



UNIVERSITE PARIS SUD XI

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

LABORATOIRE: Unité d'Imagerie RMN et de Spectroscopie, NeuroSpin, CEA

DISCIPLINE: Physique

THESE DE DOCTORAT

Soutenue le 2 octobre 2013

par

Ileana O. JELESCU

**Microscopie par résonance magnétique des neurones
d'aplysie: étude du transport actif en présence de
neurotransmetteurs, et de la réponse au stress.**

RESUME FRANÇAIS

Composition du jury:

Directeur de thèse : Denis LE BIHAN

Directeur, NeuroSpin, CEA

Encadrante : Luisa CIOBANU

Chercheur, NeuroSpin, CEA

Président du jury : Jean-Christophe GINEFRI

MCF, Univ. Paris-Sud

Rapporteurs : Paul GLOVER

Prof., Univ. of Nottingham

Markus WEIGER

Chercheur, ETH Zürich

Examineurs : Romuald NARGEOT

MCF, Univ. Bordeaux 2

Introduction générale

Les progrès récents dans le domaine des sciences de la vie ont bouleversé notre compréhension de la physiologie et de la pathologie, et en fin de compte ont eu un immense impact sur notre qualité de vie. Cependant, les nouvelles découvertes soulèvent généralement encore plus de questions. Ceci est particulièrement vrai pour les systèmes biologiques. Une manière assez naturelle pour tenter de comprendre l'incompris est de changer d'échelle d'observation : passer d'une résolution millimétrique à une résolution microscopique par exemple. C'est aussi l'approche adoptée dans ce travail de thèse.

Bien que l'arrivée de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) au niveau clinique ait transformé de nombreux domaines tels que la radiologie, la recherche médicale ou les neurosciences, il demeure des questions sans réponse. Par exemple, il est connu que l'ischémie cérébrale entraîne un fort ralentissement de la diffusion de l'eau dans le cerveau. Pourquoi ? Personne ne le sait exactement, et pourtant l'IRM de diffusion fait partie du protocole de routine dans les hôpitaux pour le diagnostic de l'ischémie aigüe. Autre exemple : l'ion manganèse (Mn^{2+}), utilisé comme agent de contraste IRM dans les études pré-cliniques (i.e. sur des animaux), est connu pour être transporté le long des réseaux neuronaux à travers plusieurs régions activées du cerveau. Cependant, les mécanismes précis de transport, synaptiques ou non-spécifiques, n'ont pas encore été clairement élucidés.

Le principal inconvénient de l'IRM est la sensibilité limitée, qui se traduit dans le cas de cette technologie par une résolution spatiale relativement faible. Or les questions susmentionnées pourraient justement trouver une réponse via une résolution cellulaire, et donc via la microscopie IRM. Cette technique consiste à acquérir des images par résonance magnétique sur des échantillons petits, mais avec une résolution spatiale bien supérieure à celle utilisée habituellement en IRM, par exemple 20 μm vs 1 mm. Cependant, vu les dimensions du système nerveux humain, avec ses corps cellulaires de 4 μm et centaines de trillions de synapses, il est plus judicieux pour l'heure de se pencher sur celui d'*Aplysia californica*, dont les corps cellulaires font plusieurs centaines de microns et qui compte 20 000 neurones en tout.

L'objectif principal de cette thèse est donc d'utiliser les techniques de microscopie par résonance magnétique (MRM) pour étudier des aspects fondamentaux du système nerveux au niveau de neurones individuels et leurs réseaux. La force du projet vient de l'utilisation des divers mécanismes de contraste IRM pour l'étude de réseaux neuronaux quasi entièrement déterminés. Deux approches sont suivies, qui

correspondent aux deux questionnements soulevés précédemment. D'une part, l'étude du transport du Mn^{2+} dans un réseau neuronal, suivi par IRM rehaussée au manganèse, et du potentiel de cet ion comme traceur de projections axonales et de communication modulée par des neurotransmetteurs. D'autre part, les changements en termes de diffusion induits par un stress cellulaire similaire à celui induit par l'ischémie (dépolérisation de la membrane et gonflement cellulaire), suivis par IRM de diffusion à deux échelles structurelles : au niveau du tissu nerveux global et à l'intérieur des corps cellulaires.

La réalisation de ces expériences biologiques nécessite un certain nombre de développements hardware et méthodologiques. Il s'agit en particulier de la conception et construction de micro-antennes radiofréquences (RF) dédiées, et du développement et implémentation de séquences IRM adaptées, principalement pour les mesures de diffusion.

Ce travail de thèse est organisé en neuf chapitres. Le premier chapitre consiste en une introduction des principes fondateurs de l'IRM et une présentation des concepts utiles à la compréhension de ce travail. Au chapitre 2 sont présentés les défis associés à la MRM, ainsi que les développements et accomplissements récents. Le chapitre 3 porte sur ce que l'auteur a appelé « matériaux » : une description du modèle animal et du hardware utilisé pour les expériences. Le quatrième chapitre est dédié à l'IRM rehaussée au manganèse (ou MEMRI pour Manganese Enhanced MRI). Notre étude par IRM rehaussée au manganèse est entièrement contenue dans le chapitre 5. Les quatre derniers chapitres sont dédiés à l'IRM de diffusion. Le chapitre 6 sert d'introduction à l'IRM de diffusion. Le chapitre 7 s'attèle à la mise en œuvre de la séquence DESIRE, qui pourrait générer un contraste de diffusion unique en MRM. Le chapitre 8 porte sur l'implémentation d'une séquence de diffusion plus « traditionnelle » (Diffusion-Prepared Fast Imaging with Steady-state free Precession, ou DP-FISP) adaptée à la microscopie. Enfin, le chapitre 9 utilise ladite DP-FISP pour étudier le lien entre gonflement cellulaire et coefficient de diffusion au niveau cellulaire et tissulaire. Ce résumé en français omet la majeure partie des chapitres 1, 4 et 6, ainsi que la conclusion générale.

1. IRM

Le développement de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) s'est effectué en deux étapes : d'abord la découverte du phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN) par Bloch et Purcell en 1946, et ensuite l'utilisation de gradients de champ magnétique pour encoder l'espace et produire une image RMN par Lauterbur

puis Mansfield. La littérature spécialisée offre plusieurs références essentielles en IRM : (Haacke et al., 1999; Nishimura, 1996).

Cette thèse est consacrée à l'IRM du noyau d'hydrogène, ou proton. Ce dernier est très abondant dans les tissus biologiques, majoritairement constitués d'eau. Les principales séquences « de base » utilisées dans ce travail sont les suivantes :

- FLASH (Fast Low Angle SHot): Il s'agit d'une séquence écho de gradient caractérisée par un régime établi de l'aimantation longitudinale et une destruction de l'aimantation transverse avant chaque nouvelle excitation (Frahm et al., 1986). FLASH est une séquence rapide, produisant des images généralement pondérées T_1 pour un temps d'écho (TE) court, et T_2^* pour un TE long.
- RARE (Rapid Acquisition with Refocused Echoes): Il s'agit d'une séquence écho de spin accélérée où, suite au pulse d'excitation 90° , un train de pulses de refocalisation 180° espacés de TE est joué pour acquérir plusieurs lignes du k-space en un seul TR. RARE est impropre à la quantification T_2 , mais produit des images pondérées T_2 en un temps très court (Hennig et al., 1986).
- SSFP (Steady-State Free Precession) et FISP (Fast Imaging with SSFP) : Les séquences SSFP génèrent un contraste complexe. A la fois l'aimantation longitudinale et transverse atteignent un régime établi non-nul avant chaque nouvelle excitation (Carr, 1958). FISP-FID est un des trois types d'acquisition basés sur la SSFP, où le signal échantillonné est refocalisé pré-excitation. C'est une séquence rapide avec un contraste pondéré T_2/T_1 .

Les acquisitions réalisées dans le cadre des expériences des chapitres 5, 8 et 9 sont dites « 3D » : l'ensemble du volume sensible de l'antenne est excité par un pulse non sélectif et un k-space en 3D est acquis (une direction d'encodage de fréquence et deux directions d'encodage de phase) avant transformée de Fourier (TF). Les avantages principaux de l'acquisition 3D sont un SNR (rapport signal-sur-bruit) élevé et l'accès à une haute résolution spatiale isotrope. Cependant, les possibilités de l'excitation sélective sont mises à profit dans le chapitre 7. Tout comme l'imagerie, celle-ci est fondée sur l'introduction de gradients de champ magnétique pendant l'excitation RF, afin que seuls soient affectés les spins ayant une fréquence de résonance comprise dans la bande de fréquences du pulse. Pour une excitation sélective en 2D, l'énergie déposée par le pulse RF dans un plan du k-space doit correspondre à la TF de la forme d'excitation 2D souhaitée (Pauly et al., 1989).

2. Microscopie par Résonance Magnétique

L'idée de la MRM est d'utiliser les atouts de l'IRM (préservation des tissus et diversité des contrastes) pour imager de petits échantillons biologiques à haute résolution. Il existe d'excellents ouvrages et revues dans le domaine (Callaghan, 1993; Glover and Mansfield, 2002).

La frontière d'échelle entre l'IRM et la MRM n'est pas franche mais généralement la MRM est associée à une taille de voxel inférieure à $(100 \mu\text{m})^3$, soit 1 nL. Or il y a mille fois moins de protons (et donc de signal) dans $(100 \mu\text{m})^3$ que dans un voxel de 1 mm^3 , le standard de l'IRM clinique. Le grand défi est donc de booster le signal reçu par d'autres moyens afin de conserver un SNR suffisant (> 5) tout en atteignant une haute résolution spatiale.

