imagerie renforcée par le manganèse dans notre cas sont :

- un temps d'acquisition court
- un bon signal sur bruit
- un important contraste T1

La séquence choisie est la MP-RAGE (Magnetisation-Prepared Rapid Gradient-Echo) [Mugler et al. 1990]. Il s'agit d'une séquence d'écho de gradient 3D segmentée, précédée par un module d'inversion récupération (constitué d'une impulsion d'inversion suivi d'un délai). Le signal est recueilli après inversion récupération par la méthode FLASH 3D, pendant l'acquisition d'un segment le signal est dans un état de quasi équilibre (relaxation transverse stable et légère repousse longitudinal du signal), entre chaque segment un temps de récupération est appliqué afin de ne pas saturer le signal.

a)



b)

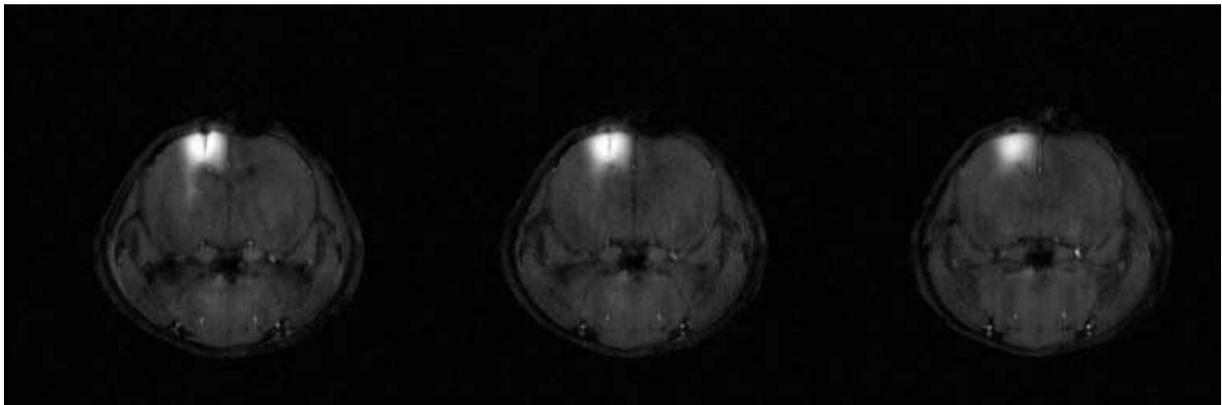


Figure 16 : a) schéma de la séquence MP-RAGE. TIR : temps d'inversion. FLASH Segment : voir figure 14. (Source : Bruker) b) exemple d'images acquises utilisant la MP-RAGE. Rat p14 2 heures après injection intracorticale de manganèse (+ 2 tubes de référence externe).

Paramètres	TR	TE	Segments	Durée segment	Angle	T acq	Temps d'inversion
p14	4500 ms	15 ms	4	960 ms	20°	16 min 24 s	1500 ms
p21	4500 ms	15 ms	4	960 ms	20°	16 min 24 s	1300 ms

Paramètres	Champ de vue	Matrice	Résolution	Coupes	Dummy scans	Accumulations
p14	30*30 mm	256*256	0.117*0.117*0.5 mm	20 x 0.5 mm	2	2
p21	30*30 mm	256*256	0.117*0.117*0.5 mm	20 x 0.5 mm	2	2

(Voir figure 16)

Paramètres propres à la séquence MP-RAGE :

- Temps d'Inversion (TI) : temps entre l'impulsion d'inversion (180°) et l'acquisition du centre de l'espace K.
- Temps de répétition des segments : temps séparant deux modules d'inversion récupération.
- nombre de segments : nombre de divisions de l'espace K utilisé, plus ce nombre est important plus la pondération T1 est précise (diminuant l'effet de la relaxation T1 pendant l'acquisition 3D) mais plus l'acquisition est longue.

##### 5- Séquence pondérée en diffusion

La séquence pondérée en diffusion est une séquence d'écho de spin possédant le module de pondération en diffusion (introduit par Stejskal and Tanner en 1965) [Stejskal et Tanner, 1965] et un module de lecture EPI (Echos Planar Imaging). Cette séquence permet une acquisition rapide grâce à la lecture de type EPI, le balayage du plan de Fourier par écho de gradient se fait en continu. Il est possible d'acquérir une image par temps de répétition (one-shot) ou de segmenter l'acquisition (multi-shot). L'EPI est une technique très sensible aux artéfacts et très demandeuse au niveau matériel et plus particulièrement au niveau des gradients.



Artéfacts : Fantômes de Nyquist. Cet artéfact se manifestant par une ou des images « fantômes » décalées dans le sens de la phase est principalement dû aux courants de Foucault. Le grand nombre de lignes du plan de Fourier acquises limite la bande passante dans le sens de la phase, pouvant provoquer des artéfacts de déplacement chimique. La suppression du signal issu de la graisse permet de régler ce problème. Les artéfacts de susceptibilité sont accentués par la sensibilité de l'EPI à ce type d'inhomogénéité. La segmentation de l'acquisition permet de diminuer les effets de la susceptibilité magnétique au détriment du temps d'acquisition. L'application et l'arrêt de gradients de forte intensité, donc une forte variation du champ magnétique, induit des courants de Foucault. Ces courants de Foucault provoquent des erreurs entre les gradients de champ magnétique voulu et ceux réellement créés. Ces erreurs induisent, entre autre des déformations géométriques voir des images fantômes. [Le Bihan et al. 2006]

- a) Pour la réalisation de cartes d'ADC (coefficient de diffusion apparent) plusieurs valeurs de B sont utilisées, puis la carte est calculée par « fitting » de la décroissance du signal en fonction de la valeur de B.
- b) Imagerie du tenseur de diffusion : DTI (Diffusion Tensor Imaging) Une valeur de B ainsi 30 directions différentes de diffusion ont été utilisées et complétées par un ensemble d'images non pondérées en diffusion.
- c) Imagerie Q-ball. Une valeur de B ainsi que 126 directions différentes de diffusion, ont été utilisées et complétées par un ensemble d'images non pondérées en diffusion.



Paramètres	TR	TE	Segments	T acq	Diffusion $\delta + \Delta$	Valeurs de B	Champ de vue
ADC	4000 ms	29 ms	8	3 min 44 s	7 ms + 14 ms	50-500-1000- 1250-1500-2000 s/mm <sup>2</sup>	20*20
DTI p7	4000 ms	32 ms	8	18 min 40 s	4 ms + 20 ms	500 s/mm <sup>2</sup>	20*20
DTI p14-21	4000 ms	32 ms	8	18 min 40 s	4ms + 20 ms	500 s/mm <sup>2</sup>	30*30
Q-Ball	4000 ms	24 ms	4	33 min 52 s	6 ms + 12 ms	2000 s/mm <sup>2</sup>	32*32

Paramètres	Matrice	Résolution	Coupes	Dummy scans	Bande passante	Supression du signal de la graisse
ADC	128*128	0.156*0.156*1 mm	10 x 1 mm	4	250 KHz	oui
DTI p7	128*128	0.156*0.156*1 mm	10 x 1 mm	4	250 KHz	oui
DTI p14-21	128*128	0.234*0.234*0.5 mm	10 x 1 mm	4	250 KHz	oui
Q-Ball	128*128	0.250*0.250*0.5 mm	22 x 0.5 mm	4	400 Khz	oui

(Voir [figure 8](#))

Paramètres propres aux séquences de diffusion :

- $\delta + \Delta$  :  $\delta$  correspond au temps d'application des gradients de diffusion et  $\Delta$  au temps séparant l'application de deux gradients de diffusion.

-Valeur de B : valeur reflétant la pondération en diffusion, calculée à partir de l'intensité des gradients de diffusion (et des gradients d'imagerie) et de leur caractéristiques  $\delta$  et  $\Delta$ .

Un niveau de « zero filling » a été appliqué à ces acquisitions (sauf Q-ball) afin d'obtenir une taille de matrice de 256\*256 équivalente à celle utilisée pour les images de référence anatomique.



## **Chapitre II :**

# **Etude de l'impact d'une ischémie focale transitoire sur le cerveau de rat en développement.**



## **Partie 1 : introduction**

Pour cette étude nous avons choisi de nous concentrer sur deux aspects : l'évolution fonctionnelle et l'évolution structurale du cerveau de rat immature suite à une ischémie focale transitoire. Dans ce but nous avons examiné des animaux p7, p14 et p21 afin d'observer l'impact de l'ischémie sur le cerveau de rat en pleine maturation. Ce type de modèle a déjà été étudié dans le laboratoire, lors de la thèse de Chrystelle Po, avec une focalisation au niveau de la lésion ischémique corticale. Dans ce travail nous nous sommes plus particulièrement attachés à l'étude des zones non lésées. Les techniques utilisées sont le MEMRI (imagerie par résonance magnétique renforcée par le manganèse) et le DTI (imagerie du tenseur de diffusion). Les expériences MEMRI, nous ont permis d'étudier le tractus cortico-thalamique, en suivant (entre 2 et 24 heures après injection) l'apparition du manganèse dans les zones sous-corticales après une injection intra-corticale de  $MnCl_2$  et en particulier d'évaluer l'intégrité fonctionnelle de ce tractus. Le suivi par DTI nous a permis d'estimer de façon globale la structuration cérébrale en nous basant sur les cartes (obtenues à partir des images pondérées en diffusion) des paramètres de diffusion de l'eau au niveau des différents tissus cérébraux.

Plusieurs études portant sur l'ischémie néonatale ont été réalisées durant les 20 dernières années. En regardant la littérature on s'aperçoit qu'il existe une grande variation entre les modèles utilisés, les temps d'observation ainsi que les techniques de caractérisation choisies. Les publications basées sur l'IRM utilisent toutes sortes de techniques basées sur l'imagerie pondérée T2, la perfusion ou la diffusion. Bien que le MEMRI par injection intra-cérébrale ait déjà été utilisé pour étudier l'ischémie cérébrale, cette approche n'a jamais été mise en œuvre chez le rat nouveau-né ni, de façon précoce et dynamique, chez le petit animal. Ces expériences MEMRI, réalisées le plus généralement chez le rat adulte, ont été enregistrées entre 24 et 48 heures après injection de la solution de manganèse. Ces expériences chez l'adulte ont prouvé l'efficacité du manganèse pour l'étude de l'ischémie cérébrale et de son impact sur la connectivité neuronale [Aoki et al. 2004 ; Van Der Zijden et al. 2007 ; Soria et al. 2008]. Par ailleurs on peut aussi réaliser des expériences MEMRI après injection non spécifique (intraveineuse ou intra-péritonéale) de manganèse. Chez le rat nouveau-né cette



approche s'est révélée efficace pour détecter la lésion ischémique, principalement en mettant en évidence l'activation gliale [Yang et al. 2007 ; Yang et al. 2008 ; Wideroe et al. 2009 ; Kawai et al. 2010].

L'imagerie du tenseur de diffusion a été utilisée pour suivre l'état du tissu cérébral après ischémie que ce soit chez le rat adulte ou rat nouveau-né. Parmi les résultats intéressants, Sizonenko et al. ont montré en 2007 gliale [Sizonenko et al. 2007 ] que, suite à une hypoxie-ischémie le cortex subissait une modification de son organisation (orientation principale et valeur propre radiale) ainsi que des différences liées à la maturation cérébrale. Par ailleurs Wang et al. ont étudiés, en 2009 [Wang et al. 2009 ], l'impact de l'hypoxie-ischémie sur la matière blanche. Ils ont mis en évidence, chez les animaux lésés, une diminution de la fraction d'anisotropie et une augmentation de la valeur propre radiale liées à une moindre myélinisation dans les structures étudiées.

## **Protocole expérimental**

### Animaux

Pour cette étude, nous avons travaillé avec des rats de souche Wistar (Janvier, le Genest-St-Isle, France) âgés de 7 jours (p7) à 21 jours. Les rats, arrivés par portée naturelle (9-12 animaux) âgés de 3 jours (p3), restent avec leur mère jusqu'à leur sevrage à p21, ils sont alors séparés d'elle et répartis selon leur sexe. Les animaux sont maintenus suivant un cycle jour/nuit de 12 heures/12 heures et ont eau et nourriture *ad libitum*. Les animaux présentant des signes de souffrance (perte de poids anormal après la chirurgie) ont été sacrifiés.

### Modèle d'ischémie

Le modèle d'ischémie focale transitoire choisi est dérivé de celui de Buchan [Buchan et al. 1992] adapté au rat nouveau-né. Il consiste en un clampage des deux artères carotides communes (ACC) pendant 50 minutes couplé à l'électrocoagulation de l'artère cérébrale moyenne (ACM). L'ensemble de la chirurgie est effectuée sous anesthésie : isoflurane 1-2% (50/50 O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O). Le maintien de la température corporelle est assuré par un matelas chauffant. Les étapes du protocole chirurgical sont décrites brièvement ici :

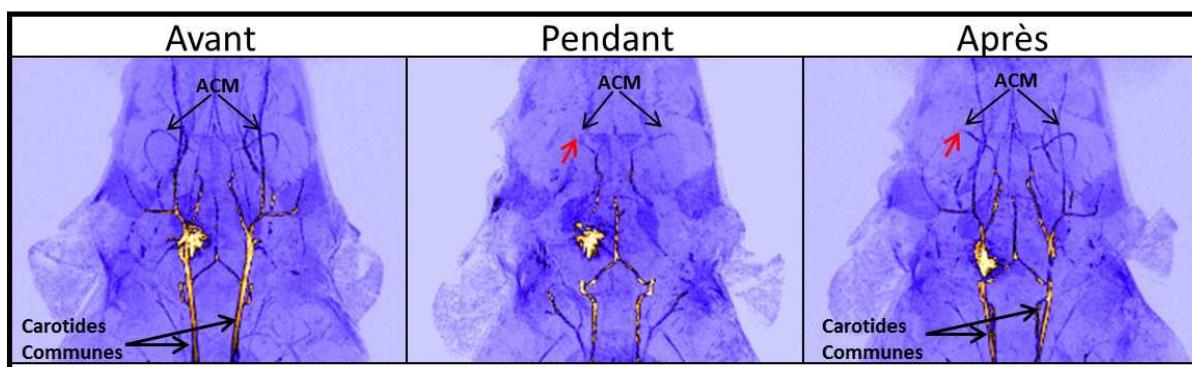


Figure 1 : Projections d'angiographies 3D réalisées avant pendant et après chirurgie. La flèche rouge indique le site de l'électrocoagulation de l'artère cérébrale moyenne gauche (ACM). Pendant le clampage des carotides communes celles-ci disparaissent totalement de l'image.

Les animaux sont anesthésiés puis placés sur le dos, une incision est pratiquée le long de la trachée puis l'ACC est exposée et son clampage par fil préparé. L'animal est ensuite positionné sur le côté droit, une seconde incision est effectuée entre l'œil et l'oreille. Afin d'accéder à l'ACM on effectue une craniotomie, une électrocoagulation l'ACM et on recoud la plaie. Les deux ACC sont ensuite clampées pendant 50 minutes. Puis on retire les fils servant au clampage, on vérifie la recirculation et on recoud la plaie.

Les images d'angiographie présentées dans la Figure 1 montrent les trois étapes de la chirurgie provoquant la lésion ischémique. Ces images sont des projections coronales d'images acquises avec une séquence d'écho de gradient 3D optimisée pour la mise en évidence des vaisseaux sanguins. Une saturation a été appliquée au niveau des bulbes olfactifs afin de supprimer le signal veineux. Ces acquisitions n'ont été réalisées qu'une fois afin d'illustrer le modèle d'ischémie utilisée.

-Avant clampage et électrocoagulation : Les deux artères cérébrales moyennes (ACM) ainsi que les carotides communes sont visibles.

-Pendant le clampage et après l'électrocoagulation : La partie externe de l'ACM gauche a disparue (signe de l'efficacité de l'électrocoagulation), les 2 carotides communes également.

-Après déclampage des carotides : Les carotides communes sont de nouveau visibles alors que la partie externe de l'ACM gauche ne l'est pas.

### Groupes d'animaux / Chronologie

Le protocole expérimental a été découpé en trois fenêtres d'observation :

-p7 : Jour d'induction de l'ischémie.

*Vérification de la localisation de la lésion ischémique.*

On acquiert des cartes d'ADC pour les rats opérés, ischémiques et contrôles (shams), afin d'évaluer la lésion. Un ensemble d'images de DTI est acquis chez les rats sains.

-p14 : *Evaluation de l'impact de l'ischémie sur le tissu cérébral.*

Tous les groupes de rats sont imaged selon les deux techniques : MEMRI et DTI.

-p21 : *Evaluation à moyen terme de l'impact de l'ischémie sur le tissu cérébral.*

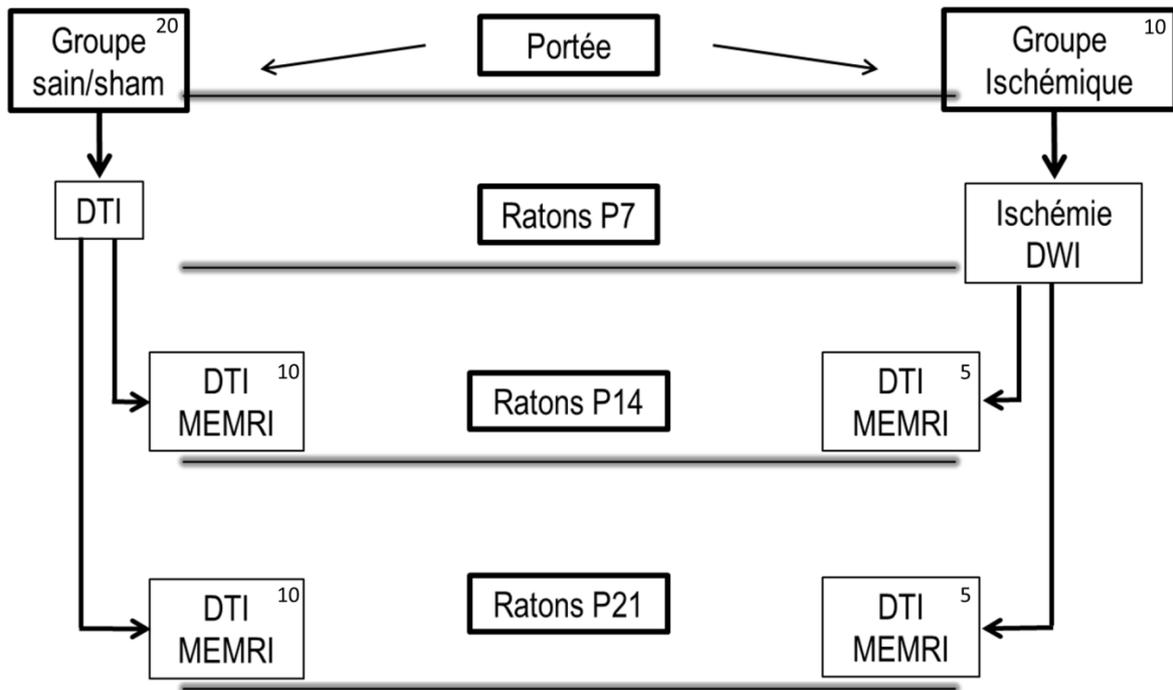


Figure 2 : Schéma représentant la chronologie des expériences réalisées ainsi que la répartition d'une portée dans les groupes : ischémique, sham et sain. Les chiffres présents dans les angles supérieurs gauches représentent la répartition des animaux dans les différents groupes pour un nombre initial de rats nouveau nés égal à 30.

Tous les groupes de rats sont imagés selon les deux techniques : MEMRI et DTI.

Nous avons sélectionné ces fenêtres d'observation, car durant ces deux semaines, le tissu cérébral est soumis à des modifications importantes liées à sa maturation : synaptogénèse, myélinisation, apoptose et neurogénèse. Le déroulement de ces processus peut être modifié par l'ischémie et ses conséquences : mort cellulaire, inflammation, réparation. Les modifications anatomo-fonctionnelles ainsi induites sont potentiellement détectables par notre protocole.

Par ailleurs, nous avons choisi de ne pas injecter de manganèse aux mêmes animaux à p14 et p21 afin d'éviter toute influence de la première injection sur les résultats de la deuxième. C'est pour cette raison que chaque groupe a été divisé en 2, le premier suivra le protocole MEMRI à p14 alors que le second le suivra à p21. La chronologie des expériences est schématisée par la Figure 2.

Les animaux sont divisés en trois groupes :

- 1 : Groupe ischémique : animaux opérés à p7 selon le modèle d'ischémie
- 2 : Groupe sham : animaux opérés, carotides dégagées mais pas clampées et craniotomie effectuée mais pas d'électrocoagulation de l'ACM.
- 3 : Groupe sain

### Matériel

L'ensemble des acquisitions a été effectué à 7 Teslas. L'aimant horizontal (Oxford, Royaume-Uni) est interfacé à une console Avance II (Bruker, Allemagne). Le système de gradient utilisé est blindé et présente un diamètre intérieur de 9cm, une intensité maximale de 364mT/m et un temps de montée de 100 $\mu$ s (Bruker, Allemagne). L'imageur est piloté à partir du logiciel Paravision dans ses versions 5.0 puis 5.1 (Bruker, Allemagne).

Les bobines utilisées sont de type « bird-cage »: des bobines de 1,8cm et 3,6cm de diamètre intérieur ont été respectivement utilisées pour les acquisitions à p7 et p14-21. Le choix des antennes RF a été optimisé en fonction du volume de l'échantillon par rapport aux antennes disponibles.



### Positionnement des animaux dans l'aimant

Pour l'examen IRM les animaux sont anesthésiés à l'isoflurane, 2% pour l'induction et 1% pour le maintien de l'anesthésie, dans un mélange 80/20 Air/O<sub>2</sub>.

Une fois anesthésiés les animaux sont placés dans des berceaux adaptés à leur taille et à l'antenne utilisée. Les 3 berceaux nécessaires aux différentes tailles de rats n'existant pas, il a fallu les créer à partir d'un berceau « souris » (rats p7) et d'un berceau « rat » (p14 et p21). Pendant les différentes acquisitions le rythme respiratoire des animaux est monitoré et l'anesthésie ajustée. Un système de chauffage à eau est utilisé afin de maintenir la température corporelle des animaux.

### Choix des paramètres généraux d'imagerie:

De façon générale les paramètres d'imagerie ont été choisis dans le but d'obtenir la meilleure qualité d'image possible tout en limitant les temps d'acquisition. Nous avons limités les temps d'examen IRM pour deux raisons. Premièrement, les animaux étant opérés (ischémie, sham ou injection de manganèse) et imagés le même jour, il est donc important de minimiser les temps d'anesthésie. Deuxièmement, les animaux étant étudiés à des âges précis et provenant de la même portée des acquisitions trop longues auraient rendu impossible l'étude d'un nombre suffisant d'animaux par portée et donc augmenté fortement le nombre de portées nécessaires. Ceci est surtout critique pour l'étude MEMRI demandant 4 acquisitions par animal le même jour. Pour ce faire nous avons choisi des séquences rapides (RARE, EPI), et adapté leurs paramètres s.

Nous avons choisi des champs de vue de 20\*20mm et 30\*30mm afin d'éviter les artefacts de repliements liés à un champ de vue restreint. Les tailles de matrices et les épaisseurs de coupe utilisées sont un compromis entre la résolution de l'image et le rapport signal sur bruit (SNR). Classiquement la matrice utilisée est de 256\*256, nous l'avons réduite à 128\*128 dans le cas de l'imagerie de diffusion à cause du faible SNR obtenu pour ce type d'images.

Pour les images anatomique, nous avons opté pour un temps d'écho de 50ms, combiné à un TR de 4 secondes, permettant une bonne pondération T2 à 7 Teslas.



## **Partie 2 : Lésion ischémique**

Pour notre étude il est très important que la lésion ischémique soit limitée au cortex gauche et ne s'étende pas dans la zone S1 (zone sensorimotrice principale) du cortex en vue de l'injection de de manganèse 7 ou 14 jours plus tard. Afin de vérifier la présence et l'étendue de la lésion ischémique, nous avons imagé les rats p7 opérés quelques minutes après la fin de l'opération. Après leur réveil, nous les avons replacés dans leur cage avec leur mère. Le protocole complet : rat retiré à sa mère, opéré, imagé puis remis auprès d'elle dure moins de 2 heures.

### 1- Imagerie

Le protocole d'imagerie consiste en un ensemble d'images de positionnement, une acquisition anatomique et une acquisition pondérée en diffusion pour le calcul de cartes d'ADC.

Paramètres d'imagerie :

Images anatomiques : séquence RARE, TR/TE : 4000/50ms, FOV : 20\*20mm, matrice 256\*256, 10 coupes de 1mm d'épaisseur, 3 accumulations, Tacq : 6min 24s.

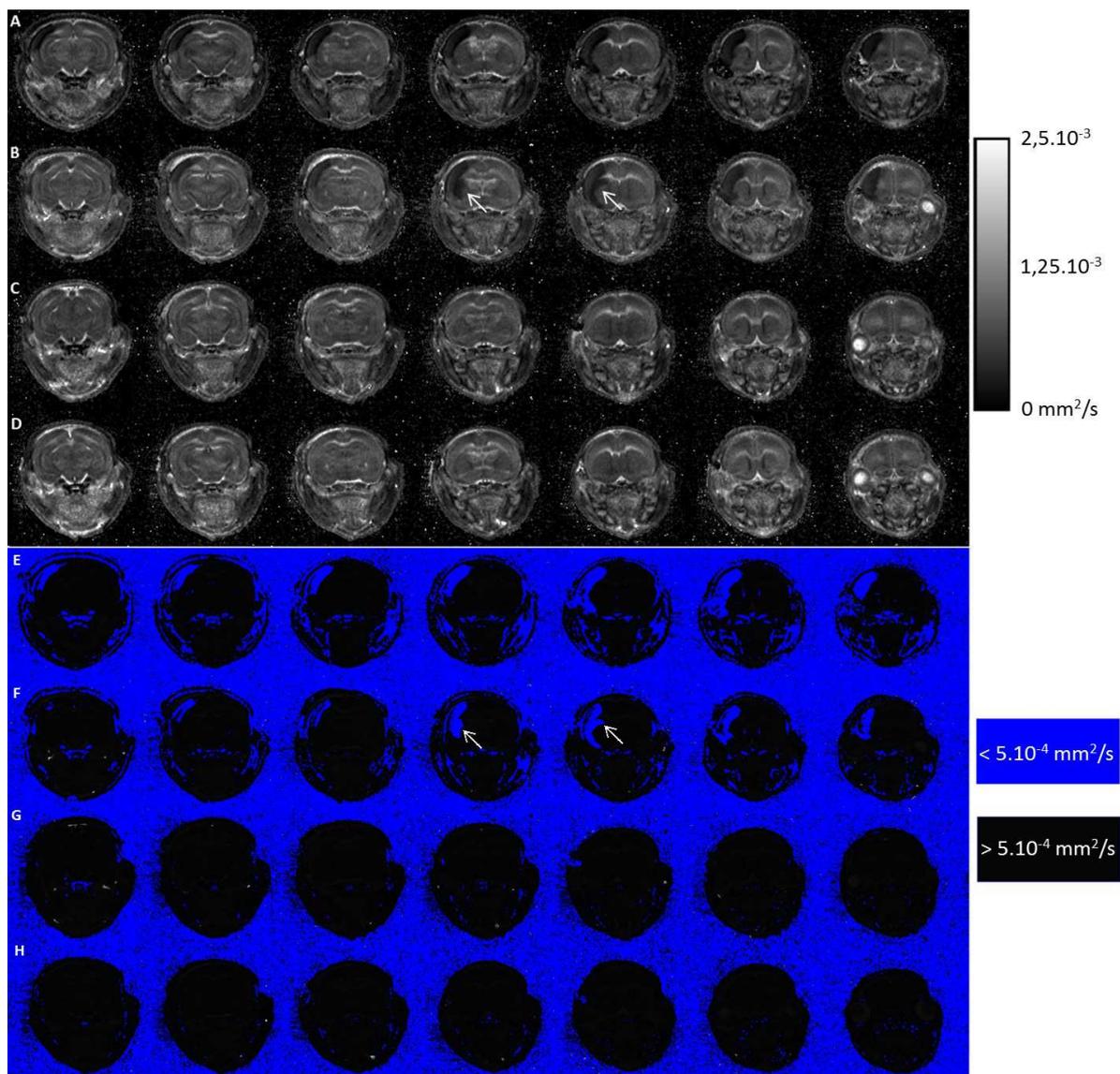
Cartes d'ADC : séquence DWI-EPI, TR/TE : 4000/29ms, FOV : 20\*20mm, matrice 256\*256, 10 coupes de 1mm d'épaisseur, valeurs de B : 50-500-1000-1250-1500-2000 s/mm<sup>2</sup> , Tacq : 3min44s.

Quelques minutes après la reperfusion, l'imagerie de diffusion permet de mettre en évidence l'œdème cytotoxique. Le volume obtenu est représentatif de la lésion ischémique finale [Fau et al. 2008]. Sur les cartes d'ADC l'œdème apparaît en hyposignal. Le gonflement cellulaire restreint le volume extracellulaire ce qui diminue la diffusion de l'eau et donc la valeur d'ADC dans la zone.

Les cartes d'ADC ont été calculées avec le logiciel Paravision utilisant la formule standard :

$$\text{Log}(S/S_0) = -B * \text{ADC}$$

Avec S le signal obtenu, S<sub>0</sub> le signal sans pondération en diffusion, B la valeur de B.



**Figure3:** Images obtenues à partir d'acquisitions pondérées en diffusion de cerveau de rats p7. ABCD : cartes d'ADC, EFGH : images obtenues par seuillage à  $5.10^{-4} \text{ mm}^2/\text{s}$  des cartes d'ADC. A et E: cas d'un rat ischémique présentant une lésion restreinte au cortex, B et F : cas d'un rat ischémique présentant une lésion corticale et striatale, C et G : série d'images représentatives du groupe sham et D et H : série d'images représentatives du groupe sain.