La résolution spatiale en IRM est une fonction de l'aire de gradients accumulée. Cependant la relaxation T_2 et le déphasage dû à la diffusion en présence de gradients impose une limite au temps d'encodage et d'acquisition. La meilleure solution demeure donc l'utilisation de gradients puissants (jusqu'à 10 T/m sur quelques millimètres). Leurs inconvénients principaux pour la microscopie sont l'induction de courants de Foucault importants et de vibrations mécaniques.

Une fois que la haute résolution spatiale devient possible, il faut examiner les dépendances du SNR afin d'améliorer celui-ci. En termes de paramètres d'acquisition, celui-ci s'écrit :

$$SNR \propto \Delta x \Delta y \Delta z \sqrt{NA \cdot N_{PE} \cdot T_{RO}} f(\rho, T_1, T_2)^1$$

Le moyennage reste un moyen assez inefficace d'augmenter le SNR. L'avantage des acquisitions 3D versus 2D est clair, car N_{PE} devient $N_{PE} \cdot N_{PE2}$. Le temps de lecture prolongé permet l'utilisation d'une bande passante réduite qui introduit moins de bruit. Cet effet est cependant en compétition avec les pertes de signal via T_2 et la diffusion.

Le SNR dépend des paramètres physiques via :

¹ Δ_i : taille du voxel dans la dimension i ; NA : nombre de moyennes ; N_{PE} : nombre d'encodages de phase ; T_{RO} : durée du gradient de lecture ; $f(\rho, T_1, T_2)$ indique une dépendance des timings de séquence et du tissu.

$$SNR \propto \frac{B_0^2 B_{xy}}{\sqrt{aB_0^{1/2} + bB_0^x + cB_0^2}}$$

où B_{xy} est l'intensité du champ RF produit au centre de la bobine, a, b et c sont les poids relatifs du bruit thermique dans la bobine, dans le condensateur et dans l'échantillon, respectivement. La puissance x dépend du modèle de condensateur mais peut être supérieure à 1. Dans l'optique de maximisation du SNR il faut donc :

- Travailler à très haut champ magnétique (jusqu'à 17.2 T pour les systèmes horizontaux et 21 T pour les aimants verticaux). Les principaux inconvénients associés au haut champ sont un temps d'acquisition long (via un T_1 et donc un TR plus longs), un T_2^* plus court (à cause des inhomogénéités accentuées par les effets de susceptibilité magnétique) et l'utilisation de hautes fréquences pour l'émission-réception.
- Minimiser les pertes. Le solénoïde est la solution qui minimise le bruit thermique tout en assurant une excitation homogène (Hoult and Richards, 1976). Idéalement le bruit doit être dominé par le bruit de la bobine ($SNR \propto B_0^{7/4}$) mais en pratique les pertes dans le condensateur et l'échantillon sont non négligeables à très haute fréquence même pour des échantillons de petite taille.
- Maximiser le signal. Le facteur de remplissage doit être élevé (90% du volume de l'antenne) : le diamètre du solénoïde est adapté à celui de l'échantillon et sa longueur vaut au moins 1.5 fois son diamètre pour une excitation/réception homogènes. Un facteur de qualité Q important est également essentiel. Pour des échantillons conducteurs, un fil épais avec un pas valant 1.5 fois l'épaisseur du fil sont recommandés pour le bobinage (Minard and Wind, 2001a, b).

Le design de l'antenne ne doit pas favoriser la circulation de courants de Foucault, notamment dans le plan de masse. L'immersion de la bobine dans un fluide de susceptibilité magnétique proche de celle du cuivre (D_2O ou liquides perfluorés) améliore sensiblement l'homogénéité de B_0 dans l'échantillon.

3. « Matériaux » : grands neurones et petites antennes

Modèle animal

Aplysia californica, ou aplysie, est devenu un modèle très répandu en neurosciences, grâce à la simplicité de son système nerveux. Ce dernier est constitué d'environ 20000 neurones, répartis en cinq paires de ganglions aux fonctions spécifiques. Les ganglions abdominaux ont fusionné en un seul (Figure 1).

Un ganglion est organisé en trois structures : une gaine protectrice, largement perméable aux petites molécules, une région de corps cellulaires sur le pourtour du ganglion, et une région de neuropile (axones, dendrites et prolongements des cellules gliales) au cœur. Cette séparation géographique des corps cellulaires et neuropile est caractéristique des invertébrés et présente un avantage expérimental considérable par rapport au cortex de mammifère (où corps cellulaires et neuropile sont intriqués).

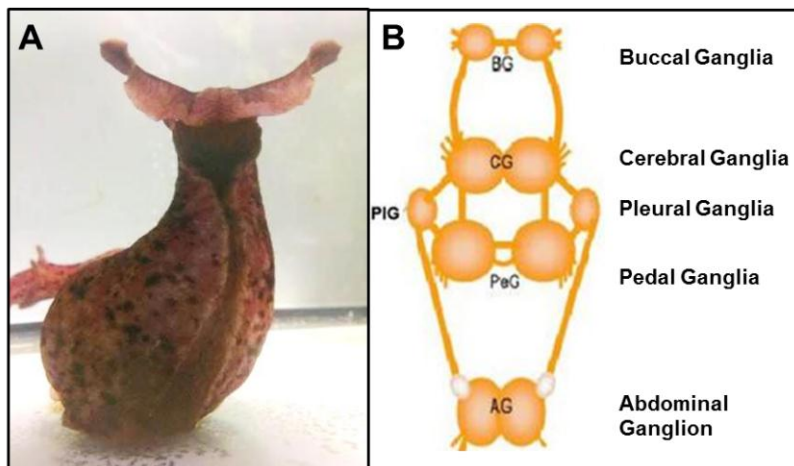


Figure 1. A: Vue ventrale de l'aplysie. Avec l'autorisation de G. Radecki. B: Schéma de la répartition des ganglions dans l'animal, de la tête (haut) à la queue (bas).

Les corps cellulaires sont très gros (jusqu'à 1 mm de diamètre chez l'adulte) et la plupart sont identifiés de façon individuelle. Leurs fonctions, projections axonales et synapses ont été étudiées en détail par des méthodes d'imagerie optique et d'électrophysiologie (Nargeot and Simmers, 2012; Quicke and Brace, 1979). De plus, les neurones d'aplysie se prêtent plus facilement à l'expérimentation, car leur température de fonctionnement se situe entre 4 et 15°C, et ils résistent mieux aux conditions non-idéales (température, choc osmotique...) que les neurones de mammifère.

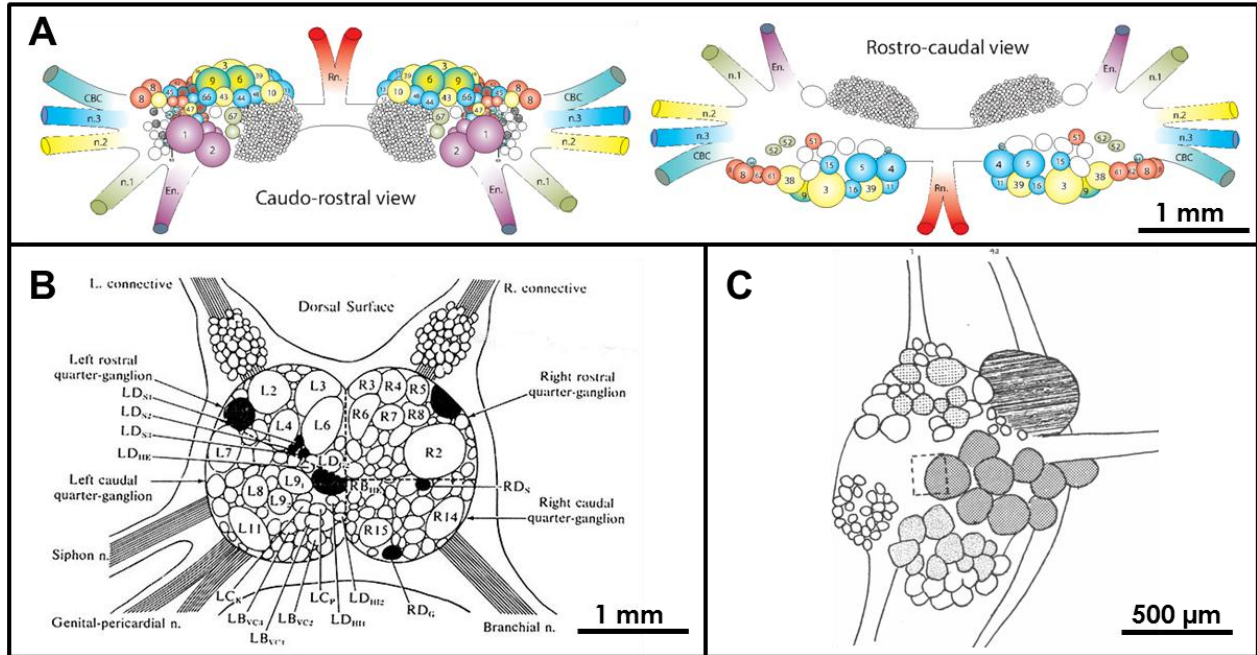


Figure 2. Schémas de trois ganglions. A: Ganglions buccaux. Deux vues (avant et arrière) sont représentées. Le code couleur relie chaque neurone au nerf qui reçoit sa projection axonale. Avec l'autorisation de R. Nargeot. B. Ganglion abdominal, contenant parmi les plus grosses cellules de l'animal: R2, L3 à L7 et L11. Diagramme tiré de (Kupfermann et al., 1974). C: Ganglion pleural gauche. La cellule géante LP11 se trouve dans le coin supérieur droit. Diagramme tiré de (Kehoe, 1972). Les barres d'échelle donnent une indication des tailles de cellules. La taille réelle varie avec l'âge et le poids de l'animal.