Afin de visualiser de façon claire et reproductible l'étendue de la lésion révélée par les cartes d'ADC, un niveau seuil a été déterminé. Les voxels présentant une diffusivité inférieure à ce seuil sont considérés comme appartenant à la lésion. Le seuil a été fixé à  $5.10^{-4}$  mm<sup>2</sup>/s, cette valeur correspond à la plus basse valeur d'ADC rencontrée chez le rat p7 sain.

Nous avons aussi suivi l'évolution de la lésion ischémique à p14 et p21 grâce aux images anatomiques pondérées T2 acquises dans le cadre des imageries MEMRI et DTI.

## 2- Résultats

Les rats présentant une lésion s'étendant à l'extérieur du cortex gauche, touchant la partie S1 du cortex gauche ou n'ayant pas de lésion ont été écartés de l'étude. Aucun animal du groupe sham n'a manifesté de lésion.

La Figure 3 présente sous 2 formes, dans 4 cas différents, des cartes d'ADC (7 coupes jointives). A, B, C et D : cartes en niveau de gris avec l'échelle correspondante, E, F, G et H : cartes seuillées à  $5.10^{-4}$  mm<sup>2</sup>/s. Avec :

-A : Cas d'un rat p7 retenu pour l'étude. Il présente un œdème cytotoxique limité au cortex gauche et ne s'étendant pas au futur site d'injection de manganèse.

-B : Cas d'un rat non retenu. La lésion s'étant à une partie du striatum (flèches blanche).

-C : Cas d'un rat du groupe sham, aucun signe de lésion, La carte d'ADC du cerveau est symétrique (hémisphère droit/gauche)

-D : Cas d'un rat du groupe sain. Comme attendu il n'y a aucun signe de lésion.

La figure 4 montre A : 7 coupes pondérées T2 d'un rat sain, B et C 7 coupes pondérées T2 et les cartes d'ADC correspondantes d'un rat ischémique. Les images pondérées T2 du rat sain sont caractéristiques d'un cerveau immature, où le contraste entre la matière blanche et la matière grise est très faible. On remarque aussi, que dans le cas du rat ischémique, un œdème est discernable en pondération T2 révélant la présence d'un œdème vasogénique. Les faibles valeurs d'ADC révélant la présence de l'œdème cytotoxique.

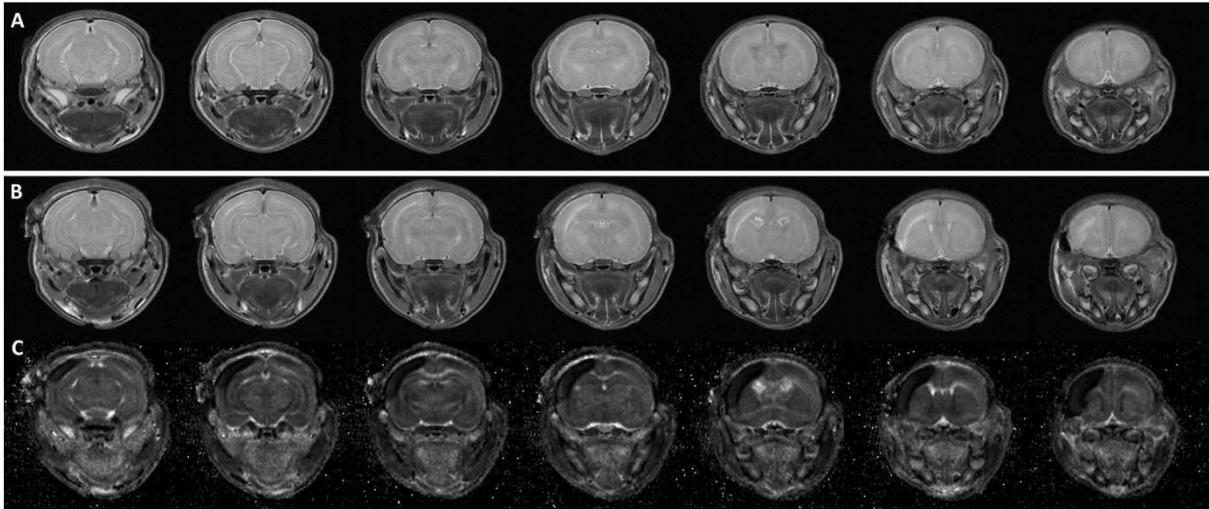


Figure 4 : A images anatomiques pondérées T2 d'un rat sain (entre bregma -7,04mm et bregma + 1,60mm, référence chez l'adulte). B, C dans la même zone, images pondérées T2 et cartes d'ADC correspondantes d'un rat ischémique (30 min après ischémie) révélant la présence d'œdèmes vasogénique et cytotoxique corticaux.

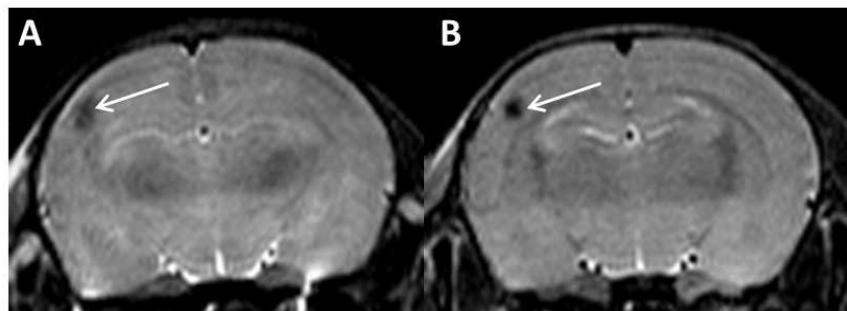


Figure 5 : Images anatomiques pondérées T2 d'un même rat ischémié, A : p14 et B : p21. Les flèches blanches pointent vers les zones en hypo-signal.

Les rats ischémiés présentent de façon général une réduction de l'épaisseur corticale ipsi-latérale, et, dans quelques cas, on observe aussi une hypertrophie des ventricules contralatéraux. La figure 5 présente un exemple caractéristique de l'évolution de la lésion entre p14 et p21. La zone en hypo-signal T2 située au niveau du cortex ipsi-latéral a été attribuée à la formation d'une cicatrice gliale comme rapporté précédemment [Schroeter et al. 2001, thèse de C. Po 2009, thèse A Bogaert 2007]. Cette cicatrice sépare le tissu lésé du tissu sain et à deux effets opposés: elle protège le tissu environnant mais empêche la récupération axonale.

### 3- Conclusion

Les cartes d'ADC calculées à partir des images pondérées en diffusion acquises après la chirurgie nous ont permis de vérifier l'étendue de l'œdème cytotoxique. Nous avons aussi observé la présence d'un œdème vasogénique grâce aux images pondérées T2 dans la quasi-totalité des cas. 96% des animaux opérés ont présenté une lésion ischémique, 4,7% ont été écartés de l'étude à cause de la présence d'une lésion ischémique dans des structures non désirées. Aucun animal du groupe sham n'a présenté de lésion détectable que ce soit sur les cartes d'ADC ou les images pondérées T2.



### **Partie 3 : Imagerie renforcée par le manganèse : MEMRI**

Pour les expériences MEMRI divers éléments ont été mis au point et testés. Tout d'abord la solution de manganèse et ses propriétés ont été étudiées, puis les différents paramètres de l'injection ajustés. Nous avons ensuite mis au point la méthode de mise en évidence du transport du manganèse.

#### 1- Solution injectée

Nous avons choisi d'injecter une solution de chlorure de manganèse ( $MnCl_2$ ) à 50mM, au pH et à l'osmolarité physiologique : pH=7,2 osmolarité=300 osm. Ce choix se base sur des travaux de Canals et al. Publiés en 2008 [Canals et al. 2008]. Ils ont montré qu'une solution présentant un pH ou une osmolarité non physiologique peut endommager les cellules environnant le site d'injection et donc compromettre l'internalisation et le transport du manganèse. Les volumes injectés, 160nL à p14 et 180nL à p21 correspondent à 0.08nmol et 0.09nmol de manganèse, ce qui est inférieur au seuil de toxicité pour une injection intracérébrale [Canals et al. 2008].

La solution injectée est obtenue à partir d'une solution tampon de tris/HCl à 10mM ajustée au pH de 7,2, à laquelle on ajoute 50mM de  $MnCl_2$  tétrahydraté (Fisher Scientifique, R-U) et 75mM de NaCl afin d'ajuster l'osmolarité de la solution au 300osm physiologiques.

Nous avons ensuite caractérisé les paramètres de relaxivité de cette solution. Les constantes de relaxivités  $r_1$  et  $r_2$  ont été calculées en effectuant les mesures simultanément sur 9 solutions obtenues en faisant varier la concentration en manganèse par dissolution de la solution injectable dans son propre tampon.

solution	0	1	2	3	4	5	6	7	8
[Mn] en mM	0	0,005	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2	0,5	1

Le fantôme utilisé pour l'imagerie est constitué d'un tube Falcon de 50mL dans lequel ont été disposés 9 tubes remplis des différentes solutions. Le Falcon a ensuite été rempli de gel d'agarose à 5% afin de stabiliser les tubes et minimiser les artéfacts de susceptibilité. Nous avons utilisé une séquence d'écho de spin avec 7 TR différents (100-5000ms) et 7 TE différents (11-77ms) pour calculer les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  des 9 solutions. (Voir Chapitre 1 partie IV)

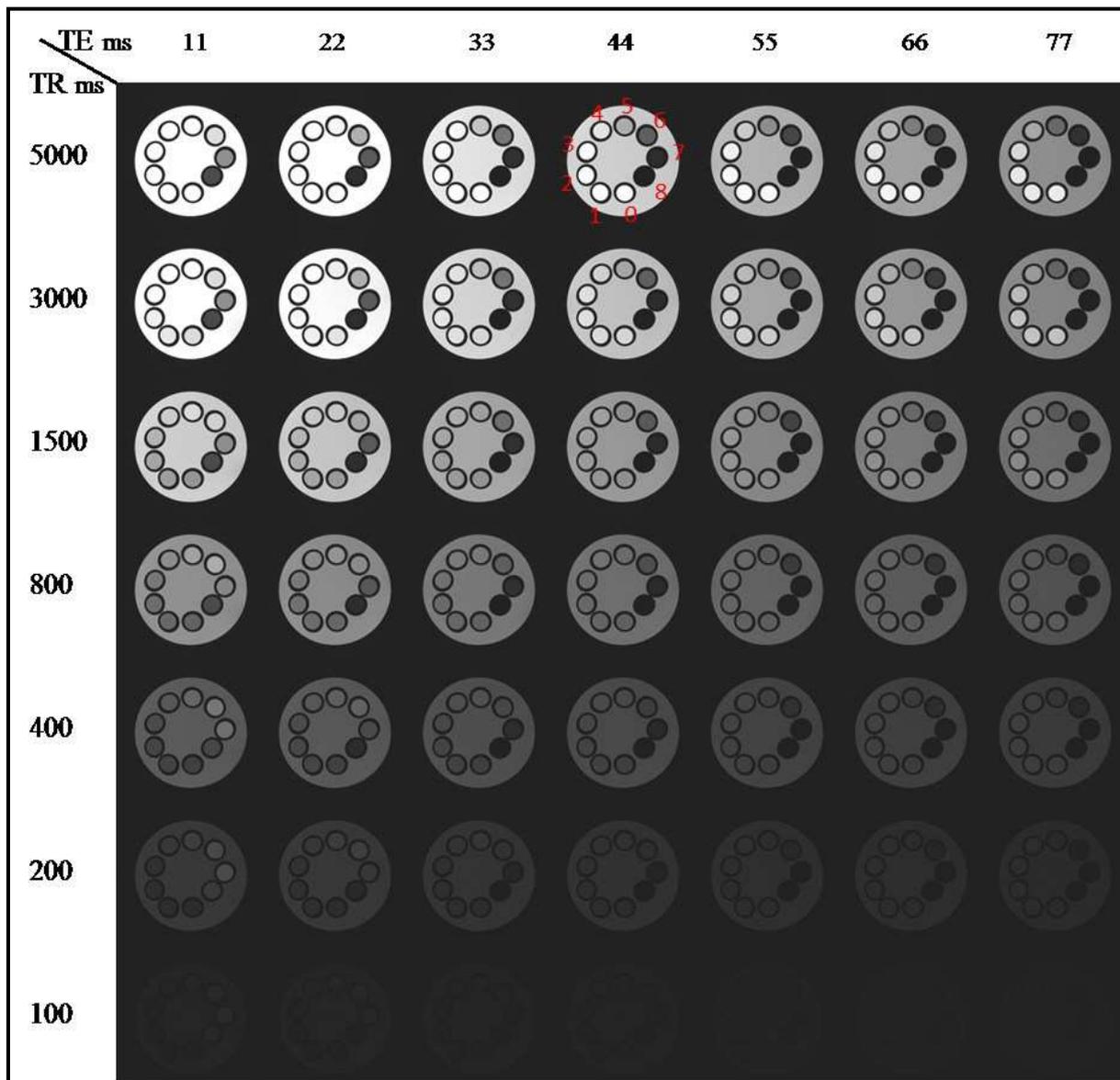


Figure 6 : Images du fantôme composée de 9 solutions de différentes concentrations en manganèse : 0=0, 1=0.005mM, 2=0.01mM, 3=0.02mM, 4=0.05mM, 6=0.2mM, 7=0.5mM et 8=1mM. Colonnes = différents TR et lignes = différents TE.

Des Régions d'Intérêts (ROI) ont été tracées au niveau de chaque tube pour le calcul des temps de relaxation T1 et T2.

La [figure 6](#) présente les images obtenues. Le tableau ci-dessous récapitule les paramètres extraits de ces images : T1, écart type du T1 dans la ROI et 1/T1, T2, écart type du T2 dans la ROI et 1/T2.

<b>solution</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>[Mn] en mM</b>	0	0,005	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2	0,5	1
<b>T1 ms</b>	2771	2513	2347	2011	1429	958	538	269	143
<b>Ecart type</b>	48	34	34	24	16	10	5	4	3
<b>1/T1 s<sup>-1</sup></b>	0,36	0,39	0,42	0,49	0,70	1,04	1,85	3,71	6,98
<b>T2 ms</b>	351	285	240	170	96	55	28	14	8
<b>écart type</b>	48	38	24,2	11	4	2	1	1	1
<b>1/T2 s<sup>-1</sup></b>	2,84	3,50	4,16	5,87	10,38	18,11	35,31	71,02	112,18

Les cartes de T1 et de T2 de ce fantôme sont présentées au niveau de la [figure 7](#), respectivement en a et b.

La [figure 8](#) regroupe les courbes ayant servies au calcul des relaxivités r1 et r2. Les 2 solutions les plus concentrées en manganèse (0,5 et 1mM) n'ont pas été utilisées pour le calcul du r2. En effet, pour ces 2 solutions pour lesquelles le T2 est court, l'écart type du T2 calculée est supérieur à 5%, cette non homogénéité étant due au faible rapport signal sur bruit obtenu.

Les relaxivités calculées dans ces conditions sont  $r1 = 6,6 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  et  $r2 = 162 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . La relaxivité r2 du manganèse est importante. Cependant, *in vivo* à 7T, les temps de relaxation T2 du tissu cérébral sont déjà courts et l'influence du manganèse restera modérée. Par ailleurs, dans le cas d'images pondérées T2, cette influence se traduit par une perte du signal (par raccourcissement du T2) ce qui est plus difficile à caractériser qu'une augmentation de signal dans le cas de l'imagerie T1, augmentation suffisante pour bien identifier les zones concernées.

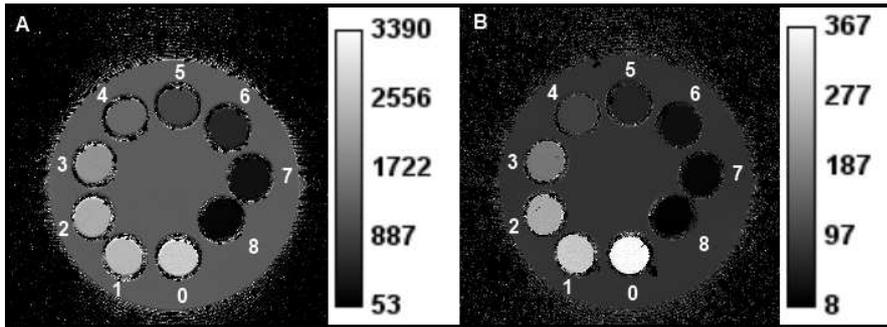


Figure7: Cartes T1 (A) et T2 (B) du fantôme. Concentration en manganèse : 0=0, 1=0,005mM, 2=0,01mM, 3=0,02mM, 4=0,05mM, 6=0,2mM, 7=0,5mM et 8=1mM

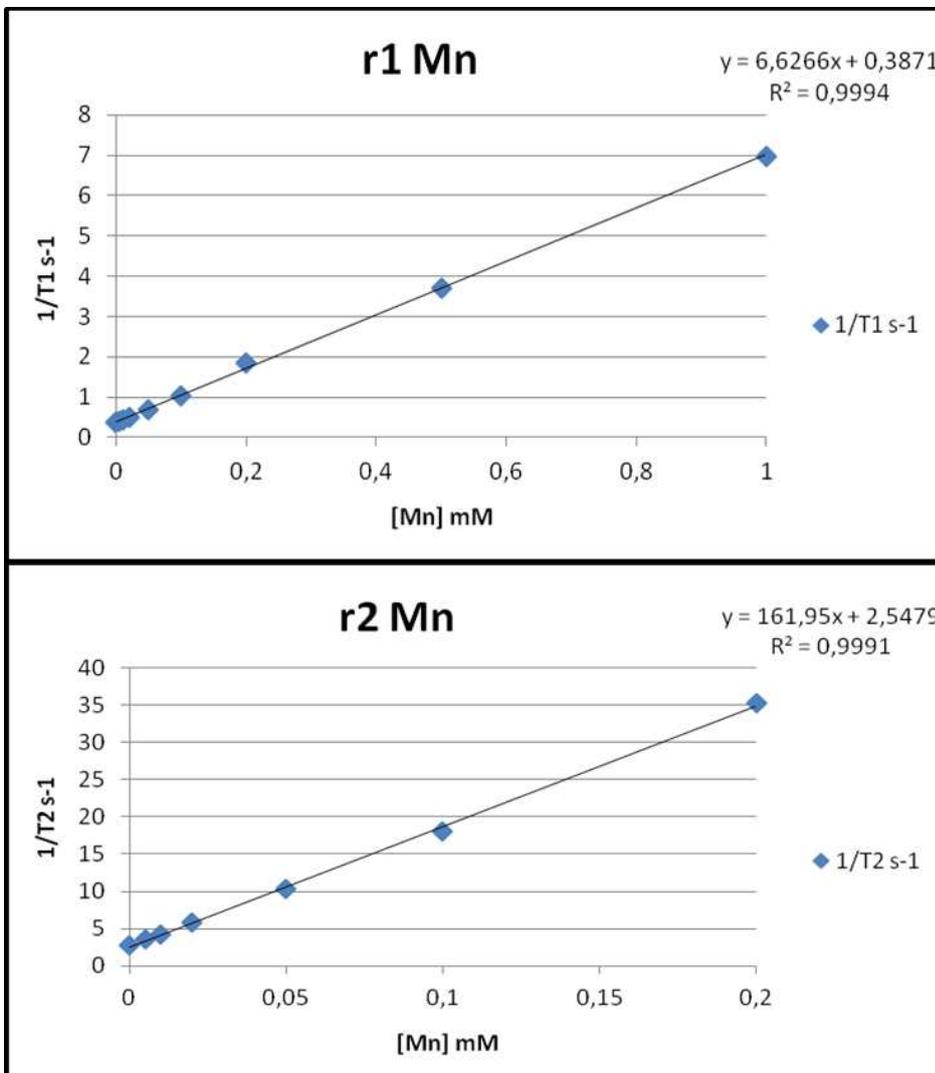


Figure 8 : A : courbe de l'évolution de la valeur 1/T1 en fonction de la concentration en manganèse. B : courbe de l'évolution de la valeur 1/T2 en fonction de la concentration en manganèse.

## 2- Injection du manganèse

La cible de l'injection du manganèse est le cortex sensorimoteur 1. Compte tenu de la croissance des animaux nous avons adapté le site d'injection et le volume injecté en fonction de l'âge. Le volume de solution injectée est de 160nL pour les animaux âgés de 14 jours et de 180nL pour ceux âgés de 21 jours. Cette légère différence de volume a pour but de garder un rapport bolus sur taille du cerveau similaire. Nous avons adapté les repères macroscopiques servant à l'injection stéréotaxique en nous basant sur l'atlas de Paxinos et Watson et sur des images anatomiques acquises en pondération T2. Les repères déterminés sont les suivants :

- p14 : écart par rapport au lambda = -5 mm, déplacement latéral = 3 mm.
- p21 : écart par rapport au lambda = -6 mm, déplacement latéral = 3 mm.

L'injection est réalisée sous anesthésie gazeuse (isoflurane 2% dans 50/50 O<sub>2</sub>/NO<sub>2</sub>). Les rats sont tout d'abord placés dans un système stéréotaxique. Pour cela nous avons modifié le système stéréotaxique du rat afin de l'adapter à la morphologie des animaux immatures. Après incision du scalp l'os est fraisé à l'emplacement déterminé ci-dessus. Une aiguille d'injection (0,3\*13mm) est ensuite introduite jusqu'à une profondeur de 1mm sous la surface du cerveau. La solution est injectée à un débit de 0,02µL/min. à l'aide d'un pousse seringue et d'une micro-seringue Hamilton de 25µL permettant une grande précision du volume injecté. La seringue Hamilton est reliée à l'aiguille d'injection par un cathéter (diamètre interne = 0,38mm). A la fin de l'injection, l'aiguille est laissée en place pendant 10 minutes afin de minimiser les risques de perte de solution lors de son extraction. Après suture de la peau du crane les rats sont placés dans des cages individuelles pour leur réveil puis remis dans leur cage avec leur mère.

## 3- Choix des temps d'acquisition

Bien que le consensus en matière de temps d'observation après injection intra cérébrale de manganèse soit de 24 heures nous avons opté pour des observations très précoces et suivies. Le protocole d'imagerie MEMRI est réalisé avant injection ainsi que 2, 5 et 24 heures après injection. Les acquisitions précoces, bien que très demandeuses en terme d'efficacité d'extraction de l'information ( faible rehaussement du signal) dû au faible temps laissé au manganèse pour être transporté vers sa zone cible (les noyaux thalamiques), visent à mettre en

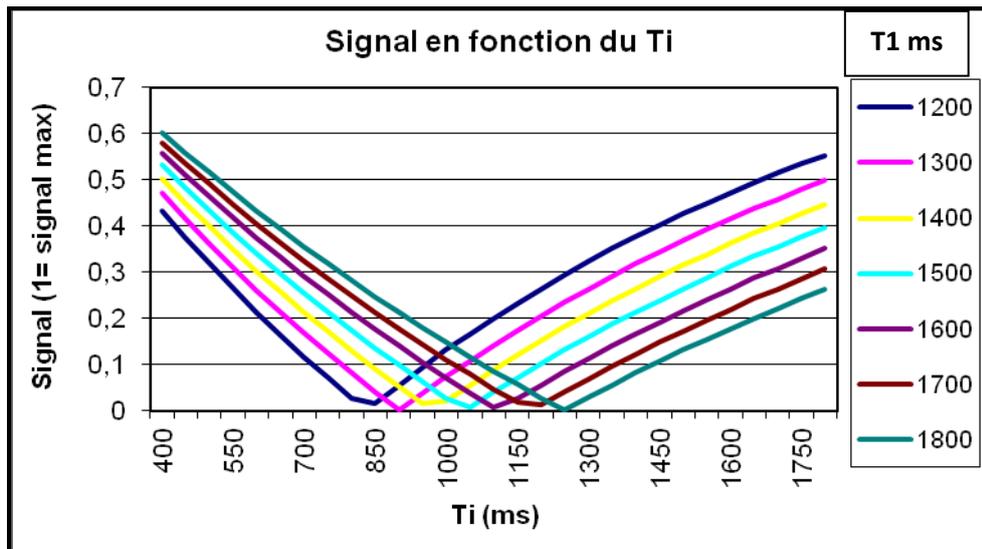


Figure 9 : Simulation de l'évolution du signal en fonction du Temps d'inversion (Ti) de la séquence et du T1 de l'objet étudié.

évidence la dynamique du transport et non à obtenir seulement une information générale. De plus ces temps courts permettent de s'affranchir presque totalement de la diffusion non spécifique du manganèse dans le tissu cérébral.

Nous avons choisi 2 heures pour le premier temps d'acquisition après injection afin de laisser le temps à l'animal de récupérer après la chirurgie, et au manganèse d'être transporté. Le deuxième temps d'observation choisi est 5 heures après injection. Il permet d'établir la dynamique du transport du manganèse en comparant le rehaussement obtenu à ce moment-là avec celui à 2 heures. Ces temps d'observation ont été choisis après plusieurs tests : 2, 3, 5, 7 heures, 2 et 5 heures étant apparus comme les plus efficaces.

Les sessions d'acquisition IRM ont été limitées à 30 minutes afin de minimiser au maximum les temps d'anesthésie après injection. En effet l'anesthésie gazeuse (par isoflurane) provoque l'amnésie, l'inconscience et l'immobilité en influant principalement sur le transport synaptique mais aussi sur le transport axonal [Larrabee et Posternak, 1952]. Ces phénomènes pourraient potentiellement limiter le transport du manganèse pendant notre fenêtre d'étude et donc aller contre le but premier de nos expériences MEMRI.

#### 4- Méthode de suivi du manganèse

L'objectif pour le suivi de l'hyper-signal généré par le manganèse est d'être capable de comparer les différents groupes, pour cela la méthode ne doit pas induire de différences entre animaux.

Nous avons tout d'abord étudié la possibilité de réaliser des cartes de T1. Dans ce cas, toute normalisation intra ou inter individus est inutile car inhérente au calcul de cartes. A partir de ces cartes, il est possible de déterminer la quantité de manganèse présente dans les structures étudiées, à condition d'avoir au préalable calculé la relaxivité du manganèse *in situ*, par exemple en combinant cartes T1 et spectrométrie de masse [Chuang et al.2010].

Compte tenu de notre objectif, acquisition multi-coupes bien résolues, l'utilisation d'une telle approche ne nous a pas semblé adéquate, vu les contraintes liées à l'acquisition de cartes T1.

Nous avons donc opté pour l'acquisition d'images pondérées T1. Toutefois, utiliser une séquence d'écho de spin est trop gourmand en termes de temps d'acquisition et possède des problèmes vis-à-vis d'une acquisition multi-coupes. En effet une sélection de coupe imparfaite modifie la relaxation des spins extérieurs à cette coupe. L'acquisition d'images de saturation -

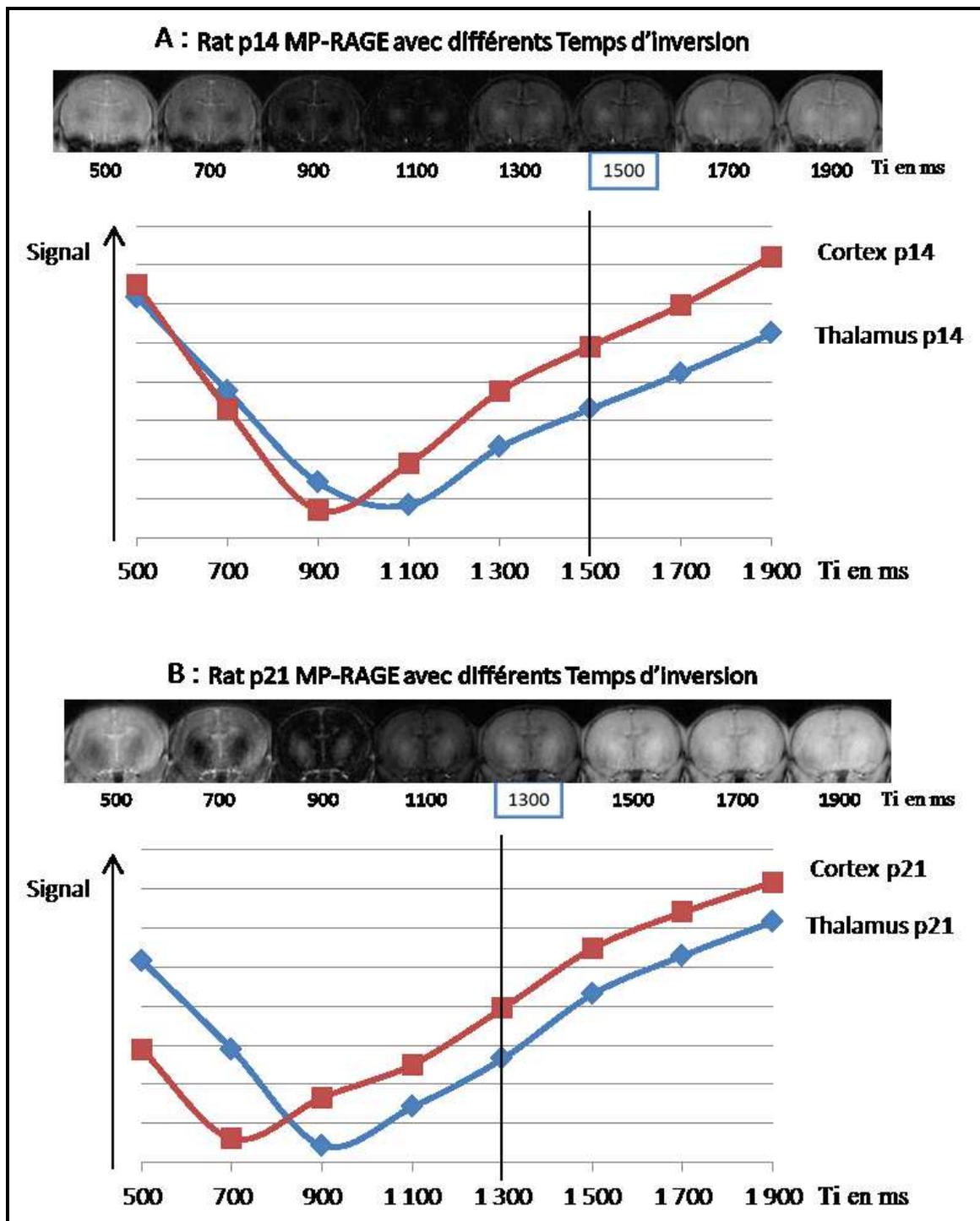


Figure 10 : évolution du signal en fonction du temps d'inversion  $T_i$  chez le rat p14 (A) et p21 (B).

récupération obtenues en écho de gradient et en utilisant différents angles pour l'impulsion d'excitation a été testée, mais ne permettait pas d'obtenir une précision suffisante. Durant ce travail de thèse, des techniques rapides de cartographie T1 multi-coupes ont été développées puis implémentées sur notre système mais trop tardivement pour être utilisées pour cette étude.