Les expériences MEMRI porteront sur les ganglions buccaux de l'aplysie. Pour les expériences de diffusion, ces mêmes ganglions ont été choisis comme modèle de tissu nerveux (la région de corps cellulaires), tandis que les cellules isolées seront extraites des ganglions abdominal et pleural gauche (Figure 2).

Hardware

Toutes les expériences ont été réalisées sur un aimant horizontal de 17.16 Tesla (Bruker BioSpin), qui est pour l'heure le champ magnétique le plus haut jamais atteint sur un aimant horizontal. La fréquence de résonance du proton associée est de 730.2 MHz. L'aimant est équipé de gradients de 1 T/m sur chacun des trois axes, avec une vitesse de montée/descente de 9000 T/(m.s).

Les antennes RF (micro-solénoïdes) ont été réalisées en deux tailles : une pour accueillir les ganglions buccaux, une autre pour les neurones isolés. Les Tableau 1 et Tableau 2 présentent les principales caractéristiques géométriques et fonctionnelles des deux antennes. La Figure 3 montre des illustrations du design des antennes.

Application	Capillaire ID/OD (mm)	d_{bobine} (mm)	l_{bobine} (mm)	Diamètre fil (mm)	# tours n	Pas (mm)
Ganglions	2.0/2.4	2.9	4.5	0.5	5	0.88
Cellule unique	0.5/0.7	0.95	2.5	0.25	5	0.50

Tableau 1. Caractéristiques géométriques des bobines réalisées pour chacune des applications. *ID/OD* : diamètre intérieur/extérieur.

Application	Facteur de qualité	Puissance typique (mW)	Largeur à mi- hauteur dans 1 mm ³ (Hz)	Largeur à mi- hauteur dans un VOI (Hz)
Ganglions	26	230	2.5	6.0
Cellule unique	47	70	6.0	5.0

Tableau 2. Principales caractéristiques fonctionnelles des deux antennes. Les valeurs sont mesurées pour une antenne chargée avec un fantôme d'eau de mer artificielle (ASW). La puissance typique est celle requise pour obtenir un angle de bascule de 90° avec un pulse carré de 1 ms. La largeur du spectre à mi-hauteur est une indication de l'inhomogénéité de B_0 dans l'échantillon due à l'aimant et à l'antenne. Le volume d'intérêt (VOI) est de (2 mm)³ pour l'antenne « ganglions » et de (0.5 mm)³ pour l'antenne « cellule ».

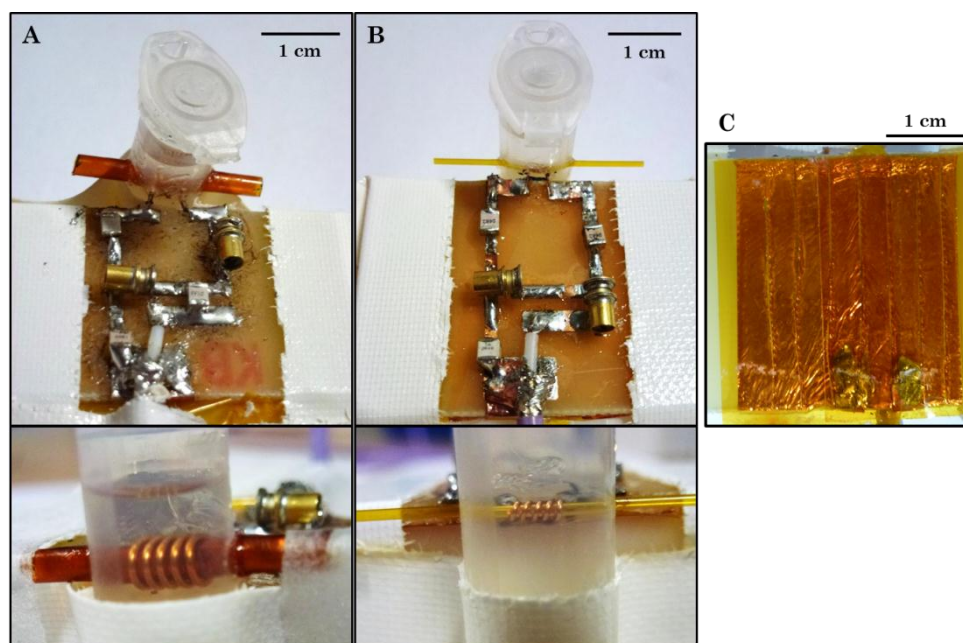


Figure 3. Micro-antennes pour l'imagerie de ganglions (A) et de cellules (B). Les bobines sont contenues dans un tube en plastique (Eppendorf), les pattes ressortent par de petits trous et sont soudées au circuit, composé de 3 condensateurs fixes et 2 variables. Une gaine en polyimide passe à travers la bobine et ressort de chaque côté du tube. Une fois celui-ci rempli de FC-40 (3M), la bobine est immergée dans un milieu de susceptibilité magnétique comparable au cuivre, ce qui améliore considérablement l'homogénéité de B_0 . Des capillaires en verre contenant l'échantillon d'intérêt peuvent être facilement insérés et retirés par la gaine. C. Plan de masse à l'envers du circuit. La feuille de cuivre fait 5 µm d'épaisseur; elle est séparée en de fines bandes (2 mm largeur) parallèles pour empêcher la circulation des courants de Foucault.

4. MEMRI

Bien que l'IRM du proton soit une modalité très flexible et non-invasive, parfois l'ajout d'un agent de contraste est nécessaire pour rehausser le contraste T_1 ou T_2 . Ces agents de contraste sont des composés paramagnétiques (Mn^{2+} , Gd^{3+} ...) ou superparamagnétiques (oxydes de fer...) qui modifient localement l'environnement magnétique des protons et raccourcissent les temps de relaxation T_1 et T_2 de ces derniers (Mendonca-Dias et al., 1983). L'efficacité d'un agent de contraste à modifier le temps de relaxation T_i est quantifiée par sa relaxivité r_i ($i = 1$ ou 2). Pour des concentrations en agent de contraste (AC) jusqu'à 10 mM, la relaxivité s'exprime comme :

$$\frac{1}{T_i} = \frac{1}{T_{i0}} + r_i \cdot [AC]$$

où T_{i0} et T_i sont les temps de relaxation initial et actuel. La relaxivité dépend de conditions expérimentales telles que le milieu, le champ magnétique et la température.

L'action principale des agents de contraste paramagnétiques est de raccourcir T_1 , ce qui se traduit par une hyperintensité de signal (ou rehaussement) sur des images pondérées T_1 . L'IRM rehaussée au manganèse (ou MEMRI en anglais) s'est développée autour de deux propriétés de l'ion Mn^{2+} : son paramagnétisme et sa capacité à pénétrer dans les neurones par des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants (Yamashita, 1982) et à être transporté de manière antérograde et rétrograde dans le neurone. L'ion Ca^{2+} joue par ailleurs un rôle clé dans la transmission du potentiel d'action au niveau des synapses chimiques, d'où également le transport de Mn^{2+} au-delà d'un seul neurone.

La technique MEMRI est confinée aux études pré-cliniques du fait de la toxicité neuronale du $MnCl_2$. Elle est actuellement utilisée dans trois types d'applications (Silva et al., 2004). Premièrement, pour rehausser globalement le contraste dans le cerveau et améliorer la visualisation de la neuroarchitecture. Deuxièmement pour tracer des connections neuronales spécifiques dans le cerveau. Troisièmement, et en lien étroit avec le tracé des connections, pour l'étude de l'accumulation différenciée de Mn^{2+} dans des régions actives/inactives du cerveau ou du cœur. Ces études sont menées principalement sur des rongeurs ou des primates (non humains) à des résolutions spatiales permettant de détecter la présence de Mn^{2+} dans des « régions » du cerveau, et de supposer l'existence d'un transport synaptique de Mn^{2+} . La

motivation pour la MRM rehaussée au manganèse est de détecter l'accumulation et le transport de Mn^{2+} à un niveau cellulaire, de neurone à neurone.

5. Transport du manganèse dans le système nerveux de l'aplysie

L'étude présentée dans ce chapitre a été publiée en tant que : Jelescu IO, Nargeot R, Le Bihan D, Ciobanu L. *Highlighting manganese dynamics in the nervous system of Aplysia californica using MEMRI at ultra-high field*. NeuroImage 2013;76:264-271.

Validation des projections axonales

La cartographie des projections axonales de neurones identifiés dans les nerfs périphériques des ganglions buccaux, obtenue précédemment par migration de Co^{2+} ou Ni^{2+} et imagerie optique (Quicke and Brace, 1979), est également établie par MEMRI. Trois aplysies ont été utilisées pour déterminer les projections axonales dans trois nerfs (n.2, n.3 et E.n.). Après dissection de l'animal et extraction des ganglions buccaux, l'extrémité du nerf concerné est isolée du reste du milieu de survie (ASW) par un puits de vaseline, et ce dernier rempli de $MnCl_2$ (25 mM). Après 18h de migration à 4°C, des images FLASH et RARE (25 μm isotrope) des ganglions sont acquises. Les images FLASH permettent d'identifier les régions où le manganèse est présent (hyperintensité de signal), et les images RARE de visualiser tous les corps cellulaires. La combinaison des deux permet de déterminer dans quels neurones le Mn^{2+} a migré de façon rétrograde à partir du nerf exposé, et donc de retracer l'origine des projections axonales dans ce nerf.

La Figure 4 présente les résultats de migration pour les trois nerfs. Dans chacune des trois expériences, tous les corps cellulaires hyperintenses sur les images pondérées T_1 (FLASH) étaient des neurones moteurs projetant leur axone dans le nerf correspondant. Réciproquement tous les neurones moteurs ipsilatéraux avec une projection axonale connue dans le nerf exposé au $MnCl_2$ étaient hyperintenses sur les images FLASH.