Nous avons donc préféré utiliser une séquence pondérée T1 basée sur l'inversion-récupération puis mettre au point le traitement des images afin d'être capable de réaliser le suivi du transport du manganèse le long de la voie cortico-thalamique. La séquence utilisée est la MP-RAGE (voir Chapitre 1 partie IV), elle repose sur un module d'inversion récupération couplé à une acquisition de type FLASH.

Après ajustement des paramètres nous avons acquis, en 16 minutes, des images avec une bonne résolution autorisant une bonne différenciation des zones contenant du manganèse. Les paramètres TR, TE, alpha et temps de segments ont été ajustés afin d'optimiser le rapport signal sur bruit puis le choix du temps d'inversion ( $T_i$ ) a été étudié.

Cette optimisation est très importante car elle nous a permis de travailler avec temps d'acquisition court et donc compatible avec notre protocole de suivi précoce du manganèse.

Durant la maturation cérébrale les différents temps de relaxation T1 des tissus cérébraux se raccourcissent. Afin d'obtenir des résultats comparables à p14 et p21 il est donc nécessaire d'ajuster le  $T_i$  en fonction de l'âge. De manière générale, lors d'une expérience d'inversion récupération, il est possible d'obtenir une annulation du signal ayant un T1 donné en choisissant le bon  $T_i$  (Figure9). Cette particularité est utile pour, par exemple, annuler le signal du liquide céphalorachidien. Mais, dans notre cas, une variation non linéaire du signal en fonction d'un raccourcissement du T1 provoquerait des erreurs d'évaluation du transport du manganèse. Afin d'éviter ce problème nous avons choisi des temps d'inversion plus longs que ceux pouvant annuler le signal dans nos tissus cibles (thalamus et cortex) :  $T_i=1500\text{ms}$  à p14 et  $T_i=1300\text{ms}$  à p21.

La figure 10 présente des images obtenues en faisant varier le  $T_i$  et les courbes correspondantes de variation d'intensité du signal au niveau du cortex et du thalamus pour des rats de 14 jours (A) et 21 jours (B).



Afin de normaliser les images acquises nous avons choisi d'utiliser une référence externe. L'utilisation d'une référence interne a d'abord été envisagée, soit le muscle temporal soit une partie de l'hémisphère controlatéral. Nous avons éliminé l'hémisphère contro-latéral afin d'éviter toute influence d'un éventuel transport du manganèse vers cet hémisphère aux différents temps d'acquisition. Le muscle n'a pas été utilisé à cause de sa taille réduite chez les animaux à p14 ne permettant pas un bon relevé des intensités au niveau

des différentes coupes utilisées. La référence externe choisie est une solution de chlorure de manganèse tamponnée à un pH de 7,2 similaire à la solution injectée. La concentration en manganèse ( $50\mu\text{M}$ ) a été ajustée afin d'obtenir un signal proche de celui des tissus cérébraux sur les images pondérées T1 acquises à p14 ou p21. Deux tubes remplis de cette solution ont été placés au-dessus du crâne des rats et fixés au berceau.

## 5- Imagerie

Le protocole d'acquisition MEMRI consiste en 4 sessions identiques réalisées avant puis à 2, 5 et 24 heures après injection de la solution de chlorure de manganèse. Lors de chaque session trois types d'images sont acquis : images de positionnement, image anatomiques pondérées T2 et images pondérées T1. L'ensemble d'une session IRM dure approximativement 30 minutes.

Paramètres d'imagerie :

Images anatomiques : séquence RARE, TR/TE : 4000/50ms, FOV : 30\*30mm, matrice 256\*256, 20 coupes de 0,5mm d'épaisseur, 3 accumulations, Tacq : 6min24s.

Images pondérées T1 : séquence MP-RAGE, TR/TE : 4500/15ms, 4 segments de 960ms, angle : 20° FOV : 30\*30mm, matrice 256\*256, 20 coupes de 0,5mm d'épaisseur, 2 accumulations, Temps d'inversion : p14=1500ms p21=1300ms, Tacq : 16min24s.

## 6- Traitements des images

Le but du traitement des images du protocole MEMRI est d'obtenir des valeurs normalisées de l'intensité du signal dans les zones thalamiques du tractus cortico-thalamique. Un point essentiel est que la zone observée soit toujours la même en fonction du temps. Une étape de co-registation est essentielle pour minimiser les erreurs commises lors de la sélection des

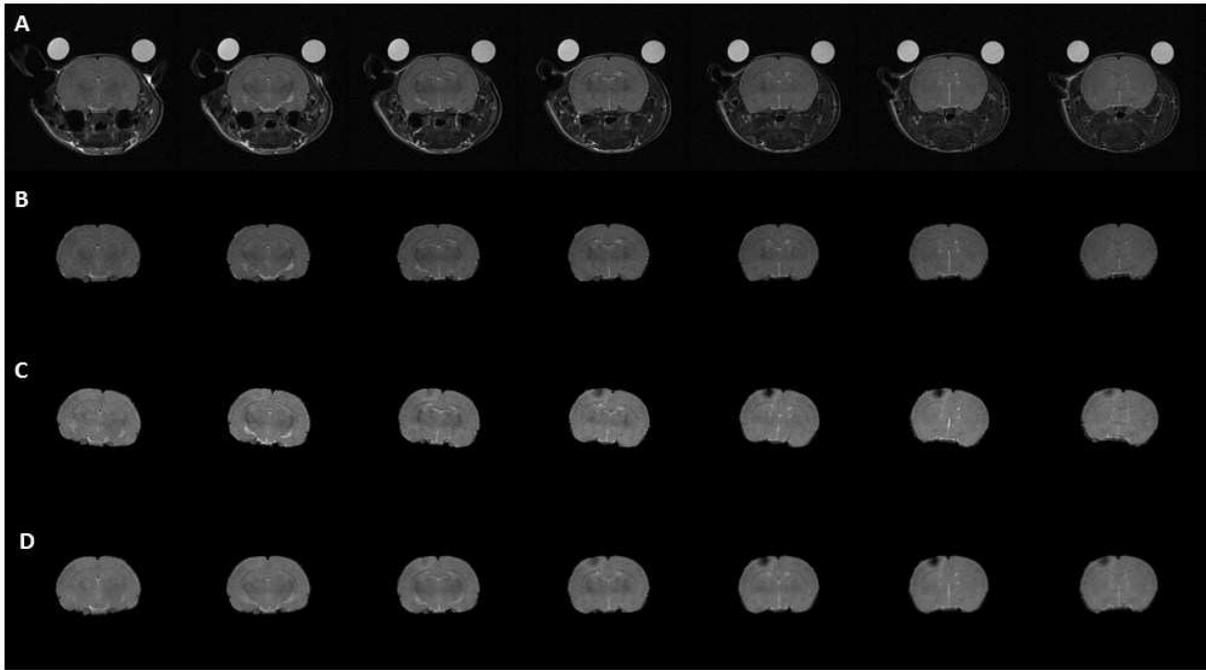


Figure 11 : Exemples d'images issues des étapes liées au traitement des images pour le MEMRI. A : images anatomiques à T0, B : images anatomiques à T0 après extraction du cerveau, C : images anatomiques à T5 après extraction de cerveau et D : images anatomiques à T5 après co-registration avec T0.

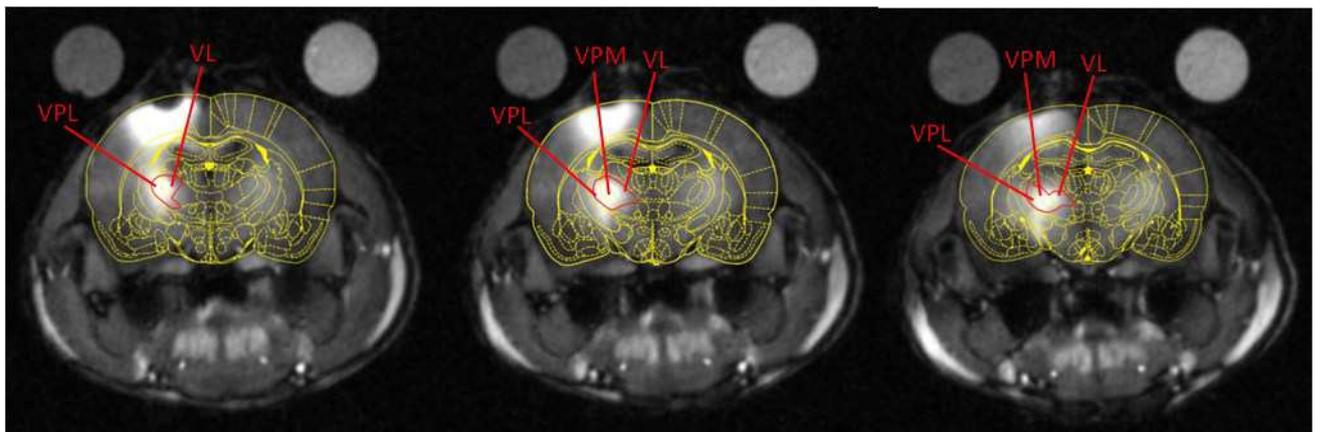


Figure 12 : Les ROIs utilisées pour le suivi du transport du manganèse vers les noyaux thalamiques sont dessinées en rouge, les trois coupes utilisées sont présentées avec les données de l'atlas de Paxinos superposées en jaune. VL : noyau thalamique ventrolatéral, VPL : noyau thalamique postérolatéral ventral et VPM : noyau thalamique postéromédial ventral.

régions d'intérêts. De cette manière une même ROI est utilisée pour chacune des 4 sessions. Nous avons envisagé de co-registrer l'ensemble des animaux mais compte tenu des modifications anatomiques, variables d'un animal à l'autre, que l'ischémie peut provoquer nous avons opté pour un traitement individuel de chaque rat.

De façon schématique : les images anatomiques après injection (T2, T5 et T24) sont co-registrés avec celles avant injection (T0), la co-registation est ensuite appliquée aux images pondérées T1. Puis on trace les régions d'intérêts (ROI) pour chaque animal. Enfin on relève l'intensité du signal dans ces ROIs pour chacune des sessions. En pratique, la co-registation intra-individu a été effectuée à l'aide des outils BET (Brain Extraction Tool) et FLIRT (FMRIB's linear image registration tool) qui font partie de FSL (FMRIB Software Library v4.0). Les images anatomiques d'un animal sont co-registrées de manière rigide à l'image anatomique avant injection. Dans un premier temps le cerveau est extrait des images en utilisant l'outil BET, cette étape permet de limiter le volume à co-registrer et d'empêcher les tissus mous extérieurs au cerveau d'interférer avec la co-registation. Les images, se limitant maintenant au cerveau sont co-registrées et la matrice de déformation sauvegardée. Les différentes translations (3) et rotations (3) sont ensuite appliquées aux images pondérées T1. (Figure 11)

Les régions d'intérêts nécessaires à notre méthode sont : (Figure 12)

-les zones thalamiques du tractus cortico-thalamique : noyau thalamique ventrolatéral (VL), noyau thalamique postéromédial ventral (VPM) et noyau thalamique postérolatéral ventral (VPL) (dans l'hémisphère ipsilatéral à l'injection et à l'ischémie). Les noyaux thalamiques sont sélectionnés grâce à une ROI par coupe sur trois coupes consécutives. Par ailleurs, deux ROIs sont tracées au niveau des tubes servant de référence externe pour chaque coupe correspondant à une ROI thalamique. Les valeurs issues des références sont ensuite moyennées coupe par coupe. Les ROIs ont été tracées de façon précise afin de limiter l'influence du transport de manganèse provenant d'autres zones corticales liés à la diffusion du manganèse au niveau du site d'injection.

L'étape suivante consiste en une normalisation intra-animale des valeurs de signal issues des ROI thalamiques en les divisant par celle des références. Le calcul est effectué coupe par coupe puis on moyenne afin d'obtenir le résultat le plus fidèle possible :

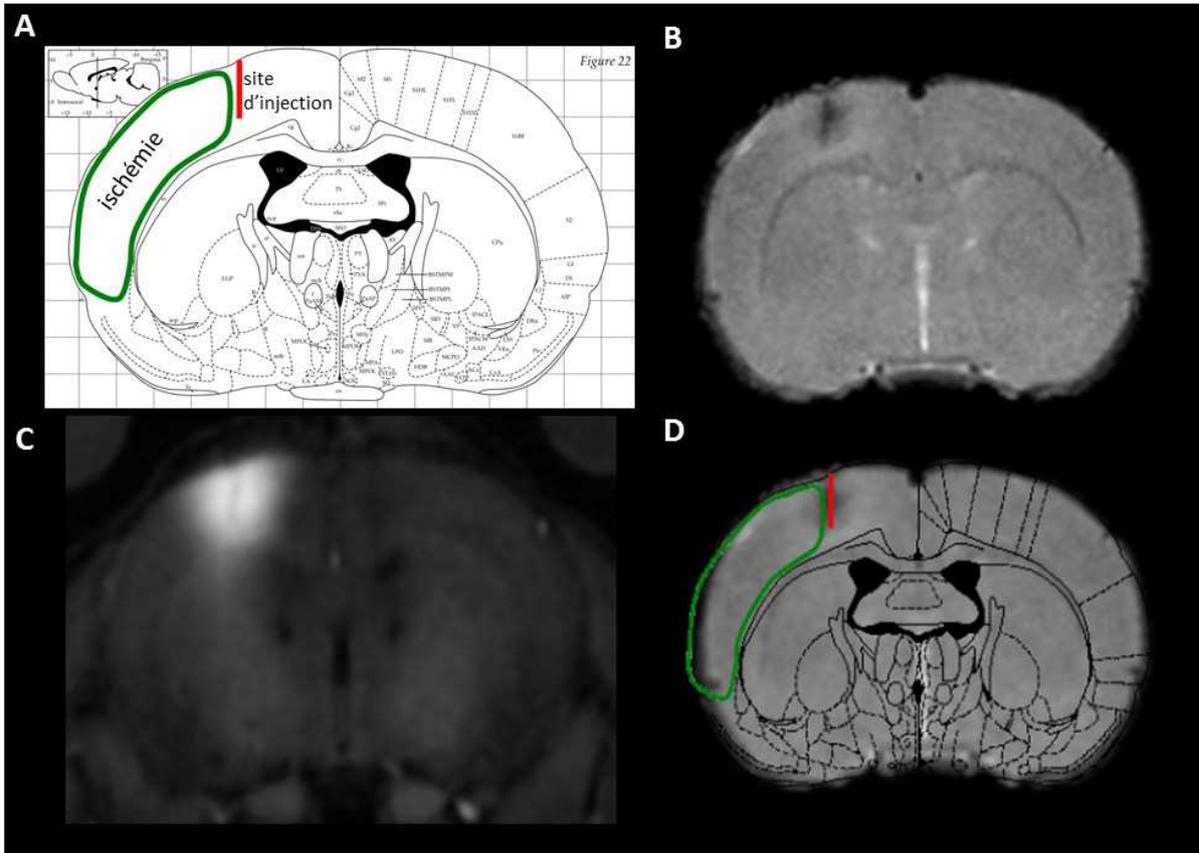


Figure 13 : A : images issues de l'atlas de Paxinos de la coupe correspondant au site d'injection, en vert est indiqué le site de la lésion ischémique du modèle utilisé et en rouge le site d'injection du manganèse. B et D: image anatomique pondérée T2 d'un rat p21 du groupe ischémique 5 heures après injection, avec sur D la superposition d'un calque anatomique. C : image pondérée T1 correspondant à l'image B.

$$A_i = \frac{S_{thi}}{S_{refi}}$$

$$M = (\sum_{i=1}^3 A_i) / 3$$

Avec  $A_i$  signal normalisé de la coupe  $i$ ,  $S_{thi}$  signal thalamique de la coupe  $i$ ,  $S_{refi}$  signal des références de la coupe  $i$  et  $M$  la moyenne des signaux normalisés.

Ces valeurs normalisées sont calculées pour chaque session IRM. Afin de pouvoir faire directement une comparaison inter-animale ces valeurs sont une nouvelle fois normalisées : Le résultat obtenu pour chacune des sessions est divisé par celui obtenu avant injection :

$$ST_x = \frac{MT_x}{MT_0}$$

Avec  $ST_x$  la valeur finale pour la session  $T_x$ ,  $MT_x$  la moyenne des signaux normalisés de la session  $T_x$  et  $MT_0$  la moyenne des signaux normalisés de la session  $T_0$ .

Les valeurs obtenues pour les différentes sessions d'imagerie ( $T_0$ ,  $T_2$ ,  $T_5$  et  $T_{24}$ ) permettent d'obtenir un profil normalisé de l'augmentation du signal lié au transport du manganèse en fonction du temps.

Les différents résultats ont été testés statistiquement à l'aide de tests de type : Student t-test avec comme paramètre de rejet  $P > 0,05$ . Les groupes sain et ischémique ont été comparés au groupe sham servant de groupe de référence.

## Résultats

Que ce soit à p14 ou p21, les rats sont imagés avant injection de manganèse pour acquérir les images de référence. Deux heures après injection de la solution de chlorure de manganèse le deuxième set d'images pondérées T1 est acquis. Ce premier contrôle après injection nous permet d'évaluer si l'injection s'est déroulée correctement :

- *au niveau du site d'injection* : localisation de la trace de l'aiguille sur les images anatomiques.

- *au niveau du bolus* : on vérifie la présence et la taille du bolus sur les images MEMRI.

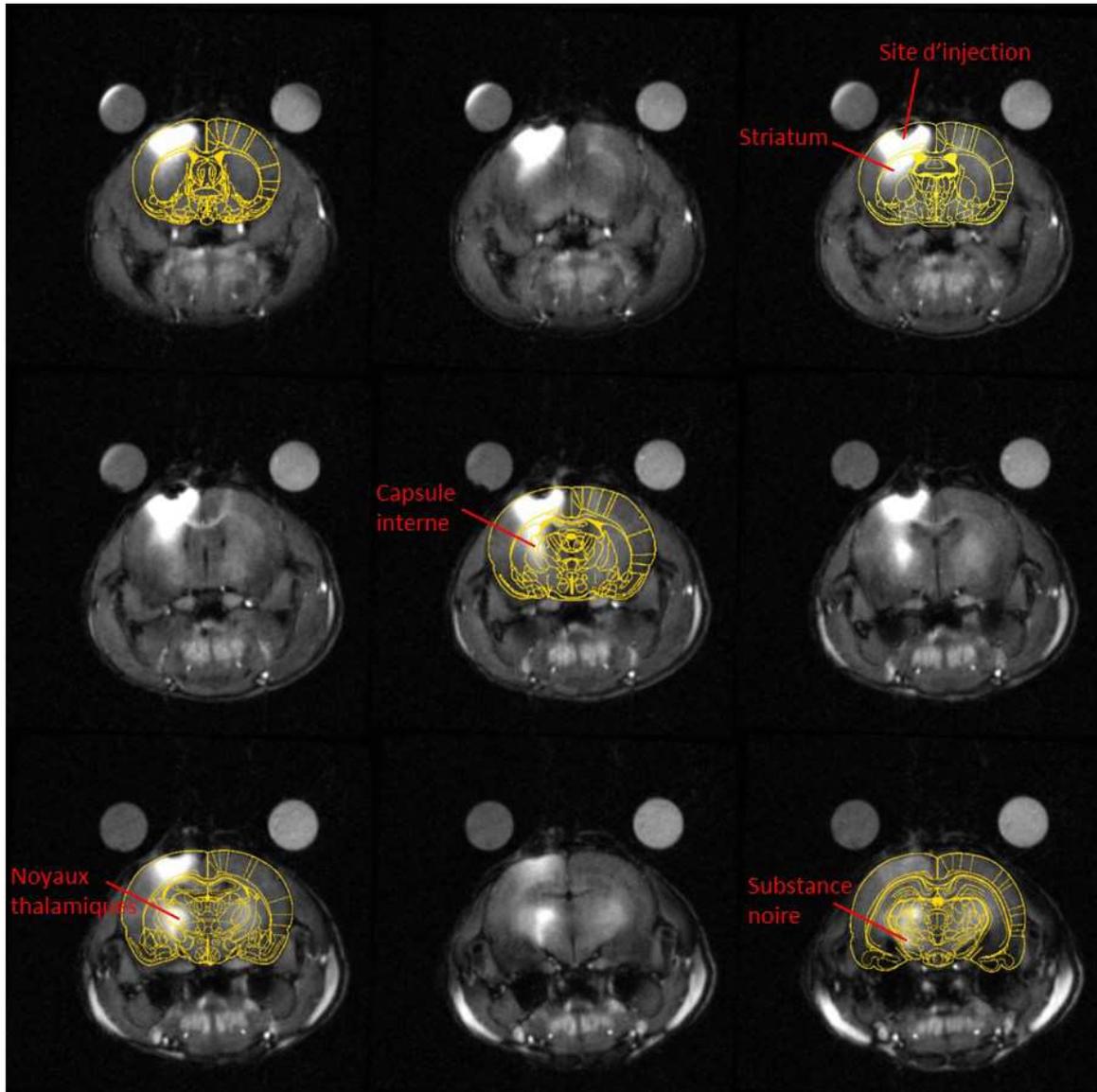


Figure14: 9 coupes consécutives d'un cerveau de rat p21 du groupe sain acquises 5 heures après injection. Un masque issu de l'atlas de Paxinos est superposé à 5 d'entre elles afin d'identifier les régions présentant un hyper signal.

Si le site d'injection n'est pas bon ou si le bolus est peu ou pas visible, le rat est éliminé de l'étude. Sur 38 rats injectés 4 ont été écartés à cause du site d'injection et 3 à cause de l'absence de bolus.

La [figure 13](#) présente le site d'injection : le site choisi est décrit sur une coupe de l'Atlas de Paxinos, cette image est superposée à une image *in vivo* acquise sur un rat p21 ischémique 2 heures après injection. Le bolus correspondant, révélé par imagerie pondérée T1, est aussi identifiable.

Le protocole MEMRI est reproduit 5 et 24 heures après injection. Après la dernière série d'acquisition les animaux sont sacrifiés par overdose d'isoflurane.

La [figure 14](#) présente le trajet du manganèse après son injection intra-corticale. Comme attendu, partant du site d'injection, le manganèse traverse le striatum jusqu'à la capsule interne, et arrive ensuite au niveau des noyaux thalamiques (VL, VPL et VPM) puis de la substance noire.

La [figure 15](#) montre l'évolution des images pondérées T1 liée au transport et à la diffusion du manganèse jusqu'à 24 heures après injection. Pour les 4 temps d'observation, sont représentées les trois coupes contiguës utilisées pour les relevés d'intensité au niveau du thalamus, en A pour un rat p14 du groupe ischémique et en B pour un rat p14 du groupe sain.

Dès 2 heures après injection le transport du manganèse vers le thalamus est visible. L'intensité du signal au niveau des régions d'intérêt thalamiques augmente avec le temps. On remarque, à T24, une répartition quasi uniforme de l'hyper signal au niveau du cortex ipsilatéral, ainsi qu'un rehaussement global du signal dans le cerveau, signe de la diffusion "passive" du manganèse.

Aucune différence flagrante entre les animaux des différents groupes n'est directement visible dans une première approche qualitative. Pour affiner les résultats, nous avons réalisé une étude quantitative de suivi du rehaussement du signal au niveau des noyaux thalamiques.

Les deux graphiques composant la [figure 16](#) présentent l'évolution du rehaussement du signal normalisé au niveau de la zone d'intérêt chez les rats p14 (graphique A) et p21 (graphique B). Ces informations sont également regroupées dans les tableaux ci-dessous.



p14	T0	T2	sem	T5	sem	T24	sem
sains	1	1,211	0,054	1,397	0,073	1,504	0,066
shams	1	1,235	0,033	1,439	0,015	1,509	0,031
ischémiques	1	1,123	0,016	1,300	0,032	1,386	0,120

p21	T0	T2	sem	T5	sem	T24	sem
sains	1	1,247	0,055	1,580	0,020	1,618	0,015
shams	1	1,213	0,088	1,506	0,024	1,637	0,049
ischémiques	1	1,063	0,036	1,230	0,043	1,330	0,126

Les astérisques présents sur la [figure 16](#) indiquent une différence statistique entre le groupe ischémique et le groupe sham.

Les groupes des animaux témoins, shams et sains, ne présentent pas de différence que ce soit à p14 ou p21 ( $p > 0.3$ ) : ceci montre que l'opération subie par les animaux shams (exposition des carotides et craniotomie) n'a aucune conséquence sur le transport du manganèse entre le cortex somato-sensoriel et les noyaux thalamiques.

A p14, deux heures après ischémie, le rehaussement du signal est inférieur chez les animaux ischémiques comparé aux animaux témoins (12 % contre 22%). Avec une valeur de  $P=0,023$  la différence entre le groupe ischémique et le groupe sham est statistique. A T5 la différence est supérieure (30% contre 42%) et est une nouvelle fois statistique ( $P=0,015$ ). Au dernier temps d'observation, T24, bien qu'en moyenne la différence entre les témoins et les ischémiques soit importante : (29% contre 50%) la forte variabilité des données ne permet pas une différence statistique ( $P=0,424$ )

A p21, le comportement des différents groupes est similaire à celui observé chez les rats p14. Les animaux du groupe ischémique présentent un rehaussement du signal thalamique inférieur, 2 et 5 heures après injection. On peut noter une augmentation de la différence entre les groupes témoins et le groupe ischémique : à T2 6% contre 23% ( $P=0,002$ ) et à T5 23% contre 54% ( $P=0,002$ ). Comme à p14 après 24 heures la différence (33% contre 62%), principalement à cause d'une variabilité inter animaux importante n'est pas statistique  $P=0,094$ .

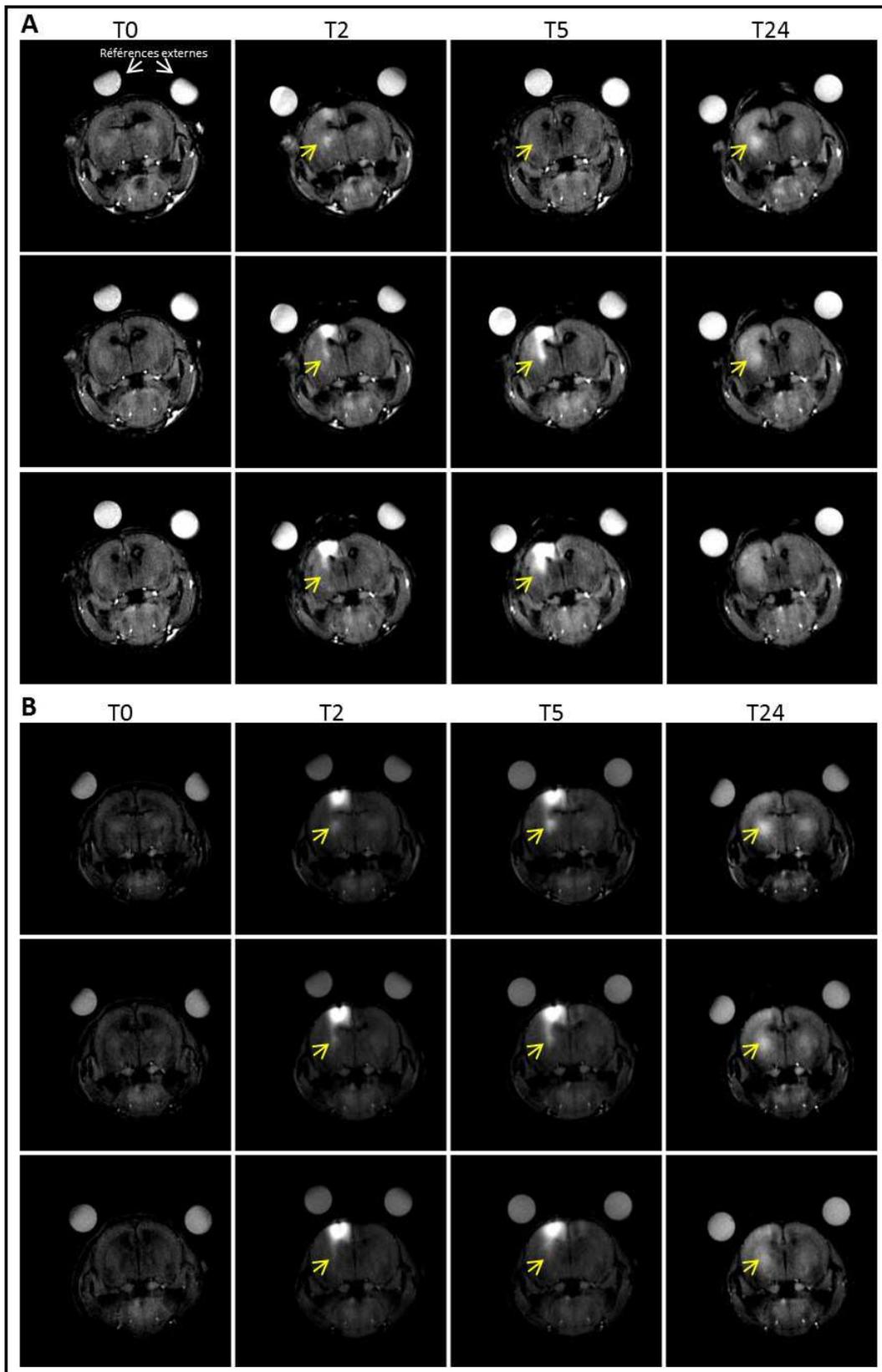


Figure 15: A rat p14 du groupe ischémique, B rat p14 du groupe sain. 3 coupes consécutives aux 4 temps d'observation (T0, T2, T5 et T24) sont présentées. Les flèches jaunes pointent vers les zones thalamiques montrant un hyper-signal lié au transport du manganèse.