Toxicité de la migration rétrograde

Au vu de la toxicité du manganèse et de l'importance d'étudier des réseaux neuronaux fonctionnellement intacts, l'impact de la migration rétrograde de Mn^{2+} réalisée précédemment sur les neurones ayant accumulé du Mn^{2+} a été évalué.

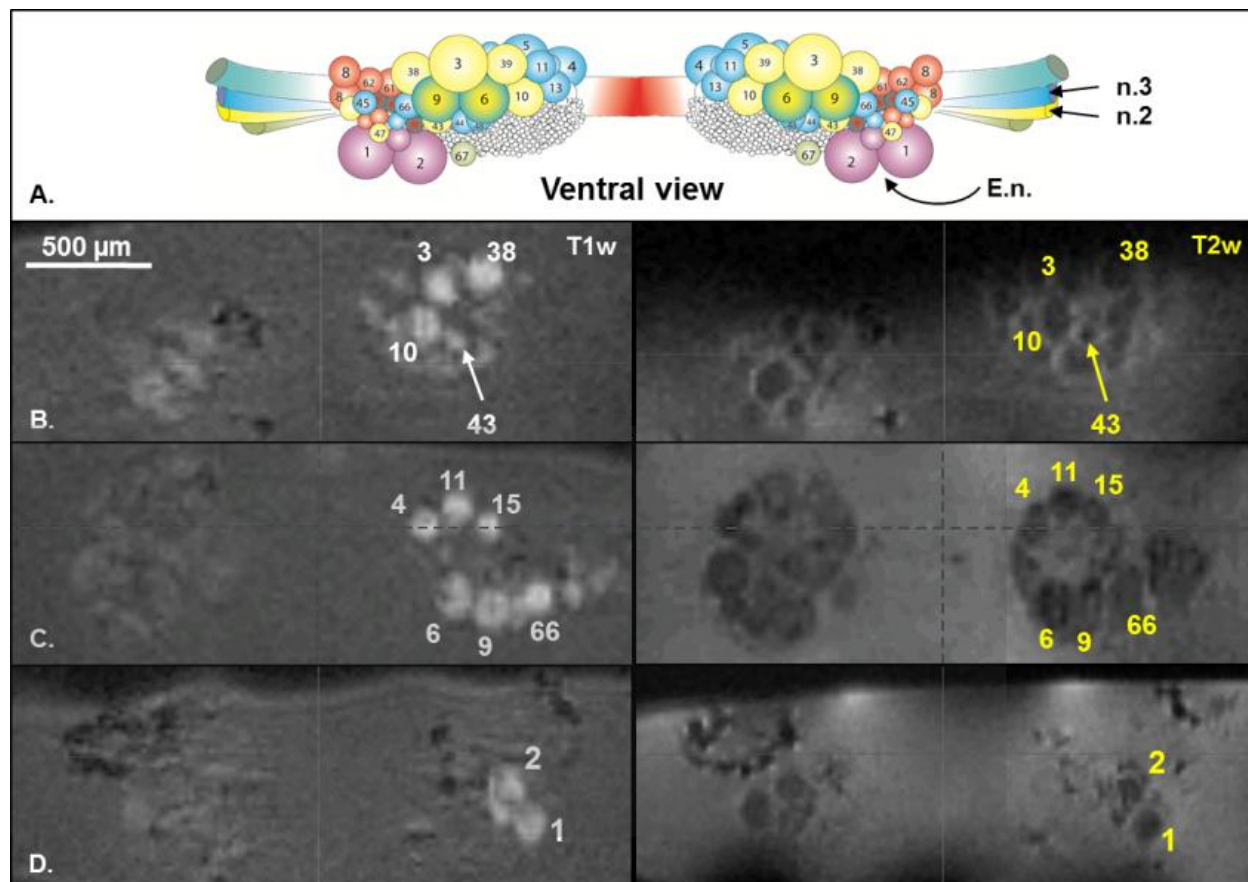


Figure 4. A. Vue ventrale des ganglions buccaux. Les flèches indiquent les nerfs utilisés pour la migration rétrograde de Mn^{2+} . B-D. Images RMN montrant l'accumulation de Mn^{2+} suite au transport rétrograde le long de n.2 (B), n.3 (C) et E.n. (D). Les cellules hyperintenses sont indiquées sur les images FLASH (à gauche) et RARE (à droite), et peuvent être comparées au schéma (A). Il s'agit de neurones avec des projections axonales connues dans le nerf correspondant.

La concentration de Mn^{2+} dans les corps cellulaires suite à la migration rétrograde a été estimée entre 0.12 et 0.25 mM, ce qui est très faible par rapport aux concentrations injectées directement chez d'autres espèces, > 5 mM (Silva and Bock, 2008). Aussi bien les neurones chargés de Mn^{2+} que les nerfs par lesquels la migration s'est effectuée continuent de présenter un pattern d'activité spontanée (mesurée en potentiels d'action par des techniques d'électrophysiologie) comparable au côté controlatéral non-exposé au manganèse. Ces mesures permettent de conclure que le protocole de « backfilling » n'altère pas la fonctionnalité du réseau neuronal et que les concentrations de manganèse sont en-dessous du seuil de toxicité.

Stimulation à la dopamine

Dans cette partie de l'étude, nous avons testé l'hypothèse d'un transport actif de manganèse d'un neurone à l'autre suite à une activation du réseau par le neurotransmetteur dopamine (DA).

Un groupe de neurones défini est chargé de Mn^{2+} par migration rétrograde par le nerf 3, comme indiqué en début de chapitre. Une première session d'imagerie (FLASH et RARE) est réalisée. La paire de ganglions est ensuite perfusée pendant deux heures, soit par une solution ASW + DA 50 μM + acide ascorbique 50 μM (perfusion DA), soit par une solution ASW + acide ascorbique 50 μM (perfusion témoin). S'ensuit une deuxième session d'imagerie identique à la précédente. La distribution d'hyperintensité de signal (et donc de présence de Mn^{2+}) dans le ganglion est comparée avant et après perfusion.

Trois paires de ganglions buccaux ont été exposées à la perfusion DA et trois autres à la perfusion témoin. Les voxels des ganglions sont répartis en trois groupes : faiblement hyperintenses (jusqu'à 120% du signal de l'ASW), moyennement hyperintenses (entre 120% et 180%) et fortement hyperintenses (plus de 180%).

En l'absence de DA (perfusion témoin), les images avant et après perfusion révèlent que les populations des groupes moyennement et fortement hyperintenses ont diminué en faveur du groupe faiblement hyperintense. Ceci est caractéristique d'un wash-out naturel du manganèse dans le temps. En présence de DA, ce sont les populations des groupes faiblement et fortement hyperintenses qui ont diminué en faveur du groupe moyennement hyperintense. Cette dynamique tendrait à révéler un transport actif de Mn^{2+} d'un neurone à l'autre, les neurones fortement concentrés en cédant à ceux qui n'en contenaient initialement pas du tout.

Ces expériences montrent donc un transport inter-neuronal de Mn^{2+} suite à une activation chimique du réseau. Cependant nous n'avons pas identifié précisément de neurone ayant accumulé du Mn^{2+} suite à cette activation, la raison principale étant probablement la faible concentration en jeu. Une telle identification permettrait de lever le doute sur le caractère synaptique ou non-spécifique du transport inter-neuronal de Mn^{2+} , vu que les connexions synaptiques du ganglion buccal sont connues. Une autre piste de travaux futurs est l'étude de l'accumulation différenciée de Mn^{2+} dans des neurones identifiés, suite à l'injection de $MnCl_2$ *in vivo* et à différentes conditions de stimulation de l'aplysie.

6. IRM de diffusion

Les gradients de champ magnétique induisent une atténuation du signal RMN en lien avec l'agitation thermique (ou diffusion) des molécules dans un fluide. La diffusion engendre un déplacement moyen des protons $\sqrt{\langle x^2 \rangle} = \sqrt{2d D t}$ où d est le nombre de dimensions autorisées, D le coefficient de diffusion et t le temps imparti (Einstein, 1905). Du fait de ce déplacement aléatoire, les spins n'accumulent pas un déphasage qui se compense lors de l'application d'une paire de gradients à moment nul, ce qui entraîne une perte d'aimantation macroscopique. L'incorporation de gradients de diffusion en plus des gradients d'imagerie pour produire des cartes *in vivo* du « coefficient de diffusion apparent » (ADC pour apparent diffusion coefficient) dans le cerveau humain sain et pathologique ont marqué le début de l'IRM de diffusion (Le Bihan et al., 1986).

La séquence pondérée en diffusion classique, PGSE pour Pulsed Gradient Spin Echo, consiste en l'ajout de deux gradients de diffusion, d'amplitude G_d et durée δ , de part et d'autre du pulse de refocalisation. La séparation entre les deux gradients se note Δ . La pondération en diffusion introduite est quantifiée par la b -value. Pour des gradients rectangulaires: $b = \gamma^2 G_d^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ où γ est le rapport gyromagnétique. Un calcul précis doit incorporer la contribution des gradients d'imagerie à la pondération en diffusion, bien que ceux-ci soient souvent négligeables (Mattiello et al., 1994).

Dans le cas d'un milieu homogène non restreint, l'atténuation du signal entre une séquence avec (S) et sans (S_0) gradients de diffusion s'exprime comme $S/S_0 = \exp(-bD)$. Cette expression est en effet valable dans le cas où le propagateur (qui donne la probabilité pour une molécule initialement située en \mathbf{r}_0 de se trouver en \mathbf{r} après un temps Δ) est gaussien.

En présence de restrictions et d'inhomogénéités, comme c'est le cas dans le tissu nerveux, le propagateur ne prend généralement pas une forme gaussienne. Cependant, il peut parfois être approximé par une fonction gaussienne, ce qui permet encore d'écrire $S/S_0 = \exp(-b \cdot ADC)$ où le coefficient de diffusion D a été remplacé par un coefficient de diffusion apparent (ADC). L'approximation de phase gaussienne est valable dans le cas où l'ADC est indépendant de l'amplitude des gradients G_d (Yablonskiy and Sukstanskii, 2010).

L'ADC reflète à la fois les différentes viscosités rencontrées dans le tissu et la taille des compartiments au sein desquels les protons peuvent se déplacer « librement » (Le Bihan, 2007). Les conséquences de ces dépendances sont multiples. Tout d'abord,

l'ADC dépend du temps de diffusion, qui s'exprime comme $t_{diff} = \Delta - \delta/3$. Ensuite, la diffusion dans le tissu peut être anisotrope et l'ADC dépendre de l'orientation de sensibilisation à la diffusion choisie via les gradients joués sur chaque axe. Enfin, pour des grandes b-values ($> 2000 \text{ s/mm}^2$), l'approximation de phase gaussienne n'est plus valable et l'atténuation dans le tissu nerveux s'écarte d'une décroissance monoexponentielle (Niendorf et al., 1996).

Plusieurs modèles sont utilisés pour expliquer cet écart, sans qu'aucun ne soit définitivement retenu. Empiriquement, la courbe d'atténuation est bien modélisée par une décroissance biexponentielle. Le modèle le plus populaire implique donc l'existence de deux pools d'eau en échange lent ou intermédiaire, un pool « lent » et un pool « rapide »: $S/S_0 = f \exp(-bD_{lent}) + (1 - f)\exp(-bD_{rapide})$. Cependant, toute tentative d'associer les deux pools d'eau à une réalité biologique est demeurée sans succès. D'autres modèles empiriques (kurtosis, statistique, exponentielle étirée...) ou purement mathématiques ont été étudiés pour tenter de comprendre et quantifier le phénomène (Yablonskiy and Sukstanskii, 2010).

Une des principales applications de l'IRM de diffusion est devenue le diagnostic de l'ischémie cérébrale aiguë. En effet, celle-ci s'accompagne d'une chute rapide de l'ADC dans la zone ischémique (Moseley et al., 1990) et cette décroissance serait une conséquence du gonflement cellulaire. En effet, d'autres conditions pathologiques et physiologiques associées à un gonflement cellulaire (épilepsie, dépression corticale propagée, activation neuronale...) sont aussi accompagnées d'une diminution locale de l'ADC. Cependant le lien de causalité exact entre le gonflement cellulaire et la diminution de l'ADC au niveau du tissu demeure l'objet de recherches actives. Ce débat rejoint sous certains aspects celui sur la compartimentation de l'eau en deux pools et sera au cœur des expériences présentées au chapitre 9.

Aux deux prochains chapitres, nous allons examiner des séquences de diffusion potentiellement adaptées aux contraintes de la microscopie IRM.

7. Evaluation de DESIRE en 2D

L'étude présentée dans ce chapitre a été publiée sous : Jelescu IO, Boulant N, Le Bihan D, Ciobanu L. *Experimental demonstration of diffusion signal enhancement in 2D DESIRE images*. Journal of magnetic resonance 2012 ;218 :44-48.

Les séquences de diffusion conventionnelles sont fondées sur la mesure d'une atténuation de signal due à la diffusion. Par ailleurs, dans le cadre d'un encodage de fréquence, la diffusion pose une limite ultime à la résolution spatiale car la distance

de diffusion pendant la durée de l'encodage devrait être inférieure à la taille du voxel.

DESIRE (Diffusion Enhancement of Signal and REsolution) repose sur le principe suivant : une saturation très localisée est appliquée pendant une durée T . Plus la diffusion à l'endroit de la saturation est rapide, plus il y aura de spins qui seront affectés par la saturation. Suite à cette saturation, le signal global de l'objet d'intérêt est acquis (sans encodage spatial). Le signal « DESIRE » au point \mathbf{r} de l'image est la différence entre le signal sans saturation (référence S_0) et avec saturation au point \mathbf{r} ($S(\mathbf{r})$). En 1D, la saturation est un plan infini très fin, en 2D il s'agit d'un cylindre infini de petit diamètre, et en 3D d'une sphère de petit diamètre. DESIRE est une technique d'imagerie « point par point » : la localisation du voxel et sa taille (la résolution spatiale) sont celles de la saturation directe.

Le rehaussement est ensuite défini comme :

$$E(\vec{r}) = \frac{S_0 - S(\vec{r})}{S_0} \cdot \frac{V}{\varepsilon} - 1$$

où V est le volume d'intérêt dans l'objet et ε le volume de saturation directe (Pennington, 2003).

Dans la perspective d'obtenir un contraste en diffusion dans des neurones uniques d'aplysie, nous avons implémenté DESIRE en 2D et testé le rehaussement obtenu sur des fantômes d'eau et d'huile de silicone.

Le choix du pulse de saturation s'est porté sur le pulse carré, très robuste de par sa simplicité. La présence d'anneaux de saturation supplémentaires (dus à la saturation en forme de sinc) a été partiellement prise en compte par l'estimation d'une taille équivalente de trou, plus large que le trou central (dimension visée : 60 μm , dimension équivalente estimée : 140 μm). Le diagramme de la séquence est présenté à la Figure 5.

Pour un temps total de saturation et donc de diffusion $\Delta T_{\text{diffusion}} = 336$ ms, et une taille de saturation équivalente à 140 μm , les valeurs de rehaussement dans l'eau étaient de 1.01 en moyenne sur l'ensemble du fantôme et de 1.38 au centre, loin des parois de verre du capillaire. La valeur prédite par calcul théorique était de 1.08. Dans l'huile, le rehaussement mesuré était de 0.21 sur l'ensemble du fantôme et de 0.56 au centre, pour une prédiction théorique de 0.24.

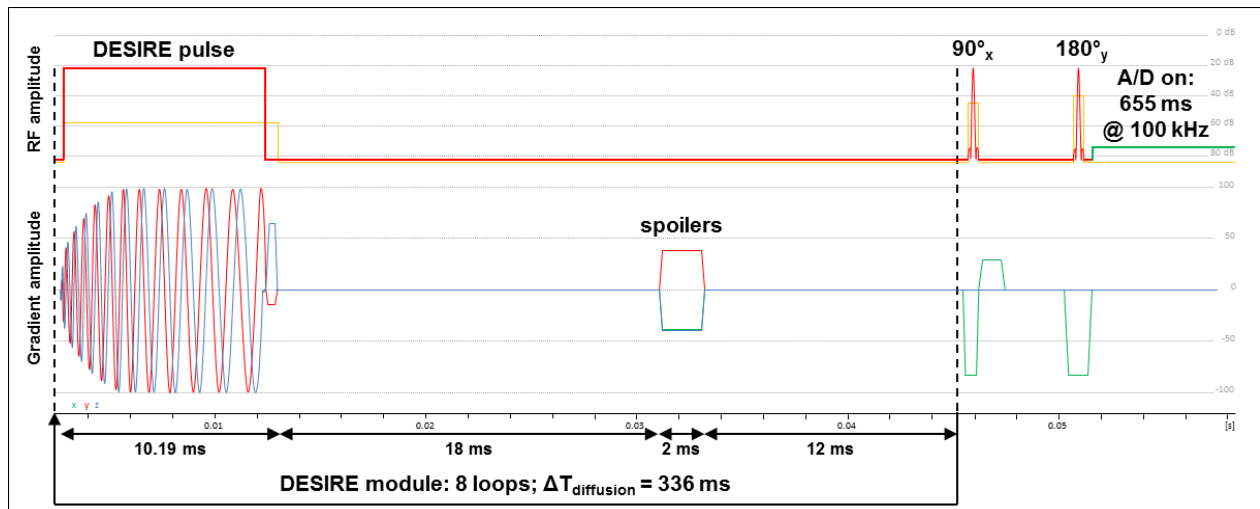


Figure 5. Diagramme de la séquence DESIRE 2D implémentée. Elle est répétée pour chaque pixel de l'image (i.e. chaque position de trou de saturation), avec un TR = 15 s. Le signal de référence S0 est acquis dans les mêmes conditions, sauf que seuls les gradients sont joués, pas la RF. L'amplitude des gradients est donnée en % du maximum (1 T/m) et celle de la RF en dB (0 dB \equiv 23.7 W).

Ces valeurs de rehaussement, bien qu'en accord avec les prédictions théoriques, sont très faibles pour représenter un véritable avantage expérimental par rapport aux séquences de diffusion classiques. En effet, le système de gradients ne permettait pas d'obtenir des tailles de saturation beaucoup plus petites ni de répéter la saturation pendant plus longtemps, pour obtenir plus de rehaussement. Par ailleurs, des pulses produisant un profil de saturation beaucoup plus proche de l'idéal (90° dans le trou, et zéro ailleurs) devraient être utilisés. Les pulses customisés, calculés à partir de l'approximation des petits angles et la méthode des angles additifs (Grissom et al., 2008; Pauly et al., 1989) sont prometteurs à condition que soit tenu compte des variabilités expérimentales (shim, fluctuations de fréquence, etc...).

La démonstration expérimentale de l'effet DESIRE a été réalisée pour la première fois en 2D dans le cadre de nos expériences. Cependant, l'utilité de la séquence en son état pour imager des neurones d'aplysie restait limitée. Nous nous sommes donc penchés sur l'implémentation d'une séquence de diffusion plus « classique » mais permettant d'obtenir des estimations rapides et à haute résolution de l'ADC.