L'analyse aux différents temps après injection de manganèse nous a permis de mettre en évidence une différence de rehaussement du signal dans les noyaux thalamiques entre animaux témoins et ischémiques. Une analyse en fonction de l'âge (entre p14 et p21) nécessite de prendre en compte la maturation cérébrale, donc des modifications des propriétés de relaxation du tissu cérébral. Notre approche d'optimisation du contraste T1 entre les temps d'étude p14 et p21 en ajustant le  $T_i$  nous a permis de comparer les valeurs de rehaussement de signal à ces 2 temps.

Ainsi, à p21, les rats témoins présentent un rehaussement du signal thalamique supérieur à celui observé à p14. Cet effet est plus particulièrement visible 5 heures après injection (p14 : 40%, p21 : 55%). Cette augmentation du signal liée au transport du manganèse vers cette structure est en accord avec la maturation cérébrale montrant une efficacité accrue du tractus cortico-thalamique à p21 en comparaison avec p14.

L'ensemble des valeurs présentées dans la [figure 16](#) ainsi que leur erreur standard à la moyenne sont regroupées en Annexe.

Dans le cas des rats ischémiques les rehaussements du signal thalamique obtenus sont du même ordre à p14 et p21, signe d'une certaine stagnation du développement du tractus cortico-thalamique. Ceci est confirmé par les écarts de rehaussement de signal (témoins/ischémiques) relevés à p21 par rapport à ceux relevés à p14. En effet l'écart passe de 10% à 17% pour T2 et de 21% à 29% pour T5

Conclusion : Pour pouvoir interpréter les résultats des expériences MEMRI, nous avons mis au point un approche quantitative du rehaussement du signal IRM dans les noyaux thalamiques permettant d'appréhender le transport cortico-thalamique chez les animaux témoins et ischémiés. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence, chez les animaux témoins, un accroissement du transport cortico-thalamique entre p14 et p21 en accord avec la maturation cérébrale. On observe parallèlement une réduction du transport cortico-thalamique chez les animaux ayant subi une ischémie 7 ou 14 jours avant l'injection de manganèse par rapport aux animaux témoins. Chez ces animaux, la maturation cérébrale ne semble pas modifier l'efficacité du transport cortico-thalamique qui reste dans un état quasi figé dans le groupe ischémique entre p14 et p21.

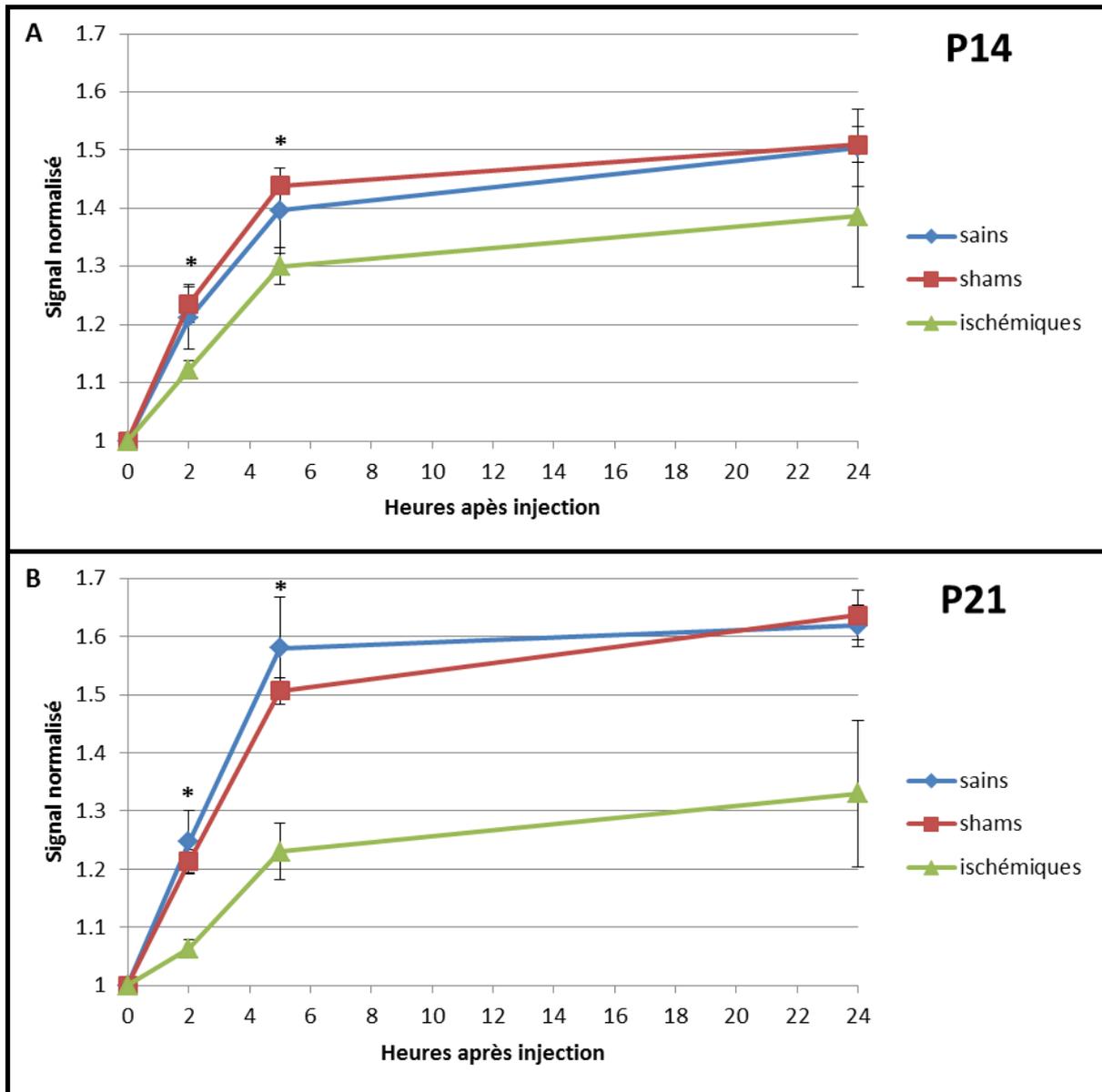


Figure 16 : Rehaussement du signal au niveau des noyaux thalamiques dans les différents groupes, A p14 et B p21. La variabilité est représentée à chaque point par des erreurs : +/- erreur standard à la moyenne. Les astérisques indiquent une différence statistique entre les animaux ischémiques et les animaux shams.

## **Partie 4 : Imagerie du tenseur de diffusion**

Notre objectif est ici d'utiliser le DTI pour suivre la maturation cérébrale des rats des différents groupes. Les cartes paramétriques calculées à partir des acquisitions de DTI, fraction d'anisotropie (FA), trace, valeur propre principale ( $\lambda$  parallèle) et valeur propre radiale ( $\lambda$  perpendiculaire), nous ont servi à étudier l'évolution du tissu cérébral des différents groupes de rat en fonction du temps.

Afin d'être compatible avec les acquisitions MEMRI le temps d'acquisition du protocole DTI a été limité à moins de 20 minutes. Compte tenu des faibles variations des paramètres de diffusion entre les différents temps d'observation et entre les groupes de rats, nous avons essayé d'optimiser la reproductibilité des mesures en nous assurant un rapport signal sur bruit important sur les images pondérées en diffusion. Nous avons aussi minimisé les déformations géométriques liées à l'acquisition rapide EPI et les courants de Foucault.

### Protocole

En prenant en compte les différentes caractéristiques souhaitées, nous avons mis au point une séquence pondérée en diffusion durant moins de 20 minutes avec les paramètres suivants :

- 30 directions différentes de diffusion ont été utilisées afin de définir au mieux le tenseur, elles sont issues de la publication de Jones [Jones et al.1999].
- L'acquisition d'un plan de Fourier complet est divisée en 4 segments afin de minimiser les déformations géométriques.
- Les temps d'application et d'espacement des gradients de diffusion sont :  $\delta=7$  ms et  $\Delta=14$  ms. Ces temps ont été optimisés afin d'obtenir une valeur de B de  $500 \text{ s/mm}^2$  sans provoquer d'artéfacts liés aux courants de Foucault ou tout autre problèmes lié à une chauffe du système de gradients.
- La valeur de B choisie est de  $500 \text{ s/mm}^2$ . Bien qu'il ait pu être intéressant d'utiliser une valeur plus élevée, nous avons fait le choix de privilégier le rapport signal sur bruit des images pondérées en diffusion afin de garantir un bon calcul des différentes cartes paramétriques aux différents temps d'observation.

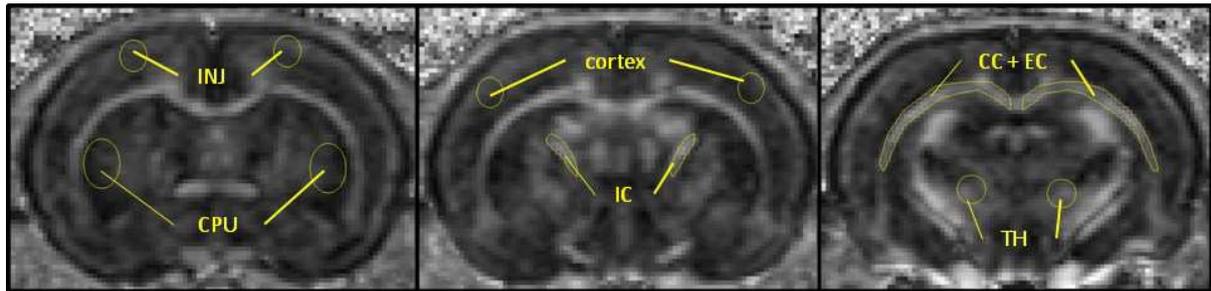


Figure 17 : Cartes de FA chez un rat p21 du groupe sain pour trois coupes consécutives. Les ROIs utilisées pour le suivi des différents paramètres sont présentées en jaune : INJ, site d'injection ; CPU, Caudate Putamen ; cortex ; IC, Capsule Interne ; CC + EC, Corps Calleux et Capsule Externe ; TH, noyaux thalamiques. Les coupes correspondent à Bregma -0,26mm, -0,92mm et -1,88mm chez le rat adulte.

Dans notre cas le temps d'observation à p14 est celui présentant les rapports signal sur bruit (SNR) les plus faibles. En effet, même si, à p7 la résolution des images est meilleure et la diffusivité de l'eau dans le cerveau plus grande qu'à p14, l'utilisation d'une antenne volumique de diamètre inférieur permet un meilleur rapport signal sur bruit. Dans le cas des images acquises à p21 le rapport signal sur bruit est légèrement meilleur qu'à p14 grâce à la diminution de la diffusivité de l'eau dans le cerveau.

Bien que le DTI soit une technique souvent utilisée, le SNR n'est pratiquement jamais donné dans la littérature. Les études se concentrant sur le SNR dans le cadre du DTI utilisent principalement les valeurs obtenues pour les images non pondérées en diffusion chez l'Homme [Landman et al. 2008]. Une étude récente a montré qu'un SNR de 20 ou supérieur permet un calcul sans biais de la fraction d'anisotropie [Lauzon et al. 2012].

Nous avons d'abord calculé le rapport signal sur bruit a sur un ensemble d'images préliminaires acquises à p14. Il correspond au rapport entre le signal moyen d'une petite zone du striatum (matière grise) et la déviation standard du bruit relevé dans une zone large et écartée de tout artéfact. Pour les images non pondérées en diffusion le SNR obtenu est de 50 et reste supérieur à 35 pour l'ensemble des images pondérées en diffusion. Ces valeurs de SNR nous ont paru compatibles avec nos objectifs, c'est-à-dire, ne pas introduire de biais lié au calcul des paramètres de DTI à partir d'images présentant des SNR différents.

Le protocole de DTI consiste en 2 acquisitions présentant une géométrie identique : un set d'images anatomiques et un set d'images pondérées en diffusion. Au premier temps d'observation seuls des rats p7 sains ont été utilisés afin de servir de référence à chacun des groupes. A p14 et p21 les animaux des trois groupes ont été utilisés pour l'acquisition d'images de DTI.

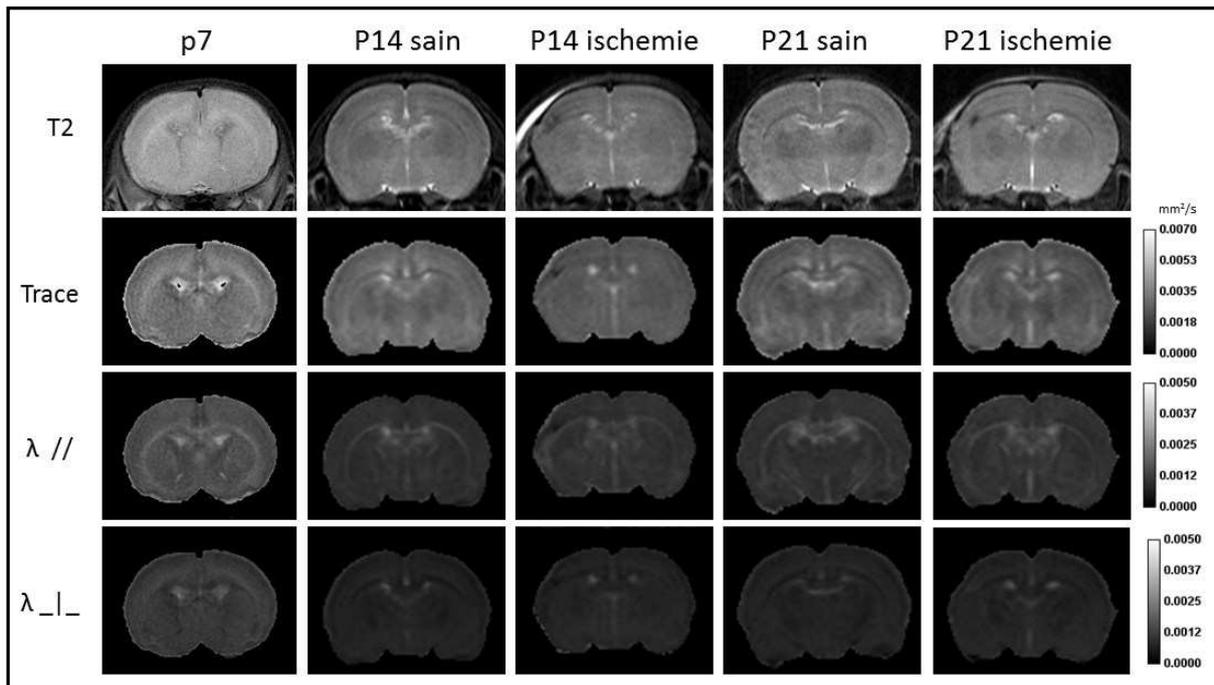


Figure 17 : Images pondérées T2 et cartes paramétriques de la trace, de la valeur propre principale ( $\lambda //$ ) et de la valeur propre radiale ( $\lambda \perp$ ) sur une coupe correspondant à Bregma -92mm chez le rat adulte dans 5 cas différents. Rat p7, rat p14 du groupe sain et du groupe ischémié et rat p21 du groupe sain et du groupe ischémié.

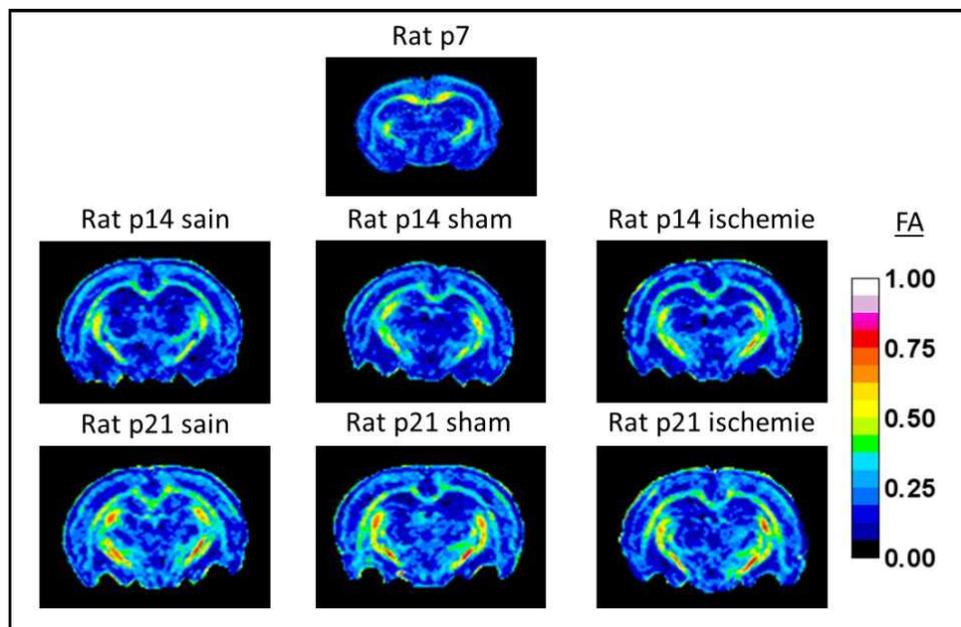


Figure18: Cartes de Fraction d'Anisotropie (FA) pour un rat de chaque groupe à chacun des temps d'observation. La coupe correspond à bregma -2,80mm chez le rat adulte.

### Suivi des paramètres de diffusion.

Les régions d'intérêts (ROI) utilisées pour les relevés des différents paramètres ont été tracées en accord avec l'atlas de Paxinos sur les images anatomiques puis reportées sur les cartes calculées :

-Matière grise : Cortex (site d'injection), Cortex, noyaux thalamiques et caudate putamen.

-Matière blanche : corps calleux/capsule externe et capsule interne.

Pour chaque structure une ROI est tracée dans les deux hémisphères afin d'étudier l'impact de l'ischémie en ipsi- et contro-latéral.

La figure 16 montre, les différentes ROI utilisées reportées sur des cartes de fraction d'anisotropie. Trois coupes consécutives ont été utilisées afin de suivre le tractus cortico-thalamique, permettant une comparaison avec les résultats de MEMRI.

Dans notre cas l'intérêt principal est l'évolution des différents paramètres :

-La fraction d'anisotropie donne une vue globale de la maturation cérébrale. Dans la zone cérébrale concernée, plus le tissu sera orienté dans une direction définie plus cette valeur sera proche de 1.

-La trace, équivalente au coefficient de diffusion apparent (ADC), informe sur la micro-structuration des tissus, plus l'espace extracellulaire sera faible plus cette valeur le sera aussi.

-Les valeurs propres principale ( $\lambda //$ ) et radiale ( $\lambda \perp$ ) renseignent aussi sur la diffusivité de l'eau dans les différentes structures. Pour la matière blanche le  $\lambda \perp$  pourrait se montrer intéressant en tant qu'indice de la myélinisation. [Song et al. 2002]

Les lots d'images de DTI présentant des artéfacts ont été écartés de l'étude. Le nombre de lots utilisés pour le moyennage des différentes valeurs obtenues à partir des ROIs est : à p7 n=6, à p14 animaux sains n=5, shams n=5 et ischémiés n=5, à p21 animaux sains n=5, shams n=5 et ischémiés n=5.

La figure 19a regroupe les courbes issues des différentes ROIs de la matière grise et la figure 19b regroupe celles issues des ROIs de la matière blanche.

## Matière grise

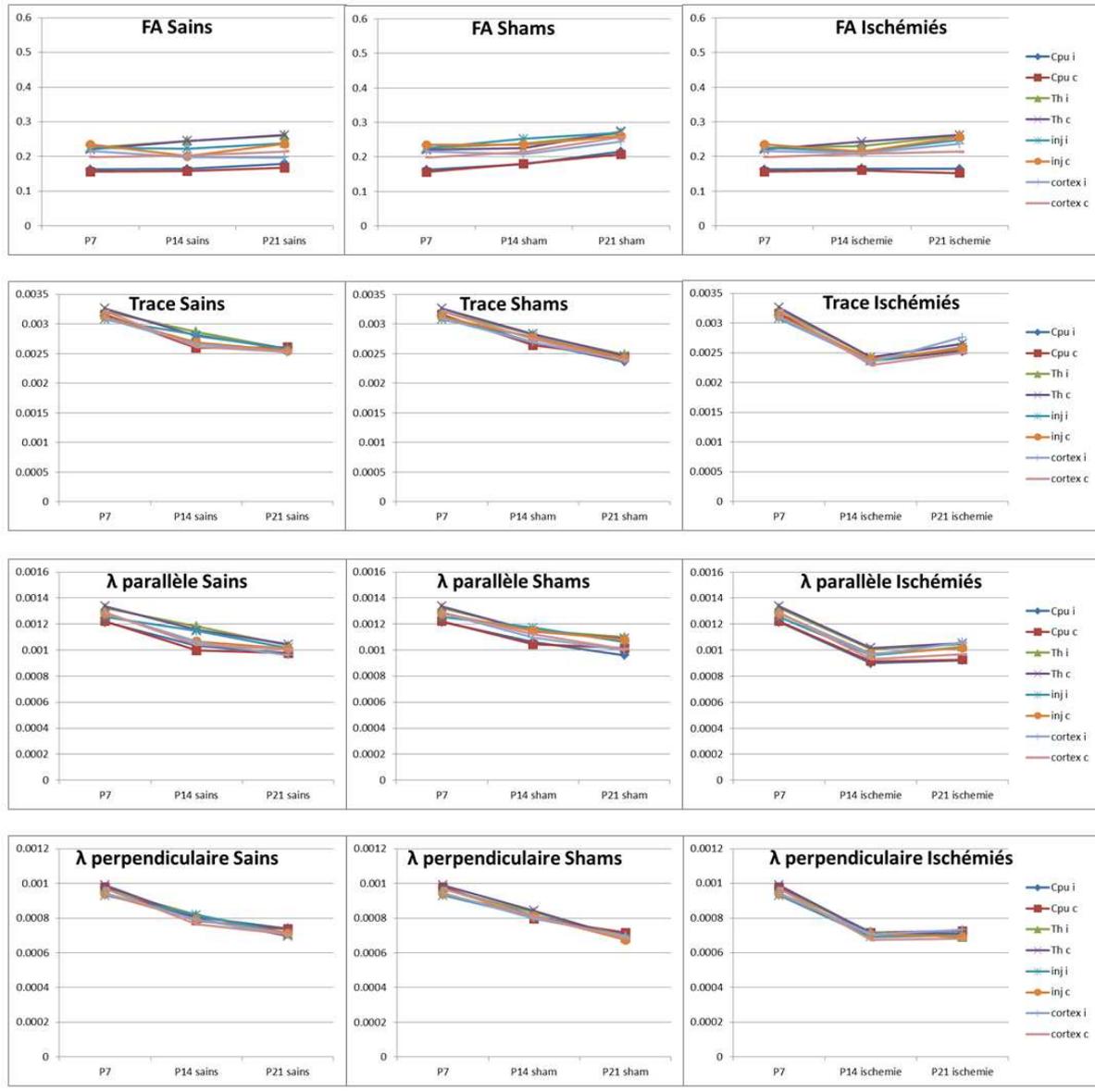


Figure 19a : Courbes de l'évolution des différents paramètres de DTI pour les différentes régions d'intérêts de la matière grise et les trois groupes : sains, shams et ischémiés. Cpu= caudate putamen, Th= noyaux thalamiques, inj= site d'injection et cortex. I correspond aux ROIs de l'hémisphère ipsi-latéral (gauche) et C correspond aux ROIs de l'hémisphère contre-latéral (droit).

## Résultats

La figure 17 présente des exemples d'images et de cartes obtenues pour des rats des différents groupes aux trois temps d'observation (p7, p14 et p21). On remarque de façon globale une diminution des différentes valeurs (trace,  $\lambda_{//}$  et  $\lambda_{\perp}$ ).

La figure 18 montre l'évolution de la Fraction d'Anisotropie dans les trois groupes entre p7, p14 et p21. Bien que très similaire, ces différentes cartes montrent une légère augmentation de la FA avec le temps, principalement au niveau des structures de la matière blanche.

Au vu des figures 17 et 18 on se rend facilement compte de la faible évolution des différentes valeurs entre les différents temps d'observation. Néanmoins les Figures 19a et 19b permettent de visualiser l'évolution de ces différents paramètres dans chacun des groupes.

### Evolution des paramètres de DTI

Il est intéressant de remarquer que, quel que soit la ROI, les rats ischémiés ne présentent pas de différences entre les hémisphères ipsi- et contro-latéral.

#### Matière grise :

La première observation concerne les rats témoins : sains et shams. On remarque que quel que soit le paramètre de diffusion, l'évolution entre ces deux groupes est identique.

*FA* : au niveau de la matière grise la fraction d'anisotropie ne révèle pas de réelles différences entre les rats témoins et les rats ischémiés. On observe une légère augmentation globale de la FA dans les différentes ROIs entre p7 et p21. Les valeurs faibles de FA (entre 0,15 et 0,27) sont le signe d'une faible anisotropie caractéristique de la matière grise.

*Trace,  $\lambda_{//}$  et  $\lambda_{\perp}$*  : ces trois paramètres suivent une évolution logiquement similaire. Chez les rats témoins on remarque une diminution quasi linéaire de ces paramètres signe d'une densification du tissu cérébral (multiplication cellulaire, développement de l'arborescence dendritique). Le cas des rats ischémiés est plus complexe. Entre p7 et p14 on observe une forte diminution de ces paramètres puis une normalisation entre p14 et p21.

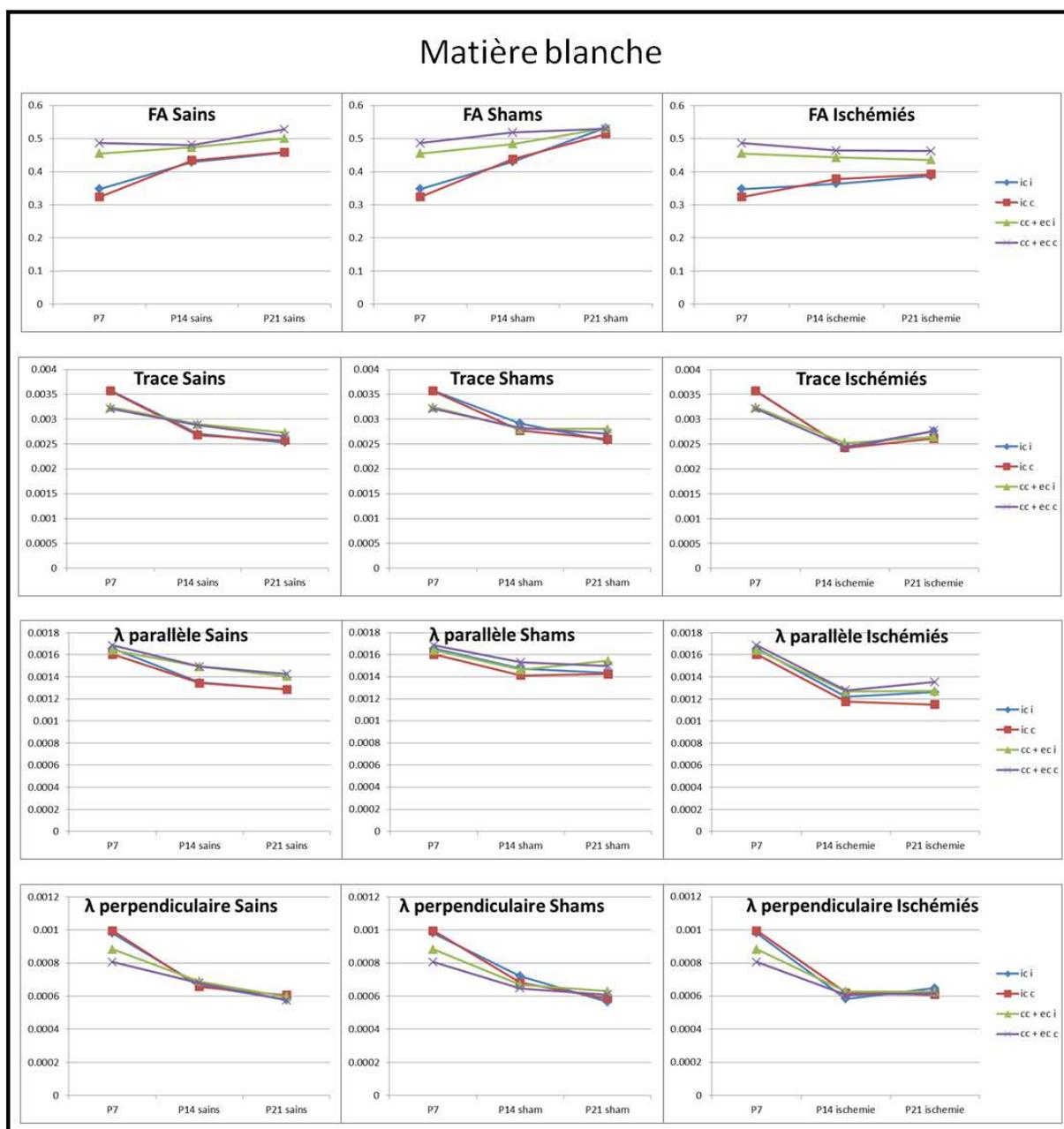


Figure 19b : Courbes de l'évolution des différents paramètres de DTI pour les différentes régions d'intérêts de la matière blanche et les trois groupes : sains, shams et ischémiés. Ic= capsule interne, cc+ec= corps calleux et capsule externe. I correspond au ROIs de l'hémisphère ipsilatérale (gauche) et C correspond aux ROIs de l'hémisphère controlatérale (droit).

### Matière blanche :

Comme pour la matière grise aucune différence entre les rats sains et les rats shams n'a été observée.

*FA* : Chez les rats témoins les deux ROIs présentent une augmentation linéaire de la FA : pour la capsule interne FA varie de 0,32 à p7 à 0,50 à p21, pour le corps calleux et la capsule externe FA varie de 0,48 à 0,52. Ces valeurs assez élevées sont caractéristiques d'un tissu structuré en cours de maturation. La faible évolution (IC) et la stagnation (ec+cc) de la FA au niveau de la matière blanche est le signe d'une maturation ralentie. [Bockhorst et al. 2008]

Chez les rats ischémiés la capsule interne présente une augmentation plus faible de 0,32 à p7 à 0,4 à p21, alors qu'au niveau du corps calleux et de la capsule externe les valeurs de FA diminuent très légèrement (p7=0,48 p21=0,46).

*Trace,  $\lambda //$  et  $\lambda \_ \_$*  : Ces trois paramètres présentent toujours une évolution similaire, et les courbes d'évolution ont des profils voisins de ceux observés pour la matière grise. Pour les rats témoins la diffusivité et les valeurs propres parallèle et perpendiculaire subissent une diminution globale et linéaire. Pour les rats ischémiés ces paramètres présentent une forte diminution entre p7 et p14 puis une stagnation entre p14 et p21 ramenant ces valeurs à celles des rats témoins.

L'ensemble des valeurs présentées dans les figures 19a et 19b ainsi que leur erreur standard à la moyenne sont regroupées en Annexe.

Conclusion: Le suivi, par Imagerie de Diffusion, de la maturation cérébrale des rats témoins donne des résultats en accord avec ceux publiés par Bockhorst et al. en 2008. Que ce soit pour la matière blanche ou la matière grise, l'augmentation de la FA et la diminution de la diffusivité et des valeurs propres parallèle et perpendiculaire entre p7 et p21 reflètent la maturation et la structuration des tissus cérébraux.

En ce qui concerne les rats ischémiés, les valeurs des paramètres de diffusivité et les valeurs propres à p21 ne sont pas sensiblement différentes de celles mesurées chez les rats témoins. Mais les profils de variation révèlent une baisse plus importante de ces valeurs à p14 et ceci pour la matière blanche, la matière grise et pour les hémisphères ipsi- et contro-latéral. Les valeurs de FA dans la matière grise restent toujours faibles et les profils de variation sont plus



explicitites pour la matière blanche. On observe alors une diminution où une stagnation des valeurs de FA pouvant être liée à une moindre myélinisation au cours du développement. Les faibles différences observées chez les rats ischémiés en ce qui concerne la valeur propre radiale (liée à la myélinisation) peuvent être expliquées par une compétition entre les différents phénomènes liés à l'ischémie et à la maturation cérébrale.

Toutefois, si ces profils sont révélateurs d'un comportement global différent des tissus cérébraux suite à une ischémie, nous n'avons pas pu mettre en évidence une différence statistique entre les valeurs des paramètres de diffusion entre animaux témoins et ischémiés (T tests) Ce résultat décevant est lié à plusieurs facteurs : le faible nombre d'individus dans chaque groupe (lié à des problèmes d'artéfact de mouvement dans les lots d'images de DTI), associé à de faibles variations des valeurs de ces paramètres entre ces groupes et à une forte variabilité inter-individuelle.



## **Partie 5 : Discussion et conclusion**

Le groupe de rat shams n'a révélé aucune différence avec le groupe de rat sain, que ce soit au niveau des cartes d'ADC post chirurgie ou lors des expériences de MEMRI ou de DTI à p14 et p21. Ces résultats confirment que les différences observées chez les rats du groupe ischémié sont directement liées à l'ischémie causée par le clampage transitoire des artères carotides communes et l'électrocoagulation de l'artère cérébrale moyenne gauche.

Le modèle d'ischémie choisi a permis une bonne reproductibilité des lésions ischémiques mises en évidence grâce aux cartes d'ADC acquises post chirurgie (95% de réussite), ainsi qu'un taux de mortalité faible (3%)

Les précédentes études MEMRI par injection intra-corticale de manganèse réalisées chez le rat adulte avaient montré l'efficacité de cette technique pour l'étude du tractus cortico-thalamique. Ces études, qui utilisaient des modèles d'ischémie provoquant des lésions assez étendues, avaient mis en évidence une diminution et un délai du transport du manganèse vers les zones thalamiques ainsi que des modifications géométriques de ces zones [Van Der Zijden et al. 2007, Van Der Zijden et al. 2008].

Lors de notre étude nous avons montré l'impact négatif de l'ischémie sur le transport du manganèse entre le cortex somato-sensoriel S1 et les noyaux thalamiques cibles sur les rats âgés de 14 et 21 jours soit 7 et 14 jours après ischémie. Cette observation n'a été possible que par l'utilisation d'une approche dynamique, c'est-à-dire l'acquisition d'images 2, 5 et 24 heures après injection de manganèse. En effet, une approche plus classique, avec acquisition de données MEMRI 24 heures après injection, n'aurait pas permis de constater un réel impact de l'ischémie corticale sur le tractus étudié à cause de l'influence de la diffusion globale du manganèse dans le cerveau. Par ailleurs, entre le cortex somato-sensoriel S1 et les noyaux thalamiques le manganèse ne franchit pas de synapse. Notre étude à temps précoce permet visualiser uniquement le transport actif du manganèse le long du tractus cortico-thalamique.

L'augmentation plus lente de l'intensité du signal au niveau des noyaux thalamiques chez les rats ischémiés révèle la réduction d'efficacité du tractus cortico-thalamique, pouvant être liée à une réduction du nombre de axones au sein du tractus ou/et à une perte d'efficacité de ces neurones, tant en terme d'absorption d'ionique que de transport.

L'IRM fonctionnel aurait pu être envisagée pour remplacer le MEMRI, cependant le matériel à notre disposition n'était pas suffisamment performant pour obtenir des SNR suffisants.



Les études par IRM fonctionnel sont généralement basées sur des paradigmes de stimuli extérieurs difficiles à mettre en œuvre dans le cas de rats nouveau-nés. Dans notre étude nous les avons remis dans la cage avec la mère toujours après le même délai suivant l'examen IRM. Ils ont eu alors la possibilité de se nourrir, donc de récupérer et ont été soumis à des stimuli naturels. Notre étude correspond à une activation naturelle du tractus cortico-thalamique. Les données de DTI des animaux témoins se sont révélées en accord avec la littérature [Bockhorst et al. 2008]. La maturation cérébrale induit, entre p7 et p14, une baisse de la diffusivité que ce soit au niveau de la matière grise ou de la matière blanche. Cette baisse de diffusivité est liée à une densification du tissu cérébral. La fraction d'anisotropie, indice de la structuration cérébrale, présente une hausse assez importante au niveau de la matière blanche et plus faible au niveau de la matière grise.

En ce qui concerne les animaux ischémiés, on peut souligner que, de façon intéressante, l'impact de l'ischémie sur les paramètres de diffusion est globale, elle ne dépend pas de l'hémisphère t. Nous avons observé une diminution plus marquée de la diffusivité, chez les rats témoins, dans les zones non lésées que ce soit en ipsi- ou en contro-latéral. Parallèlement la plus faible variation de la FA de la matière blanche entre p7 et p21 dans ces zones est indépendante de l'hémisphère. Ce résultat en accord avec ceux publiés en 2009 par Villapol et al. montre un impact bilatéral et symétrique d'une hypoperfusion chez le rat nouveau-né. Les valeurs de FA recueillies au niveau de la matière blanche chez les rats ischémiés suggèrent une altération de la maturation de ces structures.

L'un de nos objectifs concernant l'étude de la diffusion cérébrale de l'eau était d'évaluer l'impact de l'ischémie sur la myélinisation. Deux paramètres de diffusion sont liés à la myélinisation, la fraction d'anisotropie et la valeur propre radiale. Si les valeurs de FA laissent penser à une myélinisation inférieure chez les rats ischémiés, les mesures de la valeur propre radiale ne permettent pas de le confirmer. Le fait que les différentes valeurs de diffusivité (trace, valeur propre principale et radiale) diminuent de façon plus importante chez les rats ischémiés entre p7 et p14 avant de revenir à des valeurs similaires à celles des rats témoins à p21, suggère une compétition des effets de l'ischémie et de ceux de la maturation cérébrale sur ces paramètres.

Toutefois, le faible nombre de publications portant sur ce type de modèle ischémique ainsi que la superposition des événements biologiques liés à l'étude pathologique lors de la



maturation cérébrale ne permettent pas de répondre aux questions posées par nos résultats DTI. Pour tenter de mieux appréhender les phénomènes biologiques entraînant la perte d'efficacité du tractus cortico-thalamique et les différences observées sur les paramètres de diffusion, nous avons démarré une étude histologique dont les premiers tests sont en cours, portant sur la myéline (Luxol fast blue) et la densité cellulaire (crésyl violet).

En conclusion notre étude a montré un impact général de l'ischémie focale transitoire sur le cerveau de rat en développement, que ce soit au niveau fonctionnel avec une diminution de l'efficacité du tractus cortico-thalamique bien qu'épargné par la lésion ischémique ou au niveau structurel avec des profils d'évolution des paramètres DTI. Nous pensons que l'étude histologique en cours nous donnera les informations nécessaires afin de préciser les phénomènes biologiques liés à nos observations. De plus le développement constant des techniques de tractographie par IRM de diffusion ouvre des portes quant à l'étude du développement des connectivités cérébrales pendant la maturation, tant chez les rats sains que chez les rats pathologiques. Dans ce sens la partie suivante du manuscrit portera sur l'étude de deux techniques d'IRM de diffusion permettant l'étude des connectivités cérébrales *in vivo* et présentera les premiers tests réalisés chez le rat nouveau-né.



**Chapitre III :**  
**Tractographie**



## **Partie 1 : Comparaison de l'imagerie Q-ball et de l'imagerie du spectre de diffusion**

### **1-Introduction**

L'IRM de diffusion est la seule technique *in vivo* capable de décrire les différentes connectivités neuronales de manière non invasive. La tractographie est utilisée pour caractériser des cas pathologiques comme les tumeurs cérébrales, les accidents vasculaires cérébraux, les traumatismes crâniens mais aussi pour étudier la maturation cérébrale. Dans un premier temps, l'imagerie du tenseur de diffusion (DTI) a été utilisée malgré son incapacité à décrire des cas complexes comme des croisements de fibres dans un même voxel. Par la suite, des techniques comme l'imagerie du spectre de diffusion : DSI (Diffusion Spectrum Imaging) [Wedeen et al. 2005] ou l'imagerie Q-ball (QBI) [Tuch et al. 2004] ont permis de lever cette limitation.

Alors que le DTI nécessite entre 6 et 30 directions et des valeurs de B moyennes ( 500-1000 s/mm<sup>2</sup>), le DSI ou le Q-ball demande entre 80 et plusieurs centaines de directions et des valeurs de B élevées (jusqu'à 6000 s/mm<sup>2</sup> et plus). L'augmentation du nombre de directions entraîne une augmentation du temps d'acquisition et les valeurs de B supérieures entraînent une baisse significative du rapport signal sur bruit.

L'application de ces deux techniques, DSI et Q-ball a, pour le moment, été quasiment limitée aux études chez l'Homme à 1.5 et 3.0 Tesla [Lo et al. 2011 ; Granziera et al. 2009 ; Bassett et al. 2011 ; Chiu et al. 2011 ; Jeong et al. 2012] ainsi qu'aux études *ex vivo* chez le petit animal à des champs compris entre 3 et 9,4 Tesla, études focalisées sur le cœur [Wang et al. 2010], la moelle épinière [Cohen-Adad et al. 2011 ; Cohen-Adad et al. 2008], ou le cerveau [Takahashi et al. 2010 ; Wedeen et al. 2008 ; Kuo et al. 2008 ; Schalmann et al. 2007 ; Lin et al. 2003]. Le faible nombre d'études *in vivo* chez le petit animal [Cohen-Adad et al. 2008 ; Kim et al. 2012] est directement lié aux limitations matérielles et aux contraintes de temps d'acquisition qui doivent rester compatibles avec un examen *in vivo*.

Nous avons choisi de mettre en œuvre et de comparer ces deux techniques, DSI et QBI pour l'étude du petit animal, dans le cadre des limitations liées à l'imagerie *in vivo* à haut champ. Un certain nombre d'études comparatives ont été menées sur ces deux méthodes [Bassett et al. 2011 ; Kuo et al. 2008- Prckovska et al. 2008] mais jamais en prenant en compte ces contraintes.



Après avoir optimisé la séquence d'acquisition pondérée en diffusion et avoir déterminé la valeur de B et le temps d'acquisition maximal, nous avons étudié la reproductibilité et la précision du DSI et du QBI afin d'explorer les limites de chacune de ces techniques et de déterminer laquelle est la plus efficace dans le cadre de l'imagerie *in vivo* du petit animal.

Pour cette étude, le temps d'acquisition d'un protocole a été limité à 1 heure afin de pouvoir procéder à l'acquisition des 2 protocoles lors de la même session d'imagerie et ainsi limiter le temps d'anesthésie à moins de 3 heures. Ceci est particulièrement important en vue de l'utilisation de ces protocoles pour l'étude longitudinale de pathologies pouvant affaiblir les animaux et donc leur résistance à des temps d'anesthésie longs et/ou répétés. Dans un premier temps nous avons comparé ces deux techniques sous des conditions contrôlées en nous concentrant sur la reproductibilité ainsi que sur la fidélité angulaire des résultats. Dans ce but nous avons utilisé un fantôme sphérique de diffusion présentant un croisement de fibres. Ceci a rendu possible l'acquisition de données dont les propriétés géométriques sont connues avec différents ratios de fibres. Dans un deuxième temps, nous avons acquis des données avec les séquences DSI et QBI sur un même animal lors de 3 sessions d'imageries différentes. Ces lots de données *in vivo* nous ont permis de comparer ces deux techniques dans des conditions réelles.

L'évaluation de la qualité de ces deux techniques repose sur l'étude de la reproductibilité des différents paramètres extractibles après reconstruction des données : La fraction d'anisotropie générale (GFA), l'anisotropie quantitative (QA), les angles de croisement ainsi que le nombre et la longueur des fibres calculées.

## **2-Matériel et méthodes**

Cette étude a été réalisée au Max Plank Institut pour la recherche en neurosciences de Cologne (Allemagne) dans l'équipe de RMN *in vivo* du Professeur Mathias Hoehn.

### Système d'imagerie

Le système d'imagerie utilisé est composé d'un aimant horizontal dédié au petit animal, un BioSpec 9,4 Teslas, interfacé à une console Avance 3 et piloté grâce au logiciel Paravision 5.1 (Bruker Biospin, Ettlingen, Allemagne). Ce système est équipé d'un système de gradients hautes performances : 660mT/m avec un temps de montée de 110 $\mu$ s. L'excitation RF a été réalisée avec un résonateur en quadrature de 72 mm et la réception avec une antenne de surface en quadrature pour le cerveau de rat (30\*30mm<sup>2</sup>)

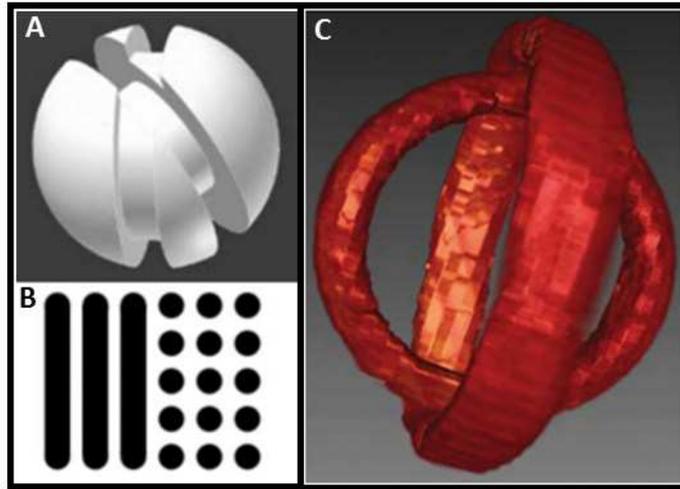


Figure 1 : A : schéma du support sphérique du fantôme. B : Schéma de la superposition des 2 groupes de fibres. C : Images volumiques du fantôme obtenu à partir d'images pondérées en diffusion. [Moussavi et al. 2011.]

## Animal

Pour cette étude un rat wistar (Janvier, France) d'un poids de 250g a été utilisé. Nous l'avons maintenu sous un cycle jour/nuit de 12/12h avec nourriture et eau à volonté.

## Fantôme

Le fantôme de diffusion a été acheté à Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ / German Cancer Research Center, Heidelberg, Allemagne) [Moussavi-Biugui et al. 2011]. Il est composé de 2 groupes de fibres (constitués de plusieurs fibres de 15 $\mu$ m de diamètre) superposés et orientés à 45° l'un par rapport à l'autre, comme montré dans la figure 1. Les deux groupes de fibres ont été enroulés autour d'une sphère en polyamide de diamètre égal à 3cm, la largeur et la profondeur de chaque groupe de fibres étant égales à 2mm. Après l'enroulement le fantôme a été enfermé dans du gel d'agarose à 3% contenant une forte concentration de NaCl afin que les susceptibilités magnétiques du gel et des fibres soit similaires. Bien que les 2 groupes de fibres ne se croisent pas physiquement, nous avons simulé un croisement de fibres en utilisant le volume partiel. Nous avons choisi deux cas : soit 50/50% de chaque groupe de fibres, soit 25/75% en modifiant la position de la coupe contenant la zone de superposition.

## Protocoles

Que ce soit pour les sessions *in vitro* ou *in vivo* les mêmes protocoles d'imagerie ont été utilisés. Pour chacune des deux techniques la durée d'acquisition a été limitée à 1 heure afin de garder le temps d'anesthésie inférieur à 2h30min.

### Protocole *in vitro*

Les expériences *in vitro* ont été réalisées lors de 3 sessions d'imagerie différentes incluant un repositionnement complet du fantôme dans l'aimant. Lors de chaque session les expériences QBI et DSI ont été enregistrées avec les deux ratios de fibres 50/50 et 25/75 après acquisition d'images de positionnement. De plus, afin d'étudier la variabilité dans une même session l'ensemble des acquisitions a été réalisé 2 fois lors de la première session d'imagerie.

Un protocole d'imagerie de diffusion *in vitro* a consisté en :

- 1 acquisition DSI
- 1 acquisition QBI avec 252 directions
- 2 acquisitions QBI avec 126 directions (identiques)



Les 2 acquisitions QBI avec 126 directions servent à comparer, dans les mêmes conditions de temps d'acquisition, les résultats obtenus en utilisant 2\*126 directions réparties sur une demi-sphère avec ceux acquis en considérant 252 directions réparties sur une sphère.

### Protocole *in vivo*

Après induction de l'anesthésie par 4% d'isoflurane, l'animal est positionné dans un berceau pour rat et stabilisé avec une barre de dents et des barres d'oreilles. Pendant l'examen IRM, l'anesthésie est maintenue avec 1,5% d'isoflurane et O<sub>2</sub>/NO (30%/70%). Sa respiration et sa température corporelle sont suivies et maintenues dans des conditions physiologiques.

Un rat Wistar a été imagé 3 fois avec un délai d'une journée entre chaque session. Chaque session consiste en une acquisition d'images anatomiques pondérées T2 suivie de la mise en œuvre des protocoles de QBI et de DSI, le tout durant approximativement 2h15min.

### Séquences d'imagerie

Toutes les acquisitions d'IRM de diffusion ont été réalisées avec une séquence d'écho de spin avec lecture EPI. Les paramètres utilisés sont les suivants : TR/TE = 3500/20 ms,  $\Delta/\delta = 4/10$  ms. Pour l'imagerie *in vitro*: champ de vue = 32 x 32 x 18 mm<sup>3</sup>, matrice = 64 x 64 x 9. Pour l'imagerie *in vivo*: champ de vue = 32 x 32 x 11 mm<sup>3</sup>, matrice = 128 x 128 x 22. La valeur de B (QBI) ou la valeur de B maximale utilisée (DSI) est 2000 s/mm<sup>2</sup>. Cette valeur de B a été limitée par le matériel ainsi que par le rapport signal sur bruit (>30). Utiliser une valeur de B supérieure aurait nécessité des amplitudes de gradients supérieures et /ou des délais  $\Delta$  et  $\delta$  plus longs et aurait entraîné des effets négatifs dus à l'augmentation des courants de Foucault et/ou à l'augmentation du TE.

### *QBI*

Pour l'imagerie Q-ball, on a considéré 252 directions de diffusion correspondant aux sommets d'un icosaèdre (pavage triangulaire 3D d'une sphère) et un groupe d'images non pondérées en diffusion (A0). Le temps d'acquisition est de 58 minutes. Nous avons aussi utilisé la version demi-sphère de cette géométrie : pour l'étude sur fantôme nous avons acquis séparément les sets d'images correspondant aux 252 et 126 directions alors que pour l'étude *in vivo* les 126 directions ont été extraites de sets d'images complets (252 directions).



Ces images ont présenté une légère fluctuation dans le sens de la phase, cette fluctuation, attribuée aux courants de Foucault ont été corrigées avec l'outil FLIRT (FSL's Linear Image Registration Tool) en prenant pour références les images non pondérées en diffusion [Kim et al. 2012].

### *DSI*

Le protocole d'imagerie de spectre de diffusion ainsi que les corrections après acquisition, sont dérivés de ceux de l'étude réalisé par Kim [Kim et al. 2012]. Afin de former une grille distribuée de façon isotrope dans l'espace Q, on a considéré 203 combinaisons "valeur de B/ directions de diffusion" [Kuo et al. 2008]. 12 groupes de directions correspondant à une valeur de B comprise entre 154 et 2000 s/mm<sup>2</sup> ont été utilisés, chacun étant acquis de façon indépendante, incluant un set d'image A0. Le temps d'acquisition de ce protocole est de 56 minutes. La correction des images a été réalisée en 2 étapes : premièrement la fluctuation intra groupe a été corrigée avec l'outil FLIRT puis les 12 groupes ont été co-registrés avec le même outil.

### Reconstruction des données de diffusion et tractographie

Nous avons utilisé le logiciel DSI Studio ([www.dsi-studio.labsolver.org](http://www.dsi-studio.labsolver.org)) [Yeh et al. 2011]. Les différentes tractographies ont été réalisées avec une méthode de traçage rationalisée (streamline tracking method) [Wedeen et al. 2008].

### *QBI*

Les ODFs (Orientation Distribution Function) ont été calculées en utilisant la transformation de Funk-Radon à partir des images de QBI et plus précisément l'approche de Descoteaux [Descoteaux et al. 2009]. Pour garantir des ODFs fiables, 2 paramètres doivent être optimisés : le kernel d'interpolation ici choisi égal à 5 ainsi que le kernel de lissage ici choisi égal à 8. Pour la reconstruction des données nous avons utilisé une tessellation des ODFs égale à 8 et un facteur de déconvolution de 0,1. (La tessellation correspond à la résolution 3D des ODFs)

### *DSI*

Après l'application d'un filtre de Hanning afin de réduire les artéfacts de troncature induits par la discrétisation de l'espace Q, une transformée de Fourier 3D a été réalisée pour obtenir les PDFs (Probability Density Function). Puis les ODFs ont été estimées par intégration le

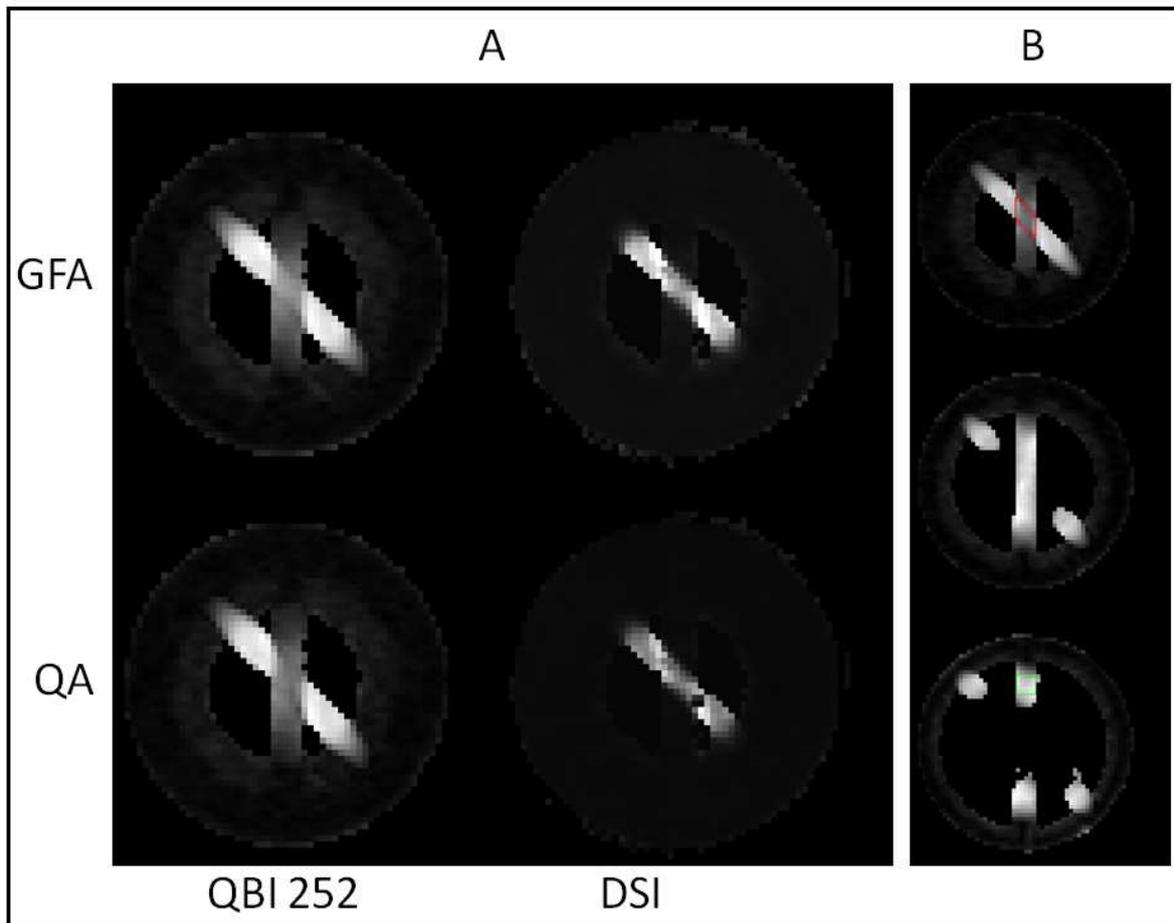


Figure 2 : A : Exemples de cartes de GFA et de QA calculées à partir de l'acquisition QBI 252 avec un ratio de fibres de 50/50. B : Trois coupes consécutives montrant en rouge la zone de croisement et en vert la zone ne comportant qu'un groupe de fibres.

long des directions d'échantillonnage des PDFs. Pour extraire les directions de diffusion principales des ODFs, nous avons utilisé la méthode par déconvolution [Yeh et al. 2011]. Pour la reconstruction des données de DSI 3 paramètres ont été ajustés : filtre de Hanning = 17, facteur de tessellation des ODFs = 8 et facteur de déconvolution des ODFs = 0,1.

### **3- Résultats**

#### **Comparaison des données obtenues par QBI et DSI**

##### Paramètres

Les différentes cartes paramétriques ont été obtenues à partir de la reconstruction des données de QBI et de DSI. Nous avons utilisé les cartes de GFA et de QA.

La GFA (General Fractional anisotropy) est un marqueur de l'anisotropie du voxel étudié calculé à partir des ODFs [Tuch et al. 2004], comme la FA pour le DTI. La GFA est proche de 1 dans les zones à forte anisotropie comme la matière blanche et proche de 0 dans les zones isotropes comme les ventricules.

$$\text{GFA} = \text{std}(\psi) / \text{rms}(\psi)$$

Avec  $\psi$  l'ODF de diffusion,  $\text{std}$  = la déviation standard et  $\text{rms}$  = la valeur efficace (ou root mean square).

La QA (Quantitative anisotropy) est une valeur servant à quantifier de façon relative la quantité de spin contribuant à une direction de diffusion particulière. Il y a donc autant de valeurs de QA que de directions de diffusion extraites des ODFs [Yeh et al. 2010]. Utiliser les valeurs de QA est une bonne façon de classer les différentes directions de diffusion et de déterminer un seuil pour la tractographie.

$$\text{QA}(\mathbf{a}) = Z_0(\psi_Q(\mathbf{a}) - I(\psi_Q))$$

Avec  $Z_0$  une constante de normalisation,  $\psi_Q(\mathbf{a})$  la fonction de distribution des spins dans la direction ( $\mathbf{a}$ ) et  $I(\psi_Q)$  le "bruit de fond" isotrope.