8. Développement d'une 3D DP-FISP

L'étude présentée dans ce chapitre a été publiée dans le recueil d'abstracts de l'ISMRM 2013 sous : Jelescu IO, Le Bihan D, Ciobanu L. *3D DP-FISP for diffusion measurements in MR microscopy at ultra-high field.*

Pour des mesures de diffusion sur une cellule unique (à géométrie sphérique), les acquisitions 3D sont préférables car elles permettent d'atteindre plus facilement une résolution spatiale isotrope. Cependant, le temps d'acquisition doit rester court comparativement à l'espérance de survie de la cellule. En microscopie IRM, les acquisitions EPI (echo planar imaging) sont compromises par de nombreux artefacts de susceptibilité magnétique, courants de Foucault et vibration mécanique. Une bonne alternative à haut champ est alors la préparation en diffusion de l'aimantation longitudinale, suivie d'une acquisition rapide de type TurboFLASH ou FISP. Les biais à surveiller dans ces séquences sont la contamination de la pondération en diffusion par la repousse T_1 et les courants de Foucault. Nous nous sommes inspirés d'une FISP-FID 2D pondérée en diffusion implémentée à 7 T pour l'imagerie pré-clinique in vivo (Lu et al., 2012) pour mettre en place une 3D DP-FISP adaptée à la microscopie IRM à 17.2 T. Le diagramme de la séquence est présenté dans la Figure 6. Les principales caractéristiques sont un encodage centrique et une minimisation des délais pour réduire l'effet de la repousse T_1 . Ces courts délais peuvent potentiellement favoriser les artefacts dus aux courants de Foucault mais de tels artefacts n'ont pas été observés sur les images.

Les valeurs d'ADC mesurées avec la séquence ont été comparées à celles obtenues avec une diffusion-weighted spin-echo (DW-SE) standard, sur trois fantômes avec des valeurs de diffusion et de T_1 pertinentes pour du tissu biologique. Le temps de diffusion choisi, 9.2 ms, correspond au temps le plus court atteignable avec la DW-

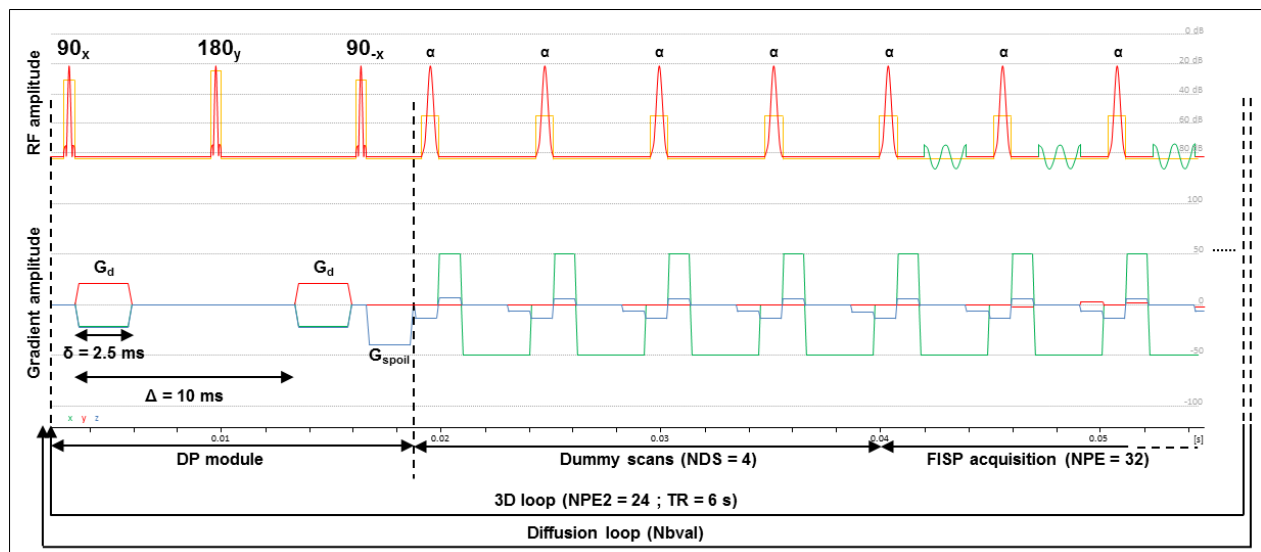


Figure 6. Diagramme de la séquence 3D DP-FISP. Pondération en diffusion: les gradients de diffusion sont appliqués sur les 3 axes. Acquisition FISP: L'encodage est centrique. Durée totale entre le stockage de l'aimantation et le début de l'acquisition: 23 ms. Durée totale de l'acquisition d'un plan du k-space: 166 ms. L'amplitude des gradients est en % du maximum (1 T/m) et celle de la RF en dB (0 dB \equiv 23.7 W).

SE. Ce temps est associé à une distance de diffusion d'environ 7 μm dans la cellule, bien inférieure à la taille du corps cellulaire et à la résolution spatiale (25 μm). Les paramètres de diffusion et de résolution spatiale étaient identiques entre la DP-FISP et la DW-SE. Le temps d'acquisition par b-value était de 9 min 36 s avec la DP-FISP et de 38 min 24 s avec la DW-SE. L'ADC était estimé dans chaque cas à partir de 7 valeurs de b entre 10 et 600 s/mm^2 .

Les résultats de mesures d'ADC sont regroupés dans le Tableau 3.

Fantôme	T_1 (ms)	DW-SE ADC ($10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$)	DP-FISP ADC ($10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$)	Erreur ^b (%)
ASW	2960 ± 21^a	1.92 ± 0.01	1.91 ± 0.01	-0.5
NaCl, CuSO_4	1315 ± 10	2.01 ± 0.01	1.99 ± 0.03	-1.0
Dodecane	1455 ± 15	0.76 ± 0.01	0.76 ± 0.01	< 0.1

Tableau 3. Mesures de T_1 et d'ADC (avec DW-SE et DP-FISP) dans chacun des trois fantômes. ^aL'incertitude représente la déviation standard sur les paramètres de fit. ^bL'erreur est celle de la mesure d'ADC avec DP-FISP compare à celle avec DW-SE qui est prise pour référence.

La 3D DP-FISP produit donc des mesures d'ADC à 1% près de celles obtenues avec la 3D DW-SE pour les trois fantômes considérés et pour des valeurs de b jusqu'à 600 s/mm^2 . Dans cette limite, l'atténuation du signal en fonction de b conserve son caractère monoexponentiel, sans biais dû à la repousse T_1 ou au bruit Ricien. Le SNR temporel de la séquence est comparable à celui de la DW-SE. Il est possible de réaliser des cartes paramétriques d'ADC (fit point par point) dans les fantômes mais l'incertitude sur la valeur est plus élevée à cause du SNR relativement réduit. Les images de fantômes homogènes ne présentent pas d'artefact dans le volume d'intérêt de l'antenne, validant *a posteriori* l'absence de courants de Foucault importants. Des artefacts sont visibles aux deux extrémités du solénoïde et sont probablement dus à des inhomogénéités de B_1 de l'antenne – puisqu'ils n'étaient pas présents dans le volume d'intérêt, la source de ces artefacts n'a pas été sondée en détail.

Au chapitre suivant, nous nous servons de cette séquence rapide et fiable à faibles valeurs de b pour effectuer des mesures d'ADC dans le soma neuronal isolé et le ganglion buccal de l'aplysie.

9. Impact du gonflement cellulaire sur l'ADC à différentes échelles

L'étude présentée dans ce chapitre a été soumise pour publication sous : Jelescu IO, Ciobanu L, Geffroy F and Le Bihan D. *Effects of hypotonic stress and ouabain on the apparent diffusion coefficient at cellular and tissue levels in the Aplysia*. – article en cours de révision.

Les gradients ioniques entre les espaces intra- et extracellulaire sont maintenus par des pompes (nécessitant de l'ATP) et des canaux ioniques voltage-dépendants situés dans la membrane. Il existe plusieurs conditions physiologiques et pathologiques qui entraînent une dépolarisation de la membrane, comme l'activation neuronale (via la propagation d'un potentiel d'action) ou l'ischémie cérébrale (via une chute de la production d'ATP et l'arrêt du fonctionnement des pompes Na^+/K^+). Cette dépolarisation de la membrane entraîne un gonflement cellulaire bien connu. Parallèlement, ces mêmes conditions, associées à une dépolarisation de la membrane, entraînent également une diminution de l'ADC dans la région concernée (Darquie et al., 2001; Moseley et al., 1990). Le lien entre le gonflement cellulaire et la diminution d'ADC n'a pas été encore clairement établi, et c'est l'objet de l'étude présentée ici.