##### Régions d'intérêt

Les comparaisons basées sur les deux paramètres GFA et QA ont été réalisées en utilisant une méthode basée sur des régions d'intérêt. Pour l'étude *in vitro* 2 ROIs ont été choisies : une zone de croisement et une zone de "non-croisement", et gardées pour l'ensemble des

A : GFA : Coefficient de variation intra-session

Ratio	Croisement		Sans croisement	
	"50/50"	"25/75"	"50/50"	"25/75"
Q-ball-126	0,0166	0,0017	0,0044	0,0092
Q-ball-126-2av	0,0497	0,0066	0,0196	0,0108
Q-ball-252	0,0047	0,0141	0,0170	0,0088
DSI	0,0247	0,0528	0,0014	0,0132

B : GFA : Coefficient de variation inter-sessions

Ratio	Croisement		Sans croisement	
	"50/50"	"25/75"	"50/50"	"25/75"
Q-ball-126	0,0198	0,0263	0,0334	0,0359
Q-ball-126-2av	0,0137	0,0388	0,0386	0,0593
Q-ball-252	0,0314	0,0174	0,0333	0,0421
DSI	0,0254	0,0490	0,0231	0,0184

**Tableau 1 : Coefficient de variation (Cv) intra-session de GFA : A et inter-sessions : B.**

**Valeurs obtenues à partir des 2 zones d'intérêts, croisement et sans croisement.**

comparaisons. Pour la partie *in vivo* nous avons choisi 6 régions d'intérêts : striatum, colliculus, cortex, capsule interne, fornix et corps calleux. Ces ROIs ont été tracés en utilisant l'atlas du cerveau de rat de Paxinos et Watson [Paxinos et Watson 1998]. Comme pour l'étude sur fantôme, tous les relevés ont été effectués sur les mêmes ROIs.

Pour évaluer la fidélité angulaire des deux techniques nous avons utilisé une carte proposée par le logiciel DSI Studio représentant dans chaque pixel les directions principales de diffusion.

Nous avons réalisé les différentes tractographies avec la méthode déterministe (deterministic fiber tracking). Afin de limiter les fluctuations liées à cette méthode, chaque calcul a été répété 10 fois puis les résultats ont été moyennés. Pour l'étude *in vitro*, la zone de croisement a été choisie comme zone d'origine pour la tractographie avec les paramètres suivants : longueur = 10-100mm, angle maximum entre deux voxels consécutifs = 30°, nombre de points d'origine = 100 000 et une valeur de seuil de QA = 0,2. Nous avons utilisés 3 régions différentes comme origine pour la tractographie *in vivo*, avec les paramètres suivants: longueur = 7-90mm, angle maximum entre deux voxels consécutifs = 30° et un nombre de points d'origine = 10 000. Pour déterminer une valeur seuil de QA adaptée à chaque protocole, les valeurs moyennes du cerveau entier entre les différentes sessions ont été moyennées: seuil de QA : Q-ball 126= 0,24, Q-ball 252= 0,2 et DSI =0,49.

#### Croisement de fibres

L'un des avantages principaux des techniques reposant sur le Q-space est leur capacité à résoudre les cas de croisement de fibres dans un même voxel. Pour vérifier que ces deux techniques permettent cette distinction *in vivo*, nous avons étudié les ODFs calculées dans une zone connue pour avoir des fibres se croisant dans le plan axial : les colliculi [Leegaard et al. 2010].

#### Comparaison des techniques QBI et DSI: stabilité et robustesse

Le but principal de cette étude est de déterminer la stabilité et de mesurer la robustesse du QBI et du DSI. Pour les comparaisons basées sur des ROIs nous avons comparé les coefficients de variation (Cv) calculés à partir des valeurs relevées sur les données des différentes sessions d'imagerie.

A : *in vitro* : QA : Coefficient de variation intra-session

Ratio	Croisement		Sans croisement	
	"50/50"	"25/75"	"50/50"	"25/75"
Q-ball-126	0,0113	0,0443	0,0390	0,0486
Q-ball-126-2av	0,0062	0,1731	0,0470	0,0746
Q-ball-252	0,0645	0,0282	0,0591	0,0518
DSI	0,0214	0,0998	0,0483	0,0269

B : *in vitro* : QA : Coefficient de variation inter-sessions

Ratio	Croisement		Sans croisement	
	"50/50"	"25/75"	"50/50"	"25/75"
Q-ball-126	0,0224	0,0174	0,0044	0,0224
Q-ball-126-2av	0,0748	0,0065	0,0155	0,0032
Q-ball-252	0,0030	0,0191	0,0207	0,0127
DSI	0,0109	0,1113	0,0387	0,0141

Tableau 2 : Coefficient de variation (Cv) intra-session de QA : A et inter-sessions : B. Valeurs obtenues à partir des 2 zones d'intérêts, croisement et sans croisement.



Figure 3 : A : Exemple de carte d'ODFs utilisée pour vérifier la fidélité des angles de croisement. QBI 252 directions avec un ratio de fibres de 50/50. Les couleurs correspondent aux directions de diffusion (haut/bas=vert, droite/gauche=rouge et dans le plan/hors du plan=bleu).

$$Cv = \sigma/\mu$$

Avec  $\sigma$  la déviation standard et  $\mu$  la valeur moyenne.

### Etude sur fantôme

Nous avons évalué deux aspects de la variabilité des ces techniques *in vitro* : la variabilité au sein d'une même session et la variabilité entre sessions. Les variations dans une même session correspondent à la variabilité intrinsèque à la méthode en fonction des paramètres choisis, alors que celles entre sessions prennent aussi en compte les changements induits par le remplacement de l'échantillon et le réglage du système.

### *Cartes paramétriques*

Les cartes de GFA et de QA ont été extraites des reconstructions de DSI et de QBI (Figure 2). Deux ROIs tracées l'une au niveau de la zone de croisement et l'autre au niveau d'une zone ne contenant qu'un groupe de fibres ont servi à l'étude de chacun des protocoles.

Pour chaque technique, le coefficient de variation (Cv) a été calculé à partir des 3 sessions d'imagerie (variabilité inter-sessions) et à partir des 2 sets acquis pendant la première session (variabilité intra-session).

La variabilité intra-session est présentée dans le tableau 1a.

Dans la zone sans croisement toutes les techniques apparaissent comme stables:  $Cv < 0,02$ . L'analyse de la zone de croisement montre que le DSI ainsi que le QBI avec 2\*126 directions ont une variabilité supérieure aux autres :  $> 0,02$  alors que pour le QBI avec 252 directions et 126 directions (sans moyennage) le coefficient de variation reste inférieur à 0,02.

La variabilité inter-sessions (tableau 1b), comme attendu, est supérieure, tout particulièrement dans le cas d'un ratio de fibre de 25/75. La comparaison des 4 techniques montre le QBI avec 2\*126 directions est la moins fiable alors que les trois autres montrent des niveaux de variabilité similaires.

La variabilité de la première valeur de QA, présentée dans le tableau 2, est globalement faible en intra-session, à l'exception du QBI 2\*126 ( $Cv=0,1731$ ) et du DSI ( $Cv=0,0998$ ) dans le cas d'un ratio de fibres 25/75. Inter-sessions, nos résultats montrent une bonne reproductibilité du QBI :  $Cv < 0,025$  (sauf dans le cas du moyennage de deux acquisitions : 2\*126 directions :  $Cv=0,0748$ ). Le DSI présente une variabilité supérieure avec un Cv de 0,113 pour un ratio de

*In vitro* : variabilité angulaire inter-sessions

Ratio	Angle moyen		Cv	
	"50/50"	"25/75"	"50/50"	"25/75"
Q-ball-126	41,7773	42,3520	0,0021	0,0113
Q-ball-126-2av	40,3300	40,1027	0,0034	0,0211
Q-ball-252	40,4580	41,7293	0,0202	0,0496
DSI	42,1800	43,2420	0,1173	0,0894

Tableau 3 : Valeurs moyennes et coefficients de variation des angles de croisement relevés, pour un ratio de fibres de 50/50 et 25/75.

A : *in vitro* : coefficient de variation intra-session du nombre de fibres

Groupe de fibres	0°		45°	
	"50/50"	"25/75"	"50/50"	"25/75"
Q-ball-126	0,0411	0,0418	0,0051	0,2556
Q-ball-126-2av	0,0338	0,0540	0,0630	0,1347
Q-ball-252	0,0385	0,0637	0,0337	0,2906
DSI	0,2144	0,9620	0,3039	0,3586

B : *in vitro* : coefficient de variation inter-sessions du nombre de fibres

Groupe de fibres	0°		45°	
	"50/50"	"25/75"	"50/50"	"25/75"
Overlap	0,4029	0,0179	0,0875	0,7753
Q-ball-126	0,4029	0,0179	0,0875	0,7753
Q-ball-126-2av	0,4481	0,0744	0,1188	0,9150
Q-ball-252	0,2427	0,0089	0,0787	0,6908
DSI	0,8231	0,8319	0,5785	0,1630

Tableau 4 : Tractographie. Coefficients de variation du nombre de fibres calculé. Les groupes de fibres (0° et 45°) ainsi que les 2 différents cas d'acquisition (ratio de 50/50 et ratio de 25/75) apparaissent dans des colonnes différentes.

25/75 (croisement de fibres) et de 0.0387 pour un ratio de 50/50 (1 groupe de fibres). En ne se concentrant que sur les 2 protocoles principaux : DSI et QBI 252, le QBI montre une reproductibilité supérieure au DSI. Les angles de croisements extraits des ODFs ont été aléatoirement sélectionnés à partir des voxels de la zone de croisement (Figure 3). La valeur moyenne ainsi que le coefficient de variation sont présentés dans le tableau 3. Tous les protocoles sous-estiment l'angle de croisement réel ( $45^\circ$ ). Le DSI montre une meilleure évaluation de cet angle :  $42-43^\circ$  mais présente un Cv important : 0,089. Le QBI avec 252 directions bien que plus éloigné de la vérité géométrique ( $40-42^\circ$ ) présente une variabilité inférieure  $Cv < 0,05$ . Le DSI est donc plus proche de la réalité mais avec une variabilité supérieure.

### *Tractographie*

La reproductibilité de la tractographie a été évaluée à partir du nombre de fibres calculé avec comme point d'origine la zone de croisement (tableau 4). La comparaison intra-session montre une grande différence entre le DSI et le QBI avec un net avantage pour le QBI. En effet, pour le QBI seule une valeur de Cv importante est obtenue pour les fibres à  $45^\circ$  avec un ratio de 25/75 :  $Cv > 0,13$ , alors que  $Cv < 0,064$  dans toutes les autres configurations. Par contre, pour le DSI les valeurs de Cv sont toujours  $>0,2$ . La variabilité inter-sessions est globalement supérieure à la variabilité intra-session montrant un impact négatif clair du repositionnement de l'échantillon. Une nouvelle fois, le DSI apparaît moins fiable que le QBI. Dans la figure 4 des exemples de tractographies obtenues à partir des données de DSI et de QBI sont présentés.

### Etude *in vivo*

#### *Cartes paramétriques*

Des régions d'intérêts correspondants au corps calleux (CC), au fornix, au striatum, au cortex, au colliculus et à la capsule interne (IC) ont été tracées manuellement à l'aide de l'atlas de Paxinos et Watson (1998) [Paxinos et Watson 1998]. Les valeurs moyennes relevées au niveau de ces ROIs ont été comparées entre sessions et les coefficients de variation calculés. Les résultats sont présentés dans le tableau 5 pour les paramètres GFA et QA. La figure 5 regroupe des exemples de cartes de GFA et de QA de cerveau de rat *in vivo*.

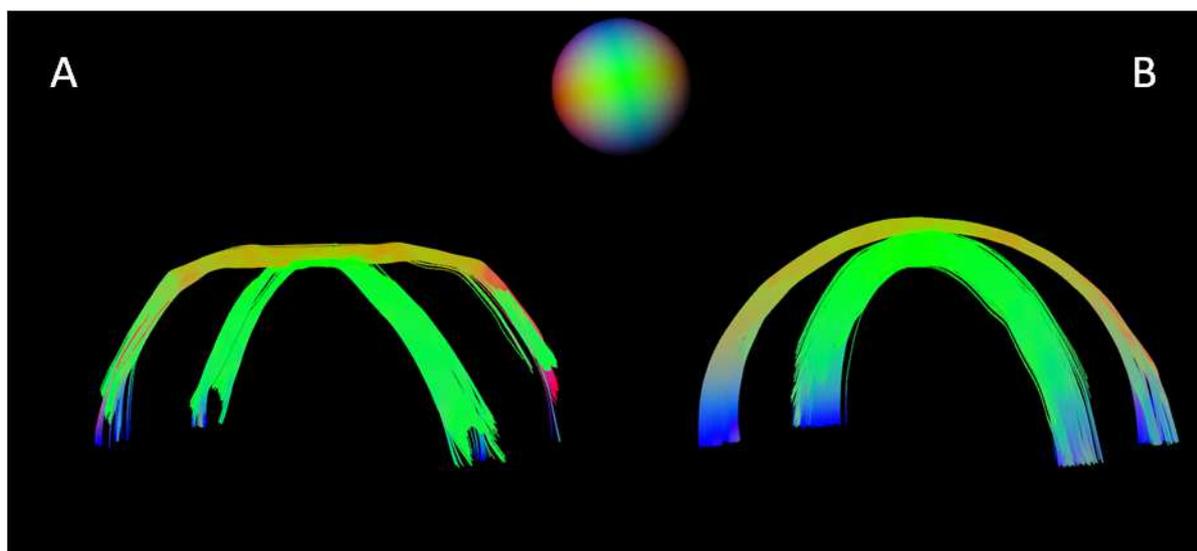


Figure 4 : Exemples de représentation 3D de tractographie du fantôme, A : DSI et B : QBI 252 avec un ratio de 25/75. La direction des fibres est retranscrite grâce à un code couleur (sphère centrale). Les fibres orientées à 0° sont principalement en vert et celles à 45° en jaune.

A : *in vivo* : GFA : coefficient de variation inter-sessions

	Cv striatum	Cv coliculus	Cv cortex	Cv IC	Cv fornix	Cv CC
Q-ball-126	0,0745	0,0885	0,0796	0,1278	0,0583	0,1338
Q-ball-252	0,0583	0,0962	0,0487	0,1296	0,0536	0,1170
DSI	0,0605	0,1531	0,1558	0,1277	0,0821	0,1649

B : *in vivo* : QA : coefficient de variation inter-sessions

	Cv striatum	Cv coliculus	Cv cortex	Cv IC	Cv fornix	Cv CC
Q-ball-126	0,0734	0,1055	0,0754	0,1305	0,0954	0,1573
Q-ball-252	0,0600	0,1050	0,0632	0,1358	0,0881	0,1351
DSI	0,0779	0,1411	0,2045	0,1990	0,1189	0,1167

Tableau 5 : Coefficients de variation de GFA (A) et QA (B). Valeurs obtenues *in vivo* à partir des régions cérébrales suivantes : striatum, colliculus, cortex, capsule interne (IC), fornix, et corps calleux (CC).

Le coefficient de variation inter-sessions de la GFA varie de 0.05 à 0.165. La plus basse valeur est obtenue avec le protocole QBI 252 pour le cortex (0.049) et la plus élevée avec le protocole DSI pour le corps calleux (0.165).

La différence entre utiliser 252 directions réparties sur une sphère ou seulement la moitié de ces directions réparties sur une demi-sphère est assez faible, en effet  $\Delta Cv < 2\%$ . Le protocole DSI apparaît moins fiable que le QBI au niveau de la reproductibilité des cartes de GFA.

Les valeurs de QA ont un coefficient de variation inter-sessions compris entre 0,06 et 0,136 pour le QBI 252 et entre 0,078 et 0,204 pour le DSI. Les deux protocoles de QBI sont très proches, en terme de variabilité, des cartes de QA. La comparaison des deux protocoles nécessitant une heure d'acquisition, DSI et QBI252, montre que dans cinq zones sur 6, le QBI est plus reproductible que le DSI.

Les valeurs élevées de Cv relevées au niveau des structures fines (capsule interne et corps calleux) peuvent être expliquées, comme dans le cas du fantôme, par les légères différences de placement des coupes et du champ de vue lié au placement manuel de l'objet étudié ce qui correspond à un effet de volume partiel particulièrement critique pour les structures de petite taille.

### *Tractographie*

Afin d'étudier la variabilité des résultats de tractographie nous avons utilisé 3 régions d'origines identiques pour chaque protocole. Les résultats sont compilés dans le tableau 6. Le nombre de fibres calculé est plus stable avec le QBI ( $Cv=0,009-0,128$ ) qu'avec le DSI ( $Cv=0,128-0,186$ ). Le protocole de QBI avec seulement 126 directions présente de moins bonnes performances qu'avec les 252 directions ( $Cv=0,116-0,212$ ). La longueur moyenne des fibres est beaucoup plus stable que le nombre de fibres, le DSI donne des résultats légèrement meilleurs que le QBI avec un coefficient de variation maximum inférieur à 0,041 alors que pour le QBI cette valeur monte à 0,075. Des exemples de tractographie *in vivo* sont présentés dans la figure 6.

### *Capacité à révéler un croisement de fibre*

La figure 7 présente des cartes d'ODFs des 3 protocoles *in vivo* ; QBI 252, QBI 126 et DSI d'une coupe axiale situé à bregma -7.3mm. La zone d'intérêt correspond aux colliculi supérieurs et plus précisément aux couches profondes des matières grises et blanches (DpG deep gray layer et DpWh deep white layer). Dans cette zone les ODFs ont révélé 2 directions principales de diffusion dans le plan axial comme décrit précédemment par Leegaard et al.

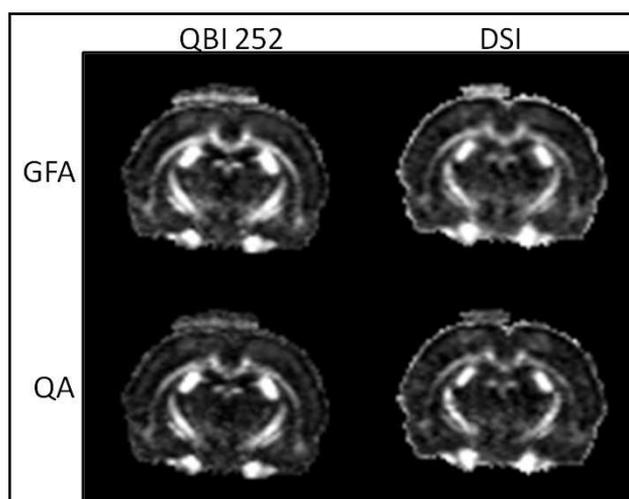


Figure 5 : Exemples de cartes de GFA (haut) et de QA (bas) calculées à partir des données *in vivo* de DSI (gauche) et QBI 252 (droite).

*In vivo* : tractographie : Coefficient de variation du nombre et de la longueur des fibres

Région d'origine	Cv du nombre de fibres calculées			Cv de la longueur des fibres		
	CC	fornix	IC	CC	fornix	IC
Q-ball-126	0,1155	0,2077	0,2120	0,0245	0,0320	0,0675
Q-ball-252	0,0990	0,1283	0,0490	0,0746	0,0206	0,0688
DSI	0,1697	0,1859	0,1278	0,0237	0,0410	0,0141

Tableau 6 : Résultats de tractographie *in vivo*. Coefficients de variation du nombre de fibres calculé et de leur longueur moyenne. Région d'origine : corps calleux (CC), fornix et capsule interne (IC).

[Leegaard et al. 2010]. Ces directions de croisement démontrent de façon convaincante la capacité des 3 protocoles à décrire des cas de croisement de fibre intra-voxel.

## Discussion

Nous avons systématiquement comparé l'imagerie Q-ball (QBI) à l'imagerie du spectre de diffusion (DSI) dans des conditions contrôlées. Dans ce but, un fantôme constitué de fibres de 15 $\mu$ m ainsi qu'un rat adulte ont été utilisés. Afin de comparer ces techniques dans des conditions réalistes pour de futures études longitudinales *in vivo* nous avons limité le temps d'acquisition d'un set d'images à 1 heure.

Typiquement, les études chez le petit animal sont réalisées avec des spectromètres dédiés et à des champs compris entre 7 et 11.7 Teslas. A ces hauts champs les valeurs réduites de T2 des différents tissus cérébraux limitent le temps disponible pour la pondération en diffusion, et donc les valeurs de B maximales utilisables. Dans notre cas, nous avons utilisé une valeur de B maximale de 2000 s/mm<sup>2</sup> permettant un niveau de SNR compatible avec un traitement efficace des données.

Ayant défini les deux principales limitations, 1 heure d'acquisition et B=2000 s/mm<sup>2</sup>, nous avons choisi de comparer une technique de DSI utilisant 203 directions (reparties sur 12 valeurs de B) au QBI utilisant 252 directions. Le moyennage de deux sets de données à 126 directions ainsi qu'un set de 126 directions (demi-sphère) ont aussi été comparés au set complet de 252 directions (sphère).

### Quantification de la tractographie pour des études longitudinales

En se basant sur nos résultats il est clair qu'utiliser le nombre de fibres calculé pour évaluer précisément l'évolution d'un groupe de fibres n'est pas efficace, particulièrement dans les cas les plus complexes (croisements de fibres avec une répartition différente : ce qui sera quasiment toujours le cas *in vivo*). Que ce soit *in vitro* et *in vivo* les niveaux importants de variations obtenus ne semblent pas compatibles avec la détection de petits changements biologiques. Par ailleurs, la bonne stabilité inter-sessions de la longueur moyenne des fibres révèle que ce peut être un paramètre intéressant dans le cadre d'études longitudinales. Un autre aspect qui pourrait se révéler intéressant est l'étude géométrique des résultats de tractographie, mais n'ayant utilisé qu'un seul rat sain nous n'avons pas pu étudier ce paramètre.

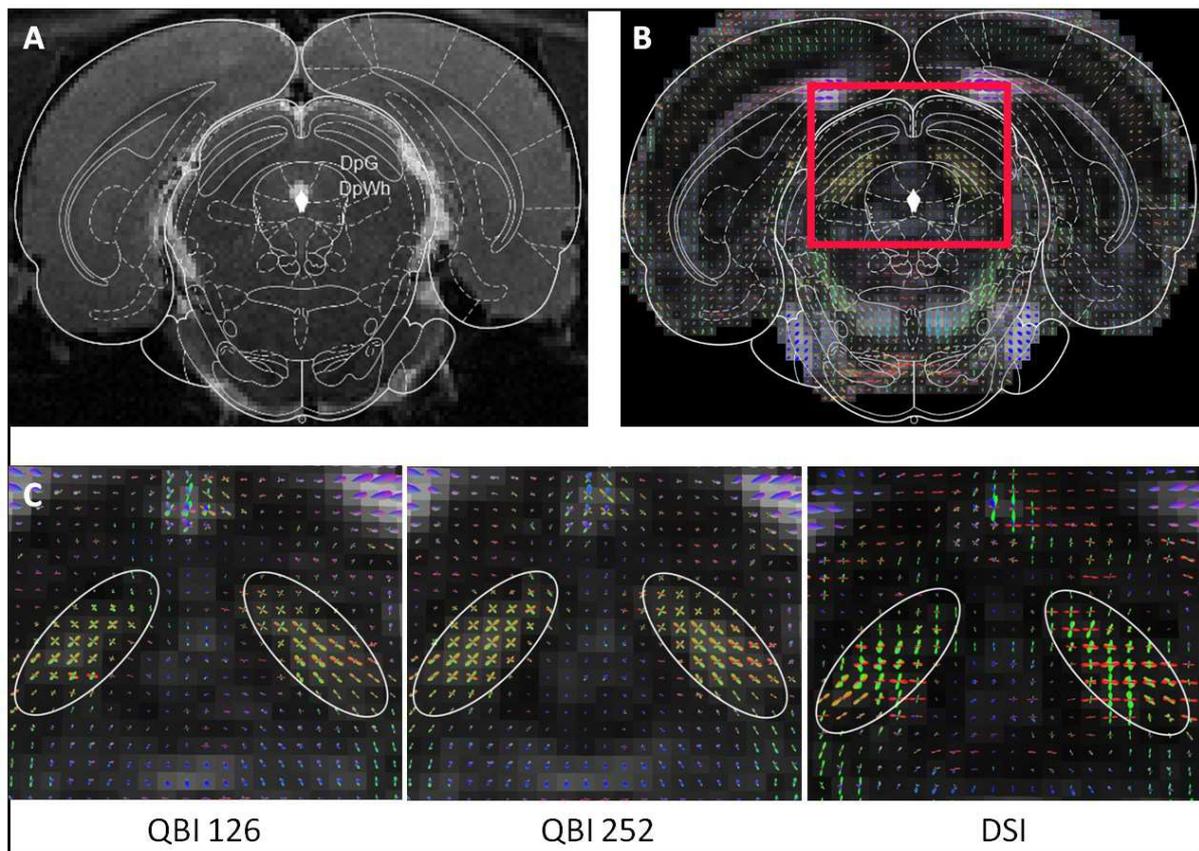


Figure 7 : A : Image T2 in vivo, d'une coupe située à Bregma -7.30mm avec, en surimposition, l'atlas anatomique. DpG : couche profonde grise du colliculus supérieur et DpWh : couche profonde blanche du collicules supérieur. B : Carte d'ODFs de la même coupe avec l'atlas anatomique superposé. Le carré rouge représente la zone agrandie en C. La zone d'intérêt est cerclée de blanc. Des exemples de QBI 126, QBI 252 et de DSI sont présentés.

## Angle de croisement

L'étude du fantôme présentant 2 groupes de fibres se croisant à 45° a confirmé que lorsque que l'angle de croisement est inférieur à 90° les protocoles d'imagerie de diffusion entraînent une sous-estimation de cet angle [Zhan et al. 2006]. Cette erreur peut mener à des faux positifs ou des faux négatifs, Toutefois, vu la résolution des images comparée à la taille des faisceaux de fibres axonales ces résultats erronés devraient être négligeables.

## Comparaison quantitative du QBI et du DSI

En regardant les résultats de façon globale, dans notre cas, le QBI s'est révélé plus performant que le DSI. Le DSI devrait être meilleur puisqu'il utilise un échantillonnage complet de l'espace Q mais, compte tenu de la valeur de B maximale utilisée (2000 s/mm<sup>2</sup>), le QBI prend l'avantage. Ce résultat est en accord avec une précédente étude réalisée par Kuo [Kuo et al. 2008] montrant qu'un protocole de DSI optimisé nécessite une valeur de B maximale (3000 s/mm<sup>2</sup>) supérieure à celle nécessaire à l'optimisation d'un protocole de QBI (2500 s/mm<sup>2</sup>). Donc, quand la valeur de B est limitée, l'imagerie Q-ball semble être un meilleur choix.

A partir des différents protocoles de QBI que nous avons étudiés, nous pouvons dire que, comme décrit dans la littérature [Jones et al. 1999], utiliser un plus grand nombre de directions donne de meilleurs résultats comparé à un moyennage de données. Il faut par ailleurs souligner les bonnes performances du QBI n'utilisant un nombre limité de directions réparties sur une demi-sphère, et donc nécessitant un temps d'acquisition réduit (30 minutes). Une telle expérience pourrait dès lors plus facilement introduite dans un protocole d'étude *in vivo*.

Que ce soit *in vivo* et *in vitro* l'impact du positionnement de l'échantillon et du champ de vue sur la variabilité des données reste important. Ce résultat montre qu'une attention particulière doit être accordée au positionnement des animaux lors d'études longitudinales.

## Améliorations futures

La principale limitation de l'imagerie à haut champ/haute valeur de B est le rapport signal sur bruit (SNR) des images obtenues. L'utilisation de matériels plus performants, comme des bobines à fort SNR (réseaux d'antennes ou antennes cryogéniques) combinées à des gradients à haute performance devrait permettre l'acquisition de données avec un SNR plus élevé, et/ou



des temps d'acquisition plus courts, et/ou des valeurs de B supérieures et/ou des résolutions plus élevées.

### **Conclusion**

Nous avons montré que, que dans nos conditions d'acquisition, l'imagerie Q-ball est plus performante que le DSI. Nous avons aussi mis en évidence l'importance d'une bonne reproductibilité du placement des animaux, critique lors d'études longitudinales. Par ailleurs, lors de ce type d'étude, il faut garder à l'esprit le caractère fluctuant des valeurs extraites des cartes paramétriques. Il apparaît aussi qu'opter pour une comparaison de la longueur moyenne des fibres calculée est plus efficace en termes de reproductibilité que la mesure du nombre de fibres.

A partir de ces résultats nous avons entrepris les premiers essais d'imagerie Q-ball *in vivo* chez le rat nouveau-né. Les premiers résultats sont présentés dans la partie 2 de ce chapitre.



## **Partie 2 : étude préliminaire chez le rat nouveau-né**

### Introduction

L'utilisation de techniques de tractographie pour l'étude de la maturation cérébrale apparaît comme un choix judicieux. La capacité de ces techniques à révéler les différentes connectivités neuronales ainsi qu'à caractériser le tissu cérébral sont d'un intérêt majeur tant pour l'étude de l'évolution cérébrale après la naissance que pour étudier les effets d'une pathologie sur le développement du cerveau. Réaliser ce genre d'étude longitudinale, *in vivo* de manière totalement non invasive fait de l'IRM de diffusion la meilleure technique pour l'étude de l'évolution des connectivités cérébrales.

L'étude de la maturation cérébrale par tractographie a été réalisée par Takahashi et al. en 2010. Cette étude a été réalisée *ex vivo*, à 4,7 et 9,4 Teslas. Pour cette étude, des cerveaux de chats âgés de 0, 25, 70 et 100 jours ont été fixés par du paraformaldéhyde et traités au gadolinium pour réduire le T1 des tissus cérébraux. Un protocole de DSI utilisant 515 couples valeur de B /direction de diffusion pour un temps d'acquisition de 18,5 heures a été utilisé. Ils ont pu ainsi décrire la complexification du tractus cortico-thalamique pendant la maturation cérébrale.

Bien que l'étude *ex vivo* permette l'obtention d'images à fort SNR pour des résolutions et des valeurs de B élevées, nous pensons que l'étude *in vivo* est plus intéressante. Elle ouvre la possibilité de réaliser des études longitudinales et de donc de suivre l'évolution d'un même animal. De plus ce type de protocole est plus adapté à l'étude de cas pathologiques et de suivi de traitements.

Au vu des résultats de la comparaison entre le QBI et le DSI sur le rat adulte, nous avons choisi d'utiliser le protocole de QBI avec 126 directions réparties sur une demi-sphère pour un temps d'acquisition de 30 minutes.

L'objectif de cette étude préliminaire est de vérifier si ce protocole permet d'obtenir des informations intéressantes sur le cerveau de rat en développement. Nous nous sommes focalisés sur les capacités de tractographie du QBI, permettant, par opposition au DTI de résoudre les cas de croisements de fibres dans un même voxel.

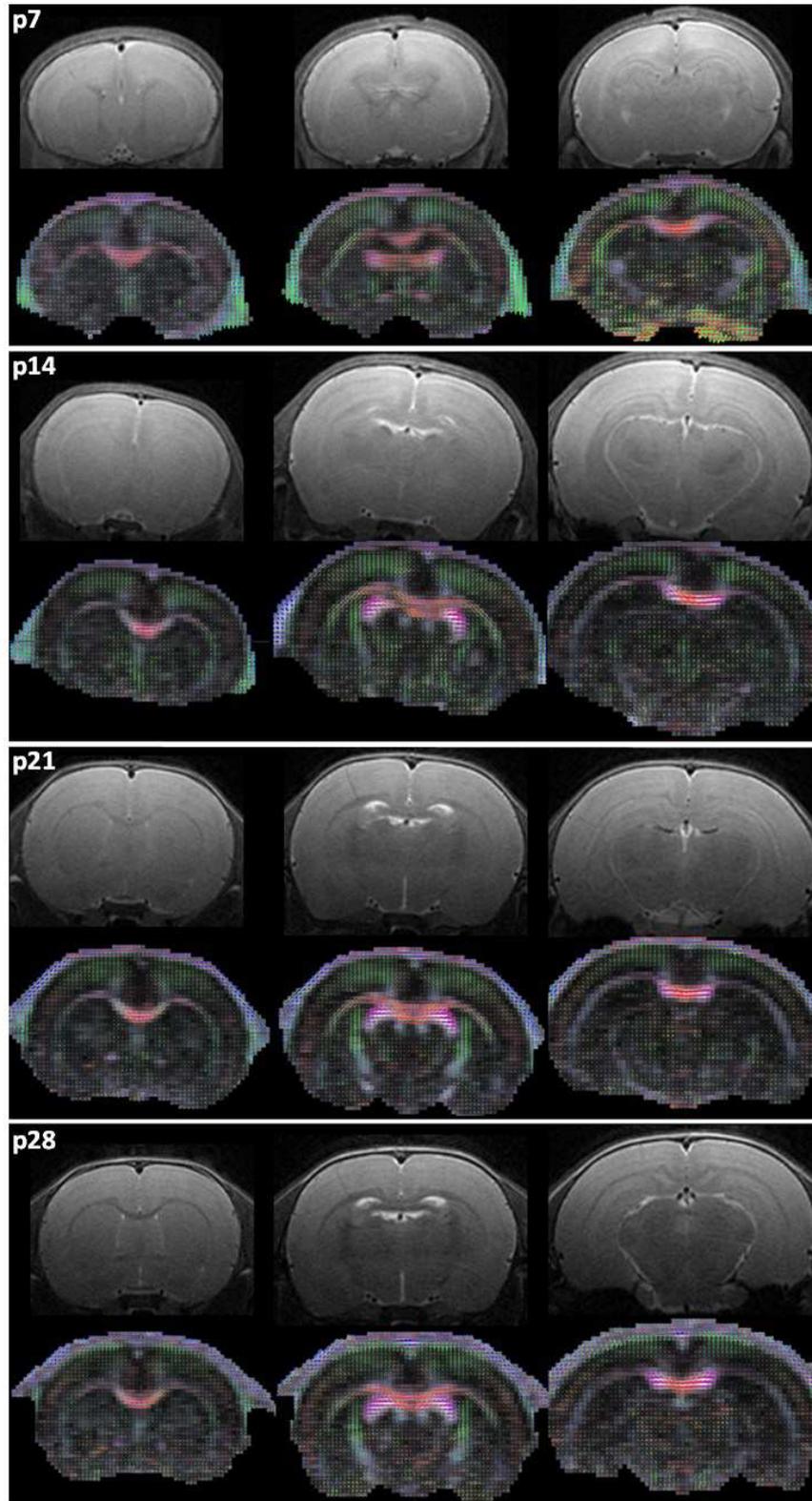


Figure 8 : Images anatomiques pondérées T2 et cartes d'ODFs correspondantes de 3 coupes non consécutives pour le même rat à p7, p14, p21 et p28. Les cartes d'ODFs sont superposées aux cartes de QA (principal).

## Matériel

Les différentes données ont été acquises à 7 Teslas, aimant horizontal (Oxford, Royaume-Uni) interfacé à une console Bruker Avance II et pilotée par le logiciel Paravision 5.1 (Bruker, Allemagne). Gradients d'intensité maximale de 364 mT/m et temps de montée de 100 $\mu$ s.

Pour l'émission et la réception radio fréquence un ensemble de bobines en quadrature activement découplées a été utilisé : résonateur de 68mm de diamètre pour l'excitation et une bobine de surface conçue pour l'imagerie cérébrale de la souris pour la réception (Bruker, Allemagne).

## Animal

Pour ces premiers résultats un rat nouveau-né Wistar a été suivi de 7 à 28 jours après sa naissance (Janvier, le Genest-St-Isle, France). Laisse dans la cage avec sa mère jusqu'à 21 jours il en a ensuite été séparé. (Les animaux sont maintenus suivant un cycle jour/nuit de 12 heures/12 heures et ont eau et nourriture *ad libitum*.)

## Méthode

Les sessions d'imagerie ont consisté en l'acquisition d'images anatomiques pondérées T2 suivies d'un set d'images pondérées en diffusion pour le protocole Q-ball. Elles ont été réalisées à p7, p14, p21 et p28 afin de suivre le développement cérébral.

Image anatomiques : séquence d'écho de spin de type RARE : TR/TE = 3500/50ms, matrice = 256\*256\*20, champ de vue = 32\*32\*10mm, rare factor = 4 et nombre d'acquisition = 2. Temps d'acquisition = 6 minutes.

Images Q-ball : séquence d'échos de spin EPI-diffusion : TR/TE = 3500/24 ms, matrice = 128\*128\*11, champ de vue = 32\*32\*11 mm nombre de segments = 4, temps de diffusion :  $\delta + \Delta = 6+12$  ms et valeur de B = 2000 s/mm<sup>2</sup>. Temps d'acquisition = 30 minutes.

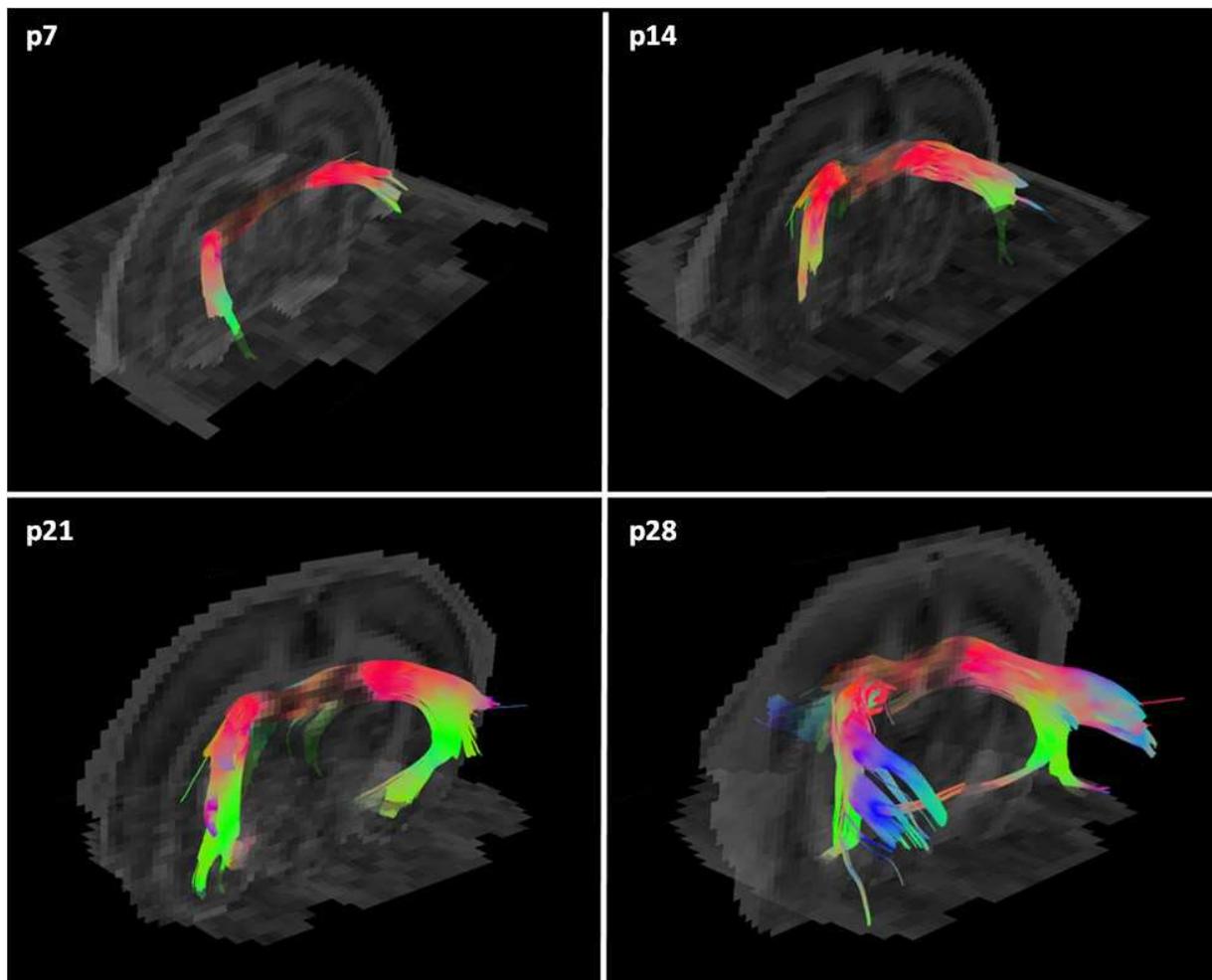


Figure 9 : Représentation en 3 dimensions des résultats de tractographie du Fornix chez le même rat à p7, p14, p21 et p28. Un plan axial et un plan coronal sont utilisés (cartes de GFA) en tant que repères anatomiques. Les fibres sont colorées en fonction de leur orientation : haut/bas = vert, gauche/droite = rouge et avant arrière = bleu.

## Traitements des données de QBI

Les fluctuations des images de QBI ont été corrigées en utilisant l'outil FLIRT partie de la suite d'outils FSL (FMRIB Software Library v4.0). Les données corrigées ont ensuite été reconstruites à l'aide du logiciel DSI Studio ([dsi-studio.labsolver.org](http://dsi-studio.labsolver.org)). Les ODFs (Orientation Distribution Function) ont été calculées en utilisant la transformation de Funk-Radon à partir des images de QBI et plus précisément l'approche de Descoteaux [Descoteaux et al. 2009]. Pour garantir des ODFs fiables 2 paramètres doivent être optimisés : le kernel d'interpolation ici choisi égal à 5 ainsi que le kernel de lissage ici choisi égal à 8. Pour la reconstruction des données nous avons utilisé une tessellation des ODFs égale à 8 et un facteur de déconvolution de 0,1.

La tractographie a été réalisée en utilisant les paramètres suivant : Seuil de QA = 0,15, angle maximum entre voxels consécutifs = 20°, longueur minimum = 5mm et un nombre de points d'origine = 20 000. Les zones d'origines utilisées correspondent aux Fimbrias (gauches et droite) situé à Bregma -2,56mm chez le rat adulte [Atlas de Paxinos et Watson 1998].

## Résultats

La figure 8 présente des cartes de d'ODFs superposées aux cartes de QA (direction principale) correspondantes. Il est clair que, dès p7, notre protocole est capable de révéler l'organisation principale du cerveau et que celle-ci correspond déjà aux résultats obtenus à p28. La principale évolution observée sur les ODFs est leur allongement au niveau de la matière blanche correspondant à une structuration progressive de ces structures.

En tant que test tractographique nous avons choisi d'étudier l'évolution du Fornix, sa géométrie plutôt complexe nous ayant parue intéressante pour évaluer les performances de notre protocole.

La Figure 9 présente les tractographies réalisées à p7, p14, p21 et p28. Nos résultats montrent clairement que plus le cerveau se structure plus l'on est capable d'obtenir une cartographie complète du Fornix. Plus qu'une information visuelle l'évolution du Fornix ou, en tout cas, l'évolution des résultats de tractographie se traduisent par une augmentation du nombre de fibres calculé (p7 : 530 ; p14 : 620 ; p21 : 680 ; p28 : 740) ainsi que de leur longueur moyenne (p7 : 8,7mm ; p14 : 9,4mm ; p21 : 9,9mm ; p28 : 10,2mm).



## Conclusion

Nos premiers tests de tractographie *in vivo* chez le rat nouveau-né se sont avérés concluants. Avec un temps d'acquisition de seulement 30 minutes nous avons été capables d'obtenir des reconstructions de QBI satisfaisantes que ce soit pour un rat p7 ou p28. Les résultats de tractographies du Fornix ont permis de visualiser une évolution claire la maturation cérébrale. Il faut malgré tout garder à l'esprit que, même si les tractographies donnent l'impression que le Fornix s'est étendu avec le développement cérébral, ces résultats sont le reflet des paramètres caractéristiques des fibres, calculés avec nos paramètres et non la vérité biologique.

Il est important de noter que, dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser les mêmes paramètres que ce soit pour l'acquisition ou le traitement des données. Compte tenu de l'évolution du volume et des caractéristiques de diffusion du cerveau entre p7 et p28, d'autres solutions seraient possibles. Adapter le champ de vue au volume cérébral pourrait être une option, permettant d'un point de vue géométrique une meilleure comparaison entre les différents temps d'observation. Cependant, changer la résolution induit des changements de SNR qu'il faudrait potentiellement prendre en compte. De la même façon, avec la maturation cérébrale, la diffusivité de l'ensemble des structures cérébrales décroît, et la valeur de QA (principale), servant de seuil pour la tractographie, augmente. Nous avons choisi d'utiliser une valeur seuil de QA basse (1,5) afin de ne pas induire de biais entre les différents temps d'observation liés à l'adaptation de ce seuil à l'âge du rat. Cependant adapter cette valeur pourrait permettre de réaliser les tractographies dans les mêmes conditions de spécificité.

Il serait donc intéressant d'étudier les différentes possibilités d'adaptation des paramètres à l'âge des rat imagés afin d'optimiser les capacités et la reproductibilité de notre protocole.

Le temps d'acquisition assez court de ce protocole (30 minutes) le rend attractif pour une insertion dans une étude multiparamétrique. Nous pensons aussi qu'un tel protocole est un bon candidat au vu du remplacement d'un protocole d'imagerie de diffusion classique de type DTI.

L'utilisation de matériels plus performants, réseau d'antennes, antennes cryogéniques et gradients haute performance permettra d'améliorer les résultats, en terme de résolution, de valeur de b maximum et de temps d'acquisition.



## **Conclusion générale**

Pour l'étude de l'ischémie focale cérébrale chez le rat nouveau-né nous avons mis en place un protocole d'imagerie combinant imagerie renforcée par le manganèse et imagerie du tenseur de diffusion. Notre protocole MEMRI, basé sur une approche précoce et dynamique, nous a permis de mettre en évidence une atteinte du tractus cortico-thalamique suite à l'ischémie. Les résultats de DTI, bien que non statistiques, nous ont permis de mettre en évidence un impact de l'ischémie focale (cortex gauche) sur l'ensemble du cerveau, hémisphère contro-latéral inclus. Au vu de nos résultats nous avons entrepris les premiers tests histologiques que nous pensons utiles pour la détermination des phénomènes biologiques liés à l'atteinte fonctionnelle du tractus cortico-thalamique ainsi qu'aux différences observées par imagerie de diffusion.

L'utilisation de notre protocole MEMRI dans le cadre d'études visant à tester l'efficacité de traitements pharmacologiques nous semble intéressant. En effet, plus que de s'intéresser à la lésion elle-même, notre méthode permettra d'étudier de façon dynamique et fine l'impact d'un traitement sur les performances d'une voie neuronale.

Suite aux résultats de DTI et à l'achat d'un ensemble résonateur/antenne de surface performant nous avons entrepris d'utiliser des techniques d'imagerie de diffusion plus performantes : imagerie du spectre de diffusion DSI et imagerie Q-ball (QBI). La première étape a été de comparer la reproductibilité de ces deux techniques dans des conditions compatibles avec une étude longitudinale sur des animaux pathologiques. Cette comparaison nous a permis de montrer que, pour des temps d'acquisition semblables et une valeur de B maximale identique, l'imagerie Q-ball est plus performante. Fort de cette conclusion nous avons réalisé une étude préliminaire de tractographie *in vivo* chez le rat nouveau-né dont les résultats se sont avérés concluants. L'utilisation de la tractographie pour de futures études de la maturation cérébrale en parallèle ou non à l'utilisation du MEMRI a le potentiel d'apporter des informations intéressantes et complémentaires sur l'évolution des connectivités neuronales tant dans le cas d'animaux sains que d'animaux pathologiques



## **Bibliographie**

**Anderson AW.** Measurement of fiber orientation distributions using high angular resolution diffusion imaging. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine.* 2005;54(5):1194-1206.

**Aoki I,** Naruse S, Tanaka C. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) of brain activity and applications to early detection of brain ischemia. *NMR in biomedicine.* 2004;17(8):569-580.

**Aoki I,** Wu YJ, Silva AC, et al. In vivo detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese-enhanced MRI. *NeuroImage.* 2004;22(3):1046-1059.

**Barone FC,** Feuerstein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 1999;19(8):819-834.

**Basser PJ,** Mattiello J, LeBihan D. MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophysical journal.* 1994;66(1):259-267.

**Basser PJ,** Pierpaoli C. Microstructural and physiological features of tissues elucidated by quantitative-diffusion-tensor MRI. 1996. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif : 1997).* 2011;213(2):560-570.

**Bassett DS,** Brown JA, Deshpande V, et al. Conserved and variable architecture of human white matter connectivity. *NeuroImage.* 2011;54(2):1262-1279.

**Bockhorst KH,** Narayana PA, Liu R, et al. Early postnatal development of rat brain: in vivo diffusion tensor imaging. *Journal of neuroscience research.* 2008;86(7):1520-1528.

**Bogaert A.** Détection de suivi de cellules marquées en micro-imagerie de résonance magnétique. Université d'Evry val d'Essonne 2007.

**Bonnin P,** Leger PL, Deroide N, et al. Impact of intracranial blood-flow redistribution on stroke size during ischemia-reperfusion in 7-day-old rats. *Journal of neuroscience methods.* 2011;198(1):103-109.

**Buchan AM,** Xue D, Slivka A. A new model of temporary focal neocortical ischemia in the rat. *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 1992;23(2):273-279.

**Canals S,** Beyerlein M, Keller AL, et al. Magnetic resonance imaging of cortical connectivity in vivo. *NeuroImage.* 2008;40(2):458-472.

**Care HY,** Purcell E M. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *physical review.* 1954;94(3):630-638.

**Chiu CH**, Lo YC, Tang HS, et al. White matter abnormalities of fronto-striato-thalamic circuitry in obsessive-compulsive disorder: A study using diffusion spectrum imaging tractography. *Psychiatry research*. 2011;192(3):176-182.

**Chuang KH**, Koretsky AP, Sotak CH. Temporal changes in the T1 and T2 relaxation rates ( $\Delta R_1$  and  $\Delta R_2$ ) in the rat brain are consistent with the tissue-clearance rates of elemental manganese. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 2009;61(6):1528-1532.

**Cohen Y**, Assaf Y. High b-value q-space analyzed diffusion-weighted MRS and MRI in neuronal tissues - a technical review. *NMR in biomedicine*. 2002;15(7-8):516-542.

**Cohen-Adad J**, Descoteaux M, Rossignol S, et al. Detection of multiple pathways in the spinal cord using q-ball imaging. *NeuroImage*. 2008;42(2):739-749.

**Cohen-Adad J**, Leblond H, Delivet-Mongrain H, et al. Wallerian degeneration after spinal cord lesions in cats detected with diffusion tensor imaging. *NeuroImage*. 2011;57(3):1068-1076.

**Connick RE**, Poulson RE. . Effect of paramagnetic ions on the nuclear magnetic resonance of O-17 in water and the rate of elimination of water from molecules in the first coordination sphere of cations. *Jchem Phys*. 1959;30:759-761.

**De Santis S**, Gabrielli A, Palombo M, et al. Non-Gaussian diffusion imaging: a brief practical review. *Magnetic resonance imaging*. 2011;29(10):1410-1416.

**Derugin N**, Ferriero DM, Vexler ZS. Neonatal reversible focal cerebral ischemia: a new model. *Neuroscience research*. 1998;32(4):349-353.

**Descoteaux M**, Angelino E, Fitzgibbons S, et al. Regularized, fast, and robust analytical Q-ball imaging. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 2007;58(3):497-510.

**Descoteaux M**, Deriche R, Knosche TR, et al. Deterministic and probabilistic tractography based on complex fibre orientation distributions. *IEEE transactions on medical imaging*. 2009;28(2):269-286.

**Dirnagl U**, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences*. 1999;22(9):391-397.

**Faustino JV**, Wang X, Johnson CE, et al. Microglial cells contribute to endogenous brain defenses after acute neonatal focal stroke. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(36):12992-13001.

**Granziera C**, Schmahmann JD, Hadjikhani N, et al. Diffusion spectrum imaging shows the structural basis of functional cerebellar circuits in the human cerebellum in vivo. *PloS one*. 2009;4(4):e5101.

**Hahn EL**. Spin Echoes. *physics review*. 1950(80):580-594.

**Hess CP**, Mukherjee P, Han ET, et al. Q-ball reconstruction of multimodal fiber orientations using the spherical harmonic basis. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 2006;56(1):104-117.

**Hu TC**, Chuang KH, Yanasak N, et al. Relationship between blood and myocardium manganese levels during manganese-enhanced MRI (MEMRI) with T1 mapping in rats. *NMR in biomedicine*. 2011;24(1):46-53.

**Jensen JH**, Helpert JA, Ramani A, et al. Diffusional kurtosis imaging: the quantification of non-gaussian water diffusion by means of magnetic resonance imaging. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 2005;53(6):1432-1440.

**Jeong JW**, Chugani DC, Behen ME, et al. Altered White Matter Structure of the Dentatorubrothalamic Pathway in Children with Autistic Spectrum Disorders. *Cerebellum (London, England)*. 2012.

**Jones DK**, Horsfield MA, Simmons A. Optimal strategies for measuring diffusion in anisotropic systems by magnetic resonance imaging. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 1999;42(3):515-525.

**Kawai Y**, Aoki I, Umeda M, et al. In vivo visualization of reactive gliosis using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *NeuroImage*. 2010;49(4):3122-3131.

**Kim YB**, Kalthoff D, Po C, et al. Connectivity of thalamo-cortical pathway in rat brain: combined diffusion spectrum imaging and functional MRI at 11.7 T. *NMR in biomedicine*. 2012;25(7):943-952.

**Kuo LW**, Chen JH, Wedeen VJ, et al. Optimization of diffusion spectrum imaging and q-ball imaging on clinical MRI system. *NeuroImage*. 2008;41(1):7-18.

**Kuo LW**, Lee CY, Chen JH, et al. Mossy fiber sprouting in pilocarpine-induced status epilepticus rat hippocampus: a correlative study of diffusion spectrum imaging and histology. *NeuroImage*. 2008;41(3):789-800.

**Landman BA**, Farrell JA, Huang H, et al. Diffusion tensor imaging at low SNR: nonmonotonic behaviors of tensor contrasts. *Magnetic resonance imaging*. 2008;26(6):790-800.

**Larrabee MG**, Posternak JM. Selective action of anesthetics on synapses and axons in mammalian sympathetic ganglia. *Journal of neurophysiology*. 1952;15(2):91-114.

**Lauzon CB**, Asman AJ, Crainiceanu C, et al. Assessment of bias for MRI diffusion tensor imaging using SIMEX. *Medical image computing and computer-assisted intervention : MICCAI International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*. 2011;14(Pt 2):107-115.

**Le Bihan D**, Poupon C, Amadon A, et al. Artifacts and pitfalls in diffusion MRI. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*. 2006;24(3):478-488.

**Le Bihan DB**, E. Imagerie de diffusion in vivo par résonance magnétique nucléaire. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*. 1985;301(15):1109-1112.

**Leergaard TB**, Bjaalie JG, Devor A, et al. In vivo tracing of major rat brain pathways using manganese-enhanced magnetic resonance imaging and three-dimensional digital atlas. *NeuroImage*. 2003;20(3):1591-1600.

**Leergaard TB**, White NS, de Crespigny A, et al. Quantitative histological validation of diffusion MRI fiber orientation distributions in the rat brain. *PloS one*. 2010;5(1):e8595.

41. Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *The American journal of pathology*. 1960;36:1-17.

**Lin CP**, Wedeen VJ, Chen JH, et al. Validation of diffusion spectrum magnetic resonance imaging with manganese-enhanced rat optic tracts and ex vivo phantoms. *NeuroImage*. 2003;19(3):482-495.

**Lin YJ**, Koretsky AP. Manganese ion enhances T1-weighted MRI during brain activation: an approach to direct imaging of brain function. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 1997;38(3):378-388.

**Lo YC**, Soong WT, Gau SS, et al. The loss of asymmetry and reduced interhemispheric connectivity in adolescents with autism: a study using diffusion spectrum imaging tractography. *Psychiatry research*. 2011;192(1):60-66.

**Manfield P**. Multi-planar image formation using NMR spin echoes. *Journal of Physics C: Solid State Physics*. 1977;10(3): L55-L58.

**Mildvan AS**, Cohn M. Magnetic resonance studies of the interaction of the manganese ion with bovine serum albumin. *Biochemistry*. 1963;2:910-919.

**Mitra PP**. Multiple wave-vector extensions of the NMR pulsed-field-gradient spin-echo diffusion measurement. *Physical review B, Condensed matter*. 1995;51(21):15074-15078.

**Moussavi-Biugui A**, Stieltjes B, Fritzsche K, et al. Novel spherical phantoms for Q-ball imaging under in vivo conditions. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 2011;65(1):190-194.

**Mugler JP**, 3rd, Brookeman JR. Three-dimensional magnetization-prepared rapid gradient-echo imaging (3D MP RAGE). *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 1990;15(1):152-157.

**Pautler RG**, Silva AC, Koretsky AP. In vivo neuronal tract tracing using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Magnetic resonance in medicine : official journal of*

the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine. 1998;40(5):740-748.

**Paxinos G**, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates 1998.

**Po C**. Etude par IRM à haut champ de l'ischémie cérébrale transitoire chez le rat nouveau-né. Université d'Evry val d'Essonne 2009.

**Prckovska V**, Roebroek AF, Pullens WL, et al. Optimal acquisition schemes in high angular resolution diffusion weighted imaging. Medical image computing and computer-assisted intervention : MICCAI International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention. 2008;11(Pt 2):9-17.

**Qiao M**, Malisza KL, Del Bigio MR, et al. Correlation of cerebral hypoxic-ischemic T2 changes with tissue alterations in water content and protein extravasation. Stroke; a journal of cerebral circulation. 2001;32(4):958-963.

**Qiao M**, Malisza KL, Del Bigio MR, et al. Transient hypoxia-ischemia in rats: changes in diffusion-sensitive MR imaging findings, extracellular space, and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> -adenosine triphosphatase and cytochrome oxidase activity. Radiology. 2002;223(1):65-75.

**Renolleau S**, Aggoun-Zouaoui D, Ben-Ari Y, et al. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat: morphological changes indicative of apoptosis. Stroke; a journal of cerebral circulation. 1998;29(7):1454-1460; discussion 1461.

**Rice JE**, 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. Annals of neurology. 1981;9(2):131-141.

**Riley JE**, C. Handbook of Behavioral Teratology 1986.

**Roohey T**, Raju TN, Moustogiannis AN. Animal models for the study of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a critical analysis. Early human development. 1997;47(2):115-146.

**Sandvig A**, Sandvig I, Berry M, et al. Axonal tracing of the normal and regenerating visual pathway of mouse, rat, frog, and fish using manganese-enhanced MRI (MEMRI). Journal of magnetic resonance imaging : JMRI. 2011;34(3):670-675.

**Schmahmann JD**, Pandya DN, Wang R, et al. Association fibre pathways of the brain: parallel observations from diffusion spectrum imaging and autoradiography. Brain : a journal of neurology. 2007;130(Pt 3):630-653.

**Schroeter M**, Franke C, Stoll G, et al. Dynamic changes of magnetic resonance imaging abnormalities in relation to inflammation and glial responses after photothrombotic cerebral infarction in the rat brain. Acta neuropathologica. 2001;101(2):114-122.

**Shazeeb MS**, Sotak CH. Dose dependence and temporal evolution of the T(1) relaxation time and MRI contrast in the rat brain after subcutaneous injection of manganese chloride. Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine. 2012.

**Simmons JM**, Saad ZS, Lizak MJ, et al. Mapping prefrontal circuits in vivo with manganese-enhanced magnetic resonance imaging in monkeys. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28(30):7637-7647.