Les hypothèses sont multiples :

- Augmentation de la fraction volumique d'espace intracellulaire, où l'ADC est supposé plus réduit que dans l'extracellulaire (Benveniste et al., 1992) ; cette hypothèse a vu son succès grandir avec la mise en évidence d'une atténuation biexponentielle du signal de diffusion et l'identification de deux compartiments lent et rapide, mais qui ne correspondent pas du tout en taille aux espaces intra- et extracellulaire (Niendorf et al., 1996)
- Arrêt du flux cytoplasmique et/ou augmentation de la viscosité cytoplasmique (Duong et al., 1998; Goodman et al., 2008)
- Augmentation de la tortuosité de l'espace extracellulaire (Latour et al., 1994)
- Reconfiguration des neurites en « perles » (Budde and Frank, 2010)
- Augmentation de la surface de membranes, près desquelles la diffusion est lente (Le Bihan, 2007; Schwarcz et al., 2004)

L'intérêt de différencier le comportement intracellulaire du reste est évident. Dans cette étude, nous avons donc évalué la variation d'ADC à deux échelles structurelles différentes du système nerveux de l'aplysie : dans des grand corps cellulaires neuronaux mécaniquement isolés (cellules R2, L2 à L11 du ganglion abdominal et

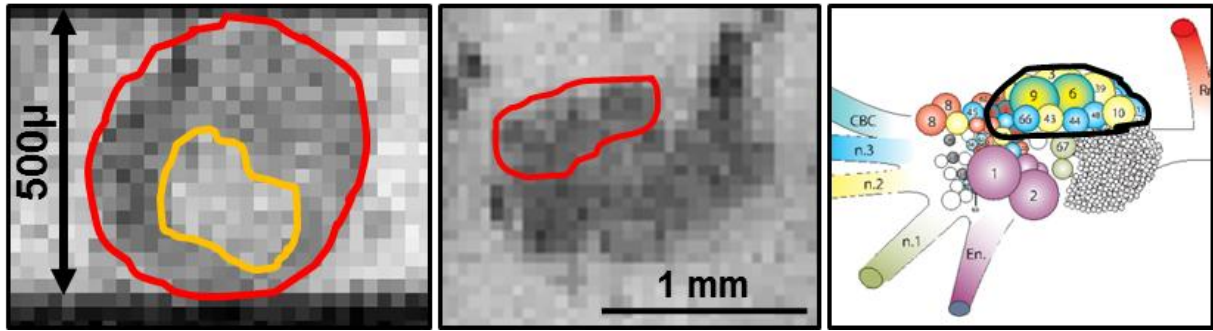


Figure 7. Exemples de régions d'intérêt pour l'extraction d'un ADC moyen. A gauche : Soma isolé (R2). Le contour rouge représente la cellule entière, et celui orange le noyau. La segmentation du cytoplasme est obtenue par la différence des deux. La séparation noyau/cytoplasme n'était pas possible dans toutes les cellules. Au milieu : Ganglion buccal. Le contour rouge représente la région de corps cellulaires choisie. A droite : schéma correspondant du ganglion buccal, identifiant la région choisie pour la mesure d'ADC.

LP11 du ganglion pleural gauche), et dans la région de corps cellulaires du ganglion buccal. Cette région est composée à 40% de soma, le reste étant réparti entre extracellulaire, quelques cellules gliales et des neurites en proportion négligeable. Nous avons exposé ces deux types de structures à des sollicitations imitant les effets de l'ischémie : une solution hypotonique (induisant un gonflement cellulaire par équilibration avec le milieu extracellulaire) et la présence de ouabaïne (qui inhibe la K^+/Na^+ -ATPase et entraîne une dépolarisation de la membrane).

L'ADC a été évalué dans chaque cas avec la 3D DP-FISP, à partir de 7 b-values ($10 - 600 \text{ s/mm}^2$), avant et après exposition à une des trois solutions: ASW normale (solution témoin), ASW 33% hypotonique, ou ASW avec 1 mM de ouabaïne. Pour le soma isolé, le signal a été moyenné sur la cellule segmentée dans son intégralité ; une étude différenciée sur le cytoplasme et le noyau a aussi été effectuée quand la segmentation intracellulaire le permettait (i.e. sur les plus grosses cellules). Pour le ganglion, le signal a été moyenné sur la région de corps cellulaires. La Figure 7 illustre les régions d'intérêt dans chacune des structures.

La Figure 8 rassemble les résultats pour les mesures d'ADC. Ce dernier ne varie pas de façon significative avec la solution témoin, signe que le protocole en lui-même n'altère pas l'ADC des structures. Suite à un choc hypotonique, l'ADC augmente de (32 ± 24)% dans le soma et diminue de (12 ± 5)% dans le tissu du ganglion. En présence d'ouabaïne, l'ADC augmente de (30 ± 11)% dans le soma et diminue de (18 ± 8)% dans le ganglion. Dans trois cellules exposées au choc hypotonique et deux à l'ouabaïne, l'étude séparée du noyau et cytoplasme a montré une augmentation d'ADC dans chacun de ces compartiments cellulaires. La réponse au milieu hypotonique est accompagnée d'un gonflement cellulaire important – 24% mesuré

par IRM et 37% par microscopie optique. L'ouabaine cependant n'engendre qu'un gonflement léger – 1% mesuré par IRM et 12% par microscopie optique.

Séparément, chaque tendance observée est cohérente avec les autres résultats dans la littérature sur différents modèles animaux. Une baisse de l'ADC a été rapportée

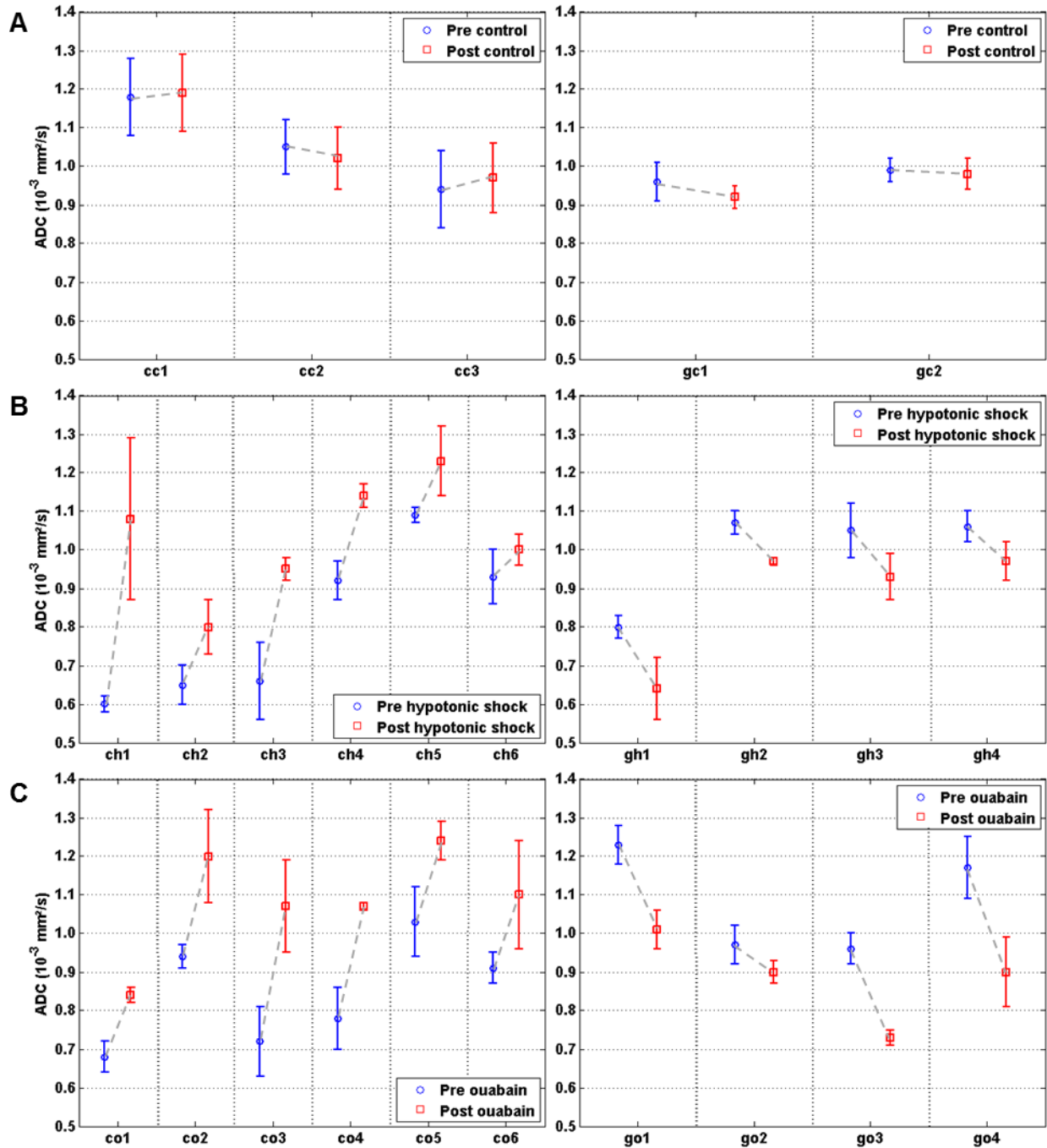


Figure 8. Mesures d'ADC avant et après stress témoin (A), hypotonique (B) et ouabaine (C), dans les somas isolés (à gauche) et dans les régions de corps cellulaires (à droite). Suite au choc hypotonique ou à l'exposition à l'ouabaine, l'ADC augmente dans les corps cellulaires et diminue dans le tissu contenant les corps cellulaires.

suite à un choc hypotonique dans le cervelet de tortue (O'Shea et al., 2000) et dans l'hippocampe du rat (Blackband et al., 1997), et en présence d'ouabaïne dans le cerveau du rat (Benveniste et al., 1992; Buckley et al., 1999). Une augmentation d'ADC somatique suite à un choc hypotonique a également été montrée sur des ovocytes de grenouille (Sehy et al., 2002) et suit une logique de dilution de l'espace intracellulaire provoquée par l'entrée massive d'eau. L'effet de l'ouabaïne sur l'ADC des corps cellulaires de neurones n'a pas d'antécédent dans la littérature. Cependant, l'augmentation mesurée est cohérente avec une déstructuration du cytoplasme, dont l'effet d'augmenter le coefficient de diffusion a déjà été montré (Wojcieszyn et al., 1981).

L'aspect le plus important qui ressort de ces résultats est que la baisse de l'ADC dans le tissu comportant les corps cellulaires se produit malgré le fait que l'ADC augmente à l'intérieur des mêmes corps cellulaires. Comment réconcilier ces deux tendances ? Si on raisonne en termes de compartiments, les 60% de non-soma dans la région d'intérêt du ganglion sont répartis en espace extracellulaire, cellules gliales et quelques processus. L'effet de tortuosité accrue de l'espace extracellulaire ne peut pas être seul à l'origine de la diminution prédominante de l'ADC car cette diminution était plus marquée suite à l'ouabaïne, là où le gonflement cellulaire était le moins important. Les cellules gliales quant à elles sont connues pour gonfler tel le soma neuronal, et donc une augmentation de l'ADC en leur sein est également attendue. Enfin, bien qu'il soit attendu que l'ADC diminue dans les neurites suite à la formation de « perles », leur fraction volumique est très certainement négligeable dans la région d'intérêt choisie.