**Simpson PB**, Challiss RA, Nahorski SR. Divalent cation entry in cultured rat cerebellar granule cells measured using Mn<sup>2+</sup> quench of fura 2 fluorescence. *The European journal of neuroscience*. 1995;7(5):831-840.

**Sizonenko SV**, Camm EJ, Garbow JR, et al. Developmental changes and injury induced disruption of the radial organization of the cortex in the immature rat brain revealed by in vivo diffusion tensor MRI. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)*. 2007;17(11):2609-2617.

**Song SK**, Sun SW, Ramsbottom MJ, et al. Dysmyelination revealed through MRI as increased radial (but unchanged axial) diffusion of water. *NeuroImage*. 2002;17(3):1429-1436.

**Soria G**, Wiedermann D, Justicia C, et al. Reproducible imaging of rat corticothalamic pathway by longitudinal manganese-enhanced MRI (L-MEMRI). *NeuroImage*. 2008;41(3):668-674.

**Stejskal EO**, Tanner JE. Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *J Chem Phys*. 1965;42(288):5.

**Takahashi E**, Dai G, Wang R, et al. Development of cerebral fiber pathways in cats revealed by diffusion spectrum imaging. *NeuroImage*. 2010;49(2):1231-1240.

**Thuen M**, Singstad TE, Pedersen TB, et al. Manganese-enhanced MRI of the optic visual pathway and optic nerve injury in adult rats. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*. 2005;22(4):492-500.

**Tuch DS**. Q-ball imaging. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 2004;52(6):1358-1372.

**Tuch DS**, Reese TG, Wiegell MR, et al. High angular resolution diffusion imaging reveals intravoxel white matter fiber heterogeneity. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 2002;48(4):577-582.

**Tuor UI**, Kozlowski P, Del Bigio MR, et al. Diffusion- and T2-weighted increases in magnetic resonance images of immature brain during hypoxia-ischemia: transient reversal posthypoxia. *Experimental neurology*. 1998;150(2):321-328.

**Tjalve H**, Henriksson J, Tallkvist J, et al. Uptake of manganese and cadmium from the nasal mucosa into the central nervous system via olfactory pathways in rats. *Pharmacology & toxicology*. 1996;79(6):347-356.

**Van der Linden A**, Van Meir V, Tindemans I, et al. Applications of manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) to image brain plasticity in song birds. *NMR in biomedicine*. 2004;17(8):602-612.

**Van der Zijden JP**, Bouts MJ, Wu O, et al. Manganese-enhanced MRI of brain plasticity in relation to functional recovery after experimental stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2008;28(4):832-840.

**Van der Zijden JP**, Wu O, Van der Toorn A, et al. Changes in neuronal connectivity after stroke in rats as studied by serial manganese-enhanced MRI. *NeuroImage*. 2007;34(4):1650-1657.

**Villapol S**, Bonnin P, Fau S, et al. Unilateral blood flow decrease induces bilateral and symmetric responses in the immature brain. *The American journal of pathology*. 2009;175(5):2111-2120.

**Wang Q**, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *Journal of neuroimmunology*. 2007;184(1-2):53-68.

**Wang S**, Wu EX, Cai K, et al. Mild hypoxic-ischemic injury in the neonatal rat brain: longitudinal evaluation of white matter using diffusion tensor MR imaging. *AJNR American journal of neuroradiology*. 2009;30(10):1907-1913.

**Wang TT**, Kwon HS, Dai G, et al. Resolving myoarchitectural disarray in the mouse ventricular wall with diffusion spectrum magnetic resonance imaging. *Annals of biomedical engineering*. 2010;38(9):2841-2850.

**Watanabe T**, Frahm J, Michaelis T. Functional mapping of neural pathways in rodent brain in vivo using manganese-enhanced three-dimensional magnetic resonance imaging. *NMR in biomedicine*. 2004;17(8):554-568.

**Wedeen VJ**, Hagmann P, Tseng WY, et al. Mapping complex tissue architecture with diffusion spectrum magnetic resonance imaging. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 2005;54(6):1377-1386.

**Wedeen VJ**, Wang RP, Schmahmann JD, et al. Diffusion spectrum magnetic resonance imaging (DSI) tractography of crossing fibers. *NeuroImage*. 2008;41(4):1267-1277.

**Wideroe M**, Olsen O, Pedersen TB, et al. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging of hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *NeuroImage*. 2009;45(3):880-890.

**WILLIAMS D. G**, et al. Modest hypothermia preserves cerebral energy metabolism during hypoxia-ischemia and correlates with brain damage : A [<sup>31</sup>P] nuclear magnetic resonance study in unanesthetized neonatal rats. Hagerstown, MD, ETATS-UNIS: Lippincott Williams & Wilkins 1997.

**Yager JSA**, S. Animal model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Neurol*. 2009;40(3):156-167.

**Yang J**, Wu EX. Manganese-enhanced MRI detected the gray matter lesions in the late phase of mild hypoxic-ischemic injury in neonatal rat. *Conference proceedings : Annual*

International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Conference. 2007;2007:51-54.

**Yang Y**, De Gervai PD, Sun J, et al. Dynamic manganese-enhanced magnetic resonance imaging can detect chronic cryoinjury-induced infarction in pig hearts in vivo. *Contrast media & molecular imaging*. 2011;6(6):426-436.

**Yeh FC**, Wedeen VJ, Tseng WY. Generalized q-sampling imaging. *IEEE transactions on medical imaging*. 2010;29(9):1626-1635.

**Yeh FC**, Wedeen VJ, Tseng WY. Estimation of fiber orientation and spin density distribution by diffusion deconvolution. *NeuroImage*. 2011;55(3):1054-1062.

**Yu X**, Wadghiri YZ, Sanes DH, et al. In vivo auditory brain mapping in mice with Mn-enhanced MRI. *Nature neuroscience*. 2005;8(7):961-968.

**Zhan W**, Yang Y. How accurately can the diffusion profiles indicate multiple fiber orientations? A study on general fiber crossings in diffusion MRI. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif : 1997)*. 2006;183(2):193-202.

# Abréviations

Abbreviation	Anglais	Français
ACC		Artère Carotide Commune
ACM		Artère Cérébrale Moyenne
ADC	Apparent Diffusion Coefficient	coefficient de diffusion apparent
BHE		Barrière Hémato-Encéphalique
CC	Corpus Callosum	corps calleux
CP	Caudate Putamen	caudate putamen
DSI	Diffusion Spectrum Imaging	imagerie du spectre de diffusion
DTI	Diffusion Tensor Imaging	imagerie du tenseur de diffusion
DWI	Diffusion weighted Imaging	imagerie pondérée en diffusion
EC	External Capsule	capsule externe
EPI	Echo Planar Imaging	imagerie echo planar
FA	Fractional Anisotropy	fraction d'anisotropie
FLASH	Fast Low Angle SHot	séquence d'echos de gradient rapide à bas angles
GFA	Generalized Fractional Anisotropy	fraction d'anisotropie généralisée
IC	Internal Capsule	capsule interne
MEMRI	Manganese Enhanced Magnetic Resonance Imaging	imagerie renforcée par le manganèse
MPRAGE	Magnetization Prepared Rapid Gradient Echo	echo de gradient rapide à magnétisation préparée
ODF	Orientation Diffusion function	fonction de l'orientation de diffusion
QA	Quantitative Anisotropy	anisotropie quantitative
QBI	Q-Ball Imaging	imagerie q-Ball
RARE	Rapid Acquisition with Refocused Echoes	acquisition rapide avec echos refocalisés
ROI	Region of interest	région d'intérêt
SN	Substantia Nigra	substance noire
TE		Temps d'Echo
Ti		Temps d'Inversion
TR		Temps de répétition



# **ANNEXES**



## Annexe 1 : Imagerie renforcée par le manganèse

**Intensité normalisé au niveau des noyaux thalamiques : avant injection (T0), 2 heures (T2), 5 heures (T5) et 24 heures (T24) après injection intra-corticale de manganèse :**

p14	T0	T2	sem	T5	sem	T24	sem
sains	1	1,211	0,054	1,397	0,073	1,504	0,066
shams	1	1,235	0,033	1,439	0,015	1,509	0,031
ischémiques	1	1,123	0,016	1,300	0,032	1,386	0,120

p21	T0	T2	sem	T5	sem	T24	sem
sains	1	1,247	0,055	1,580	0,020	1,618	0,015
shams	1	1,213	0,088	1,506	0,024	1,637	0,049
ischémiques	1	1,063	0,036	1,230	0,043	1,330	0,126

## Annexe 2 : Imagerie du tenseur de diffusion (DTI)

Valeurs moyennes et erreurs standards à la moyenne (SEM) pour les différents groupes d'animaux : Sains, Shams, Ischémies. Cpu= Caudate Putamen ; Th = Thalamus ; inj = site d'injection (S1) ; cortex ; ic = capsule interne ; cc + ec = corps calleux + capsule externe. Les indices i et c correspondent aux hémisphères ipsi-latéraux (gauche) et contra-latéraux (droite)

### Fraction d'anisotropie (FA) matière grise :

FA Sains	moyenne p7	SEM p7	moyenne p14	SEM p14	moyenne p21	SEM p21
Cpu i	0,16264	0,00454	0,16433	0,00888	0,17911	0,00722
Cpu c	0,15584	0,00863	0,15815	0,01063	0,16732	0,00742
Th i	0,22497	0,00794	0,24506	0,01550	0,26113	0,00986
Th c	0,21995	0,00810	0,24490	0,01798	0,26198	0,01741
inj i	0,22549	0,00872	0,22233	0,00417	0,23799	0,00668
inj c	0,23453	0,01419	0,20145	0,01690	0,23640	0,00900
cortex i	0,21598	0,00764	0,19773	0,01168	0,19700	0,00790
cortex c	0,19876	0,00583	0,20320	0,00727	0,21503	0,00674

FA Shams	moyenne p7	SEM p7	moyenne p14	SEM p14	moyenne p21	SEM p21
Cpu i	0,16264	0,00454	0,17906	0,01058	0,21584	0,01156
Cpu c	0,15584	0,00863	0,18057	0,01052	0,20724	0,01180
Th i	0,22497	0,00794	0,23828	0,01197	0,26899	0,01638
Th c	0,21995	0,00810	0,22481	0,01231	0,27430	0,02075
inj i	0,22549	0,00872	0,25242	0,00265	0,27066	0,01998
inj c	0,23453	0,01419	0,23577	0,00671	0,26072	0,01131
cortex i	0,21598	0,00764	0,20851	0,00716	0,24417	0,00168
cortex c	0,19876	0,00583	0,21375	0,00304	0,25691	0,00869

FA Ischemies	moyenne p7	SEM p7	moyenne p14	SEM p14	moyenne p21	SEM p21
Cpu i	0,16264	0,00454	0,16536	0,00453	0,16462	0,00638
Cpu c	0,15584	0,00863	0,16045	0,00561	0,15225	0,00564
Th i	0,22497	0,00794	0,22990	0,01080	0,26120	0,01452
Th c	0,21995	0,00810	0,24239	0,01722	0,26198	0,01267
inj i	0,22549	0,00872	0,21500	0,00969	0,24787	0,01030
inj c	0,23453	0,01419	0,21454	0,00826	0,25537	0,00642
cortex i	0,21598	0,00764	0,20907	0,00314	0,23648	0,01117
cortex c	0,19876	0,00583	0,20722	0,00840	0,21400	0,00241

**Fraction d'anisotropie (FA) matière blanche :**

<b>FA Sains</b>	<b>moyenne p7</b>	<b>SEM p7</b>	<b>moyenne p14</b>	<b>SEM p14</b>	<b>moyenne p21</b>	<b>SEM p21</b>
<b>ic i</b>	0,34725	0,01485	0,42810	0,00239	0,45708	0,01655
<b>ic c</b>	0,32346	0,01962	0,43416	0,02054	0,45863	0,01126
<b>cc + ec</b>	0,45497	0,02970	0,47300	0,02555	0,50031	0,02290
<b>cc + ec</b>	0,48574	0,03261	0,48049	0,02498	0,52790	0,02826

<b>FA Shams</b>	<b>moyenne p7</b>	<b>SEM p7</b>	<b>moyenne p14</b>	<b>SEM p14</b>	<b>moyenne p21</b>	<b>SEM p21</b>
<b>ic i</b>	0,34725	0,01485	0,43034	0,01792	0,53217	0,02645
<b>ic c</b>	0,32346	0,01962	0,43777	0,01335	0,51440	0,02357
<b>cc + ec</b>	0,45497	0,02970	0,48395	0,01732	0,53066	0,03565
<b>cc + ec</b>	0,48574	0,03261	0,51810	0,01436	0,52970	0,01997

<b>FA Ischemies</b>	<b>moyenne p7</b>	<b>SEM p7</b>	<b>moyenne p14</b>	<b>SEM p14</b>	<b>moyenne p21</b>	<b>SEM p21</b>
<b>ic i</b>	0,34725	0,01485	0,36391	0,02081	0,38686	0,01122
<b>ic c</b>	0,32346	0,01962	0,37804	0,02968	0,39217	0,01023
<b>cc + ec</b>	0,45497	0,02970	0,44300	0,01097	0,43604	0,01312
<b>cc + ec</b>	0,48574	0,03261	0,46384	0,01407	0,46176	0,01204

**Trace, valeurs moyennes exprimées en mm<sup>2</sup>/s matière grise :**

<b>Trace Sains</b>	<b>moyenne p7</b>	<b>SEM p7</b>	<b>moyenne p14</b>	<b>SEM p14</b>	<b>moyenne p21</b>	<b>SEM p21</b>
<b>Cpu i</b>	3,13E-03	0,156E-03	2,67E-03	0,167E-03	2,54E-03	0,0610E-03
<b>Cpu c</b>	3,16E-03	0,152E-03	2,59E-03	0,120E-03	2,61E-03	0,0655E-03
<b>Th i</b>	3,21E-03	0,178E-03	2,87E-03	0,182E-03	2,57E-03	0,0569E-03
<b>Th c</b>	3,26E-03	0,168E-03	2,80E-03	0,158E-03	2,59E-03	0,0567E-03
<b>inj i</b>	3,07E-03	0,136E-03	2,82E-03	0,204E-03	2,57E-03	0,0662E-03
<b>inj c</b>	3,12E-03	0,145E-03	2,69E-03	0,166E-03	2,54E-03	0,0652E-03
<b>cortex i</b>	3,09E-03	0,159E-03	2,66E-03	0,169E-03	2,52E-03	0,0781E-03
<b>cortex c</b>	3,21E-03	0,138E-03	2,61E-03	0,159E-03	2,53E-03	0,0570E-03

<b>Trace Shams</b>	<b>moyenne p7</b>	<b>SEM p7</b>	<b>moyenne p14</b>	<b>SEM p14</b>	<b>moyenne p21</b>	<b>SEM p21</b>
<b>Cpu i</b>	3,13E-03	0,156E-03	2,69E-03	0,0209E-03	2,36E-03	0,0230E-03
<b>Cpu c</b>	3,16E-03	0,152E-03	2,64E-03	0,0324E-03	2,45E-03	0,0614E-03
<b>Th i</b>	3,21E-03	0,178E-03	2,82E-03	0,0696E-03	2,49E-03	0,0588E-03
<b>Th c</b>	3,26E-03	0,168E-03	2,83E-03	0,0513E-03	2,46E-03	0,0559E-03
<b>inj i</b>	3,07E-03	0,136E-03	2,78E-03	0,0838E-03	2,43E-03	0,0582E-03
<b>inj c</b>	3,12E-03	0,145E-03	2,77E-03	0,0465E-03	2,43E-03	0,0876E-03
<b>cortex i</b>	3,09E-03	0,159E-03	2,69E-03	0,0717E-03	2,39E-03	0,0541E-03
<b>cortex c</b>	3,21E-03	0,138E-03	2,74E-03	0,0318E-03	2,38E-03	0,0540E-03

<b>Trace Ischemies</b>	<b>moyenne p7</b>	<b>SEM p7</b>	<b>moyenne p14</b>	<b>SEM p14</b>	<b>moyenne p21</b>	<b>SEM p21</b>
<b>Cpu i</b>	3,13E-03	0,156E-03	2,36E-03	0,0541E-03	2,53E-03	0,0519E-03
<b>Cpu c</b>	3,16E-03	0,152E-03	2,37E-03	0,0780E-03	2,56E-03	0,0478E-03
<b>Th i</b>	3,21E-03	0,178E-03	2,43E-03	0,0597E-03	2,65E-03	0,0592E-03
<b>Th c</b>	3,26E-03	0,168E-03	2,43E-03	0,0382E-03	2,65E-03	0,0498E-03
<b>inj i</b>	3,07E-03	0,136E-03	2,36E-03	0,0630E-03	2,59E-03	0,0489E-03
<b>inj c</b>	3,12E-03	0,145E-03	2,39E-03	0,0603E-03	2,58E-03	0,0446E-03
<b>cortex i</b>	3,09E-03	0,159E-03	2,34E-03	0,0557E-03	2,76E-03	0,179E-03
<b>cortex c</b>	3,21E-03	0,138E-03	2,29E-03	0,0525E-03	2,50E-03	0,0,09E-03

**Trace, valeurs moyennes exprimées en mm<sup>2</sup>/s matière blanche :**

<b>Trace Sains</b>	<b>moyenne p7</b>	<b>SEM p7</b>	<b>moyenne p14</b>	<b>SEM p14</b>	<b>moyenne p21</b>	<b>SEM p21</b>
<b>ec i</b>	3,57E-03	0,161E-03	2,71E-03	0,174E-03	2,53E-03	0,0441E-03
<b>ec c</b>	3,57E-03	0,169E-03	2,68E-03	0,169E-03	2,57E-03	0,0757E-03
<b>cc + ec</b>	3,24E-03	0,171E-03	2,90E-03	0,175E-03	2,73E-03	0,0220E-03
<b>cc + ec</b>	3,21E-03	0,152E-03	2,88E-03	0,190E-03	2,66E-03	0,0550E-03

<b>Trace Shams</b>	<b>moyenne p7</b>	<b>SEM p7</b>	<b>moyenne p14</b>	<b>SEM p14</b>	<b>moyenne p21</b>	<b>SEM p21</b>
<b>ec i</b>	3,57E-03	0,161E-03	2,91E-03	0,0821E-03	2,57E-03	7,59E-03
<b>ec c</b>	3,57E-03	0,169E-03	2,77E-03	0,107E-03	2,60E-03	5,66E-03
<b>cc + ec</b>	3,24E-03	0,171E-03	2,80E-03	0,0828E-03	2,81E-03	1,18E-03
<b>cc + ec</b>	3,21E-03	0,152E-03	2,83E-03	0,0996E-03	2,71E-03	1,72E-03

<b>Trace Ischemies</b>	<b>moyenne p7</b>	<b>SEM p7</b>	<b>moyenne p14</b>	<b>SEM p14</b>	<b>moyenne p21</b>	<b>SEM p21</b>
<b>ic i</b>	3,57E-03	0,161E-03	2,42E-03	0,0630E-03	2,76E-03	0,0682E-03
<b>ic c</b>	3,57E-03	0,169E-03	2,42E-03	0,0646E-03	2,61E-03	0,0354E-03
<b>cc + ec</b>	3,24E-03	0,171E-03	2,52E-03	0,0703E-03	2,64E-03	0,0857E-03
<b>cc + ec</b>	3,21E-03	0,152E-03	2,44E-03	0,0632E-03	2,77E-03	0,0974E-03

Valeur propre ( $\lambda$ ) principale, valeurs moyennes exprimées en  $\text{mm}^2/\text{s}$  matière grise :

$\lambda$ principale Sains	moyenne p7	SEM p7	moyenne p14	SEM p14	moyenne p21	SEM p21
Cpu i	1,22E-03	0,0586E-05	1,03E-03	0,0753E-03	0,979E-03	0,0206E-03
Cpu c	1,22E-03	0,0607E-05	0,996E-03	0,0538E-03	0,975E-03	0,0287E-03
Th i	1,32E-03	0,0744E-05	1,18E-03	0,0893E-03	1,04E-03	0,0305E-03
Th c	1,34E-03	0,0627E-05	1,15E-03	0,0759E-03	1,04E-03	0,0257E-03
inj i	1,25E-03	0,0552E-05	1,15E-03	0,0904E-03	1,02E-03	0,0220E-03
inj c	1,28E-03	0,0543E-05	1,07E-03	0,0666E-03	1,01E-03	0,0193E-03
cortex i	1,28E-03	0,0556E-05	1,06E-03	0,0623E-03	0,962E-03	0,0212E-03
cortex c	1,29E-03	0,0536E-05	1,04E-03	0,0680E-03	1,01E-03	0,0322E-03

$\lambda$ principale Shams	moyenne p7	SEM p7	moyenne p14	SEM p14	moyenne p21	SEM p21
Cpu i	1,22E-03	0,0586E-03	1,06E-03	0,0164E-03	0,961E-03	0,0168E-03
Cpu c	1,22E-03	0,0607E-03	1,04E-03	0,0137E-03	1,01E-03	0,0191E-03
Th i	1,32E-03	0,0744E-03	1,15E-03	0,0176E-03	1,10E-03	0,0385E-03
Th c	1,34E-03	0,0627E-03	1,14E-03	0,0146E-03	1,09E-03	0,0300E-03
inj i	1,25E-03	0,0552E-03	1,17E-03	0,0371E-03	1,06E-03	0,0278E-03
inj c	1,28E-03	0,0543E-03	1,15E-03	0,0260E-03	1,08E-03	0,0316E-03
cortex i	1,28E-03	0,0556E-03	1,10E-03	0,0226E-03	0,999E-03	0,0207E-03
cortex c	1,29E-03	0,0536E-03	1,12E-03	0,0132E-03	1,01E-03	0,0292E-03

$\lambda$ principale Ischemies	moyenne p7	SEM p7	moyenne p14	SEM p14	moyenne p21	SEM p21
Cpu i	1,22E-03	0,0586E-03	0,898E-03	0,0084E-03	0,923E-03	0,0102E-03
Cpu c	1,22E-03	0,0607E-03	0,914E-03	0,0218E-03	0,926E-03	0,0252E-03
Th i	1,32E-03	0,0744E-03	1,01E-03	0,0330E-03	1,04E-03	0,0252E-03
Th c	1,34E-03	0,0627E-03	1,02E-03	0,0342E-03	1,05E-03	0,0166E-03
inj i	1,25E-03	0,0552E-03	0,958E-03	0,0235E-03	1,02E-03	0,0147E-03
inj c	1,28E-03	0,0543E-03	0,974E-03	0,0299E-03	1,02E-03	0,0209E-03
cortex i	1,28E-03	0,0556E-03	0,965E-03	0,0307E-03	1,06E-03	0,0547E-03
cortex c	1,29E-03	0,0536E-03	0,931E-03	0,0204E-03	0,967E-03	0,0188E-03

Valeur propre ( $\lambda$ ) principale, valeurs moyennes exprimées en  $\text{mm}^2/\text{s}$  matière blanche :

$\lambda$ principale Sains	moyenne p7	SEM p7	moyenne p14	SEM p14	moyenne p21	SEM p21
ic i	1,66E-03	0,0632E-03	1,35E-03	0,0926E-03	1,29E-03	0,0277E-03
ic c	1,60E-03	0,0727E-03	1,34E-03	0,0673E-03	1,28E-03	0,0359E-03
cc + ec	1,64E-03	0,128E-03	1,49E-03	0,0628E-03	1,40E-03	0,0297E-03
cc + ec	1,68E-03	0,143E-03	1,49E-03	0,0767E-03	1,42E-03	0,0468E-03

$\lambda$ principale Shams	moyenne p7	SEM p7	moyenne p14	SEM p14	moyenne p21	SEM p21
ic i	1,66E-03	0,0632E-03	1,47E-03	0,0373E-03	1,44E-03	0,0381E-03
ic c	1,60E-03	0,0727E-03	1,41E-03	0,0434E-03	1,42E-03	0,0450E-03
cc + ec	1,64E-03	0,128E-03	1,46E-03	0,0456E-03	1,55E-03	0,0378E-03
cc + ec	1,68E-03	0,143E-03	1,53E-03	0,0504E-03	1,50E-03	0,0710E-03

$\lambda$ principale Ischemies	moyenne p7	SEM p7	moyenne p14	SEM p14	moyenne p21	SEM p21
ic i	1,66E-03	0,0632E-03	1,22E-03	0,0299E-03	1,26E-03	0,0329E-03
ic c	1,60E-03	0,0727E-03	1,17E-03	0,0475E-03	1,15E-03	0,0279E-03
cc + ec	1,64E-03	0,128E-03	1,27E-03	0,0374E-03	1,27E-03	0,0390E-03
cc + ec	1,68E-03	0,143E-03	1,28E-03	0,0434E-03	1,35E-03	0,0441E-03

Valeur propre ( $\lambda$ ) radiale, valeurs moyennes exprimées en mm<sup>2</sup>/s matière grise :

$\lambda$ radiale Sains	moyenne p7	SEM p7	moyenne p14	SEM p14	moyenne p21	SEM p21
Cpu i	9,77E-04	0,470E-04	8,05E-04	0,526E-04	7,40E-04	0,106E-04
Cpu c	9,79E-04	0,460E-04	7,85E-04	0,411E-04	7,37E-04	0,152E-04
Th i	9,67E-04	0,521E-04	8,19E-04	0,605E-04	7,08E-04	0,151E-04
Th c	9,89E-04	0,536E-04	7,98E-04	0,558E-04	6,96E-04	0,161E-04
inj i	9,30E-04	0,426E-04	8,19E-04	0,658E-04	7,12E-04	0,249E-04
inj c	9,39E-04	0,447E-04	7,91E-04	0,608E-04	7,13E-04	0,252E-04
cortex i	9,43E-04	0,413E-04	7,89E-04	0,576E-04	7,06E-04	0,207E-04
cortex c	9,71E-04	0,420E-04	7,65E-04	0,563E-04	7,07E-04	0,237E-04

$\lambda$ radiale Shams	moyenne p7	SEM p7	moyenne p14	SEM p14	moyenne p21	SEM p21
Cpu i	9,77E-04	0,470E-04	8,14E-04	0,0786E-04	7,01E-04	0,0722E-04
Cpu c	9,79E-04	0,460E-04	7,97E-04	0,120E-04	7,16E-04	0,235E-04
Th i	9,67E-04	0,521E-04	8,33E-04	0,267E-04	6,94E-04	0,140E-04
Th c	9,89E-04	0,536E-04	8,43E-04	0,214E-04	6,86E-04	0,184E-04
inj i	9,30E-04	0,426E-04	8,07E-04	0,236E-04	6,84E-04	0,190E-04
inj c	9,39E-04	0,447E-04	8,12E-04	0,107E-04	6,74E-04	0,280E-04
cortex i	9,43E-04	0,413E-04	7,97E-04	0,247E-04	6,97E-04	0,167E-04
cortex c	9,71E-04	0,420E-04	8,09E-04	0,0969E-04	6,85E-04	0,130E-04

$\lambda$ radiale Ischemies	moyenne p7	SEM p7	moyenne p14	SEM p14	moyenne p21	SEM p21
Cpu i	9,77E-04	0,470E-04	7,14E-04	0,121E-04	7,10E-04	0,196E-04
Cpu c	9,79E-04	0,460E-04	7,16E-04	0,168E-04	7,26E-04	0,180E-04
Th i	9,67E-04	0,521E-04	7,21E-04	0,215E-04	6,88E-04	0,268E-04
Th c	9,89E-04	0,536E-04	7,15E-04	0,108E-04	6,95E-04	0,258E-04
inj i	9,30E-04	0,426E-04	6,93E-04	0,158E-04	7,02E-04	0,187E-04
inj c	9,39E-04	0,447E-04	7,07E-04	0,130E-04	6,94E-04	0,162E-04
cortex i	9,43E-04	0,413E-04	7,08E-04	0,222E-04	7,33E-04	0,410E-04
cortex c	9,71E-04	0,420E-04	6,75E-04	0,128E-04	6,82E-04	0,154E-04

**Valeur propre ( $\lambda$ ) radiale, valeurs moyennes exprimées en  $\text{mm}^2/\text{s}$  matière blanche :**

$\lambda$ radiale Sains	moyenne p7	SEM p7	moyenne p14	SEM p14	moyenne p21	SEM p21
ic i	9,80E-04	0,537E-04	6,66E-04	0,471E-04	5,79E-04	0,0934E-04
ic c	9,95E-04	0,506E-04	6,56E-04	0,583E-04	6,05E-04	0,122E-04
cc + ec	8,83E-04	0,647E-04	6,89E-04	0,655E-04	5,96E-04	0,202E-04
cc + ec	8,06E-04	0,358E-04	6,79E-04	0,660E-04	5,74E-04	0,288E-04

$\lambda$ radiale Shams	moyenne p7	SEM p7	moyenne p14	SEM p14	moyenne p21	SEM p21
ic i	9,80E-04	0,537E-04	7,20E-04	0,279E-04	5,66E-04	0,315E-04
ic c	9,95E-04	0,506E-04	6,80E-04	0,330E-04	5,86E-04	0,230E-04
cc + ec i	8,83E-04	0,647E-04	6,69E-04	0,257E-04	6,30E-04	0,461E-04
cc + ec c	8,06E-04	0,358E-04	6,47E-04	0,280E-04	6,09E-04	0,508E-04

$\lambda$ radiale Ischemies	moyenne p7	SEM p7	moyenne p14	SEM p14	moyenne p21	SEM p21
ic i	9,80E-04	0,537E-04	5,84E-04	0,185E-04	6,49E-04	0,221E-04
ic c	9,95E-04	0,506E-04	6,20E-04	0,202E-04	6,09E-04	0,181E-04
cc + ec i	8,83E-04	0,647E-04	6,28E-04	0,190E-04	6,27E-04	0,232E-04
cc + ec c	8,06E-04	0,358E-04	6,09E-04	0,210E-04	6,17E-04	0,207E-04