Une explication plausible serait alors qu'à volume fixe, tel que la région d'intérêt segmentée dans le ganglion, le gonflement et déformation des structures entraîne une augmentation de la surface membranaire totale et de là une diminution de l'ADC. Dans les expériences sur neurone isolé, le volume suivi était variable et donc l'augmentation de volume de la cellule l'emportait sur l'augmentation de surfaces membranaires. Ce mécanisme n'éclaire cependant pas les résultats de l'ouabaïne où les variations d'ADC étaient très fortes malgré un gonflement cellulaire modeste ; l'excitotoxicité associée à l'ouabaïne pourrait engendrer des modifications supplémentaires de l'ADC dont les mécanismes demeurent à élucider.

Dans tous les cas, nos résultats ne soutiennent pas les hypothèses suivantes pour expliquer la diminution d'ADC conjointe au gonflement cellulaire : l'augmentation du ratio intra/extracellulaire, de la viscosité cytoplasmique ou l'arrêt du flux cytoplasmique.

Des études complémentaires devraient être menées : augmenter la résolution spatiale sur la cellule unique pour observer la couche d'eau lente proche des membranes ; sur le ganglion pour observer la variation d'ADC dans des somas encore présents dans le tissu et dans le tissu global en même temps. L'étude de la diffusion non Gaussienne serait également du plus grand intérêt : la séquence devrait être adaptée pour l'utilisation à des grandes b-values. Enfin, une étude similaire dans la région de neuropile au cœur du ganglion serait complémentaire car ce tissu comporte majoritairement des neurites mais quasiment pas de corps cellulaires.

Bibliographie

- Benveniste, H., Hedlund, L.W., Johnson, G.A., 1992. Mechanism of detection of acute cerebral ischemia in rats by diffusion-weighted magnetic resonance microscopy. *Stroke* 23, 746-754.
- Blackband, S.J., Bui, J.D., Buckley, D.L., Zelles, T., Plant, H.D., Inglis, B.A., Phillips, M.I., 1997. MR microscopy of perfused brain slices. *Magn Reson Med* 38, 1012-1015.
- Buckley, D.L., Bui, J.D., Phillips, M.I., Zelles, T., Inglis, B.A., Plant, H.D., Blackband, S.J., 1999. The effect of ouabain on water diffusion in the rat hippocampal slice measured by high resolution NMR imaging. *Magn Reson Med* 41, 137-142.
- Budde, M.D., Frank, J.A., 2010. Neurite beading is sufficient to decrease the apparent diffusion coefficient after ischemic stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14472-14477.
- Callaghan, P.T., 1993. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy*. Clarendon Press.
- Carr, H.Y., 1958. Steady-State Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance. *Physical Review* 112, 1693-1701.
- Darquie, A., Poline, J.B., Poupon, C., Saint-Jalmes, H., Le Bihan, D., 2001. Transient decrease in water diffusion observed in human occipital cortex during visual stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9391-9395.
- Duong, T.Q., Ackerman, J.J., Ying, H.S., Neil, J.J., 1998. Evaluation of extra- and intracellular apparent diffusion in normal and globally ischemic rat brain via ¹⁹F NMR. *Magn Reson Med* 40, 1-13.
- Einstein, A., 1905. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik* 322, 549-560.
- Frahm, J., Haase, A., Matthaei, D., 1986. Rapid three-dimensional MR imaging using the FLASH technique. *J Comput Assist Tomogr* 10, 363-368.
- Glover, P., Mansfield, S.P., 2002. Limits to magnetic resonance microscopy. *Reports on Progress in Physics* 65, 1489.
- Goodman, J.A., Ackerman, J.J., Neil, J.J., 2008. Cs + ADC in rat brain decreases markedly at death. *Magn Reson Med* 59, 65-72.
- Grissom, W.A., Yip, C.-Y., Wright, S.M., Fessler, J.A., Noll, D.C., 2008. Additive angle method for fast large-tip-angle RF pulse design in parallel excitation. *Magnetic Resonance in Medicine* 59, 779-787.
- Haacke, E.M., Brown, R.W., Thompson, M.R., Venkatesan, R., 1999. *Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design*. Wiley.
- Hennig, J., Nauerth, A., Friedburg, H., 1986. RARE imaging: a fast imaging method for clinical MR. *Magn Reson Med* 3, 823-833.
- Hoult, D.I., Richards, R.E., 1976. The signal-to-noise ratio of the nuclear magnetic resonance experiment. *Journal of Magnetic Resonance* (1969) 24, 71-85.
- Kehoe, J., 1972. Three acetylcholine receptors in *Aplysia* neurones. *J Physiol* 225, 115-146.
- Kupfermann, I., Carew, T.J., Kandel, E.R., 1974. Local, reflex, and central commands controlling gill and siphon movements in *Aplysia*. *J Neurophysiol* 37, 996-1019.
- Latour, L.L., Svoboda, K., Mitra, P.P., Sotak, C.H., 1994. Time-dependent diffusion of water in a biological model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1229-1233.
- Le Bihan, D., 2007. The 'wet mind': water and functional neuroimaging. *Physics in Medicine and Biology* 52, R57.
- Le Bihan, D., Breton, E., Lallemand, D., Grenier, P., Cabanis, E., Laval-Jeantet, M., 1986. MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology* 161, 401-407.

Lu, L., Erokwu, B., Lee, G., Gulani, V., Griswold, M.A., Dell, K.M., Flask, C.A., 2012. Diffusion-prepared fast imaging with steady-state free precession (DP-FISP): a rapid diffusion MRI technique at 7 T. *Magn Reson Med* 68, 868-873.

Mattiello, J., Basser, P.J., Lebihan, D., 1994. Analytical Expressions for the b Matrix in NMR Diffusion Imaging and Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* 108, 131-141.

Mendonca-Dias, M.H., Gaggelli, E., Lauterbur, P.C., 1983. Paramagnetic contrast agents in nuclear magnetic resonance medical imaging. *Semin Nucl Med* 13, 364-376.

Minard, K.R., Wind, R.A., 2001a. Solenoidal microcoil design—Part II: Optimizing winding parameters for maximum signal-to-noise performance. *Concepts in Magnetic Resonance* 13, 190-210.

Minard, K.R., Wind, R.A., 2001b. Solenoidal microcoil design. Part I: Optimizing RF homogeneity and coil dimensions. *Concepts in Magnetic Resonance* 13, 128-142.

Moseley, M.E., Cohen, Y., Mintorovitch, J., Chileuitt, L., Shimizu, H., Kucharczyk, J., Wendland, M.F., Weinstein, P.R., 1990. Early detection of regional cerebral ischemia in cats: comparison of diffusion- and T2-weighted MRI and spectroscopy. *Magn Reson Med* 14, 330-346.

Nargeot, R., Simmers, J., 2012. Functional organization and adaptability of a decision-making network in *aplysia*. *Front Neurosci* 6, 113.

Niendorf, T., Dijkhuizen, R.M., Norris, D.G., van Lookeren Campagne, M., Nicolay, K., 1996. Biexponential diffusion attenuation in various states of brain tissue: implications for diffusion-weighted imaging. *Magn Reson Med* 36, 847-857.

Nishimura, D.G., 1996. Principles of magnetic resonance imaging. Stanford University.

O'Shea, J.M., Williams, S.R., van Bruggen, N., Gardner-Medwin, A.R., 2000. Apparent diffusion coefficient and MR relaxation during osmotic manipulation in isolated turtle cerebellum. *Magn Reson Med* 44, 427-432.

Pauly, J., Nishimura, D., Macovski, A., 1989. A k-space analysis of small-tip-angle excitation. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 81, 43-56.

Pennington, C.H., 2003. Prospects for diffusion enhancement of signal and resolution in magnetic resonance microscopy. *Concepts in Magnetic Resonance Part A* 19A, 71-79.

Quicke, D.L., Brace, R.C., 1979. Differential and staining of cobalt-and nickel-filled neurones using rubeanic acid. *J Microsc* 115, 161-163.

Schwarcz, A., Bogner, P., Meric, P., Correze, J.L., Berente, Z., Pal, J., Gallyas, F., Doczi, T., Gillet, B., Beloeil, J.C., 2004. The existence of biexponential signal decay in magnetic resonance diffusion-weighted imaging appears to be independent of compartmentalization. *Magn Reson Med* 51, 278-285.

Sehy, J.V., Ackerman, J.J., Neil, J.J., 2002. Evidence that both fast and slow water ADC components arise from intracellular space. *Magn Reson Med* 48, 765-770.

Silva, A.C., Bock, N.A., 2008. Manganese-enhanced MRI: an exceptional tool in translational neuroimaging. *Schizophr Bull* 34, 595-604.

Silva, A.C., Lee, J.H., Aoki, I., Koretsky, A.P., 2004. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI): methodological and practical considerations. *NMR Biomed* 17, 532-543.

Wojcieszyn, J.W., Schlegel, R.A., Wu, E.S., Jacobson, K.A., 1981. Diffusion of injected macromolecules within the cytoplasm of living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 4407-4410.

Yablonskiy, D.A., Sukstanskii, A.L., 2010. Theoretical models of the diffusion weighted MR signal. *NMR Biomed* 23, 661-681.

Yamashita, N., 1982. Enhancement of ionic currents through voltage-gated channels in the mouse oocyte after fertilization. *J Physiol* 329, 263-280.