HAL
open science

Développement de méthodes de spectroscopie par résonance magnétique localisée pour l'étude du métabolisme chez le petit animal

Nicolas Joudiou

▶ **To cite this version:**

Nicolas Joudiou. Développement de méthodes de spectroscopie par résonance magnétique localisée pour l'étude du métabolisme chez le petit animal. Autre [cond-mat.other]. Université d'Orléans, 2013. Français. NNT : 2013ORLE2044 . tel-00994601

HAL Id: tel-00994601

https://theses.hal.science/tel-00994601v1

Submitted on 21 May 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.

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Centre de Biophysique Moléculaire

THÈSE présentée par :

Nicolas JOUDIOU

soutenue le : **18 octobre 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Spécialité : **Physique**

Développement de méthodes de Spectroscopie par Résonance Magnétique localisée pour l'étude du métabolisme chez le petit animal.

THÈSE dirigée par :

Jean-Claude BELOEIL	DR1, UPR4301

RAPPORTEURS :

Jean-Michel Franconi	Professeur, Université Victor Ségalen, Bordeaux
Laurent Lemaire	IR, UMR Inserm 1066

JURY :

Joseph Hamatchek	Professeur, Université d'Orléans, Président du jury
Bich-Thuy Doan	CR1, UMR 8151 CNRS / U 1022 INSERM
Jacques Felblinger	Professeur, Université Henri Poincaré - Nancy 1
Sandra Même	CR1, CNRS, UPR4301

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Jean-Claude Belœil pour m'avoir proposé d'intégrer son équipe pour y réaliser ma thèse. Merci à lui pour son encadrement, ses conseils, les relectures et également pour les discussions sur la montagne.

Merci aux personnes qui ont acceptées d'évaluer mon travail, rapporteurs et membres du jury.

Merci à toutes les personnes de l'équipe pour l'aide qu'elles ont pu m'apporter. Merci à Fanny, Frédéric, Lætitia, Martine, Patrice, Sandra et Wiliam, que ce soit pour l'aide apportée au cours des expériences, souris et drosophile, la construction des bobines, les discussions scientifiques (et les moins scientifiques pendant un café ou un repas), les préparations de présentations, de résumés divers ...

Je remercie également les gens des équipes extérieures avec qui il m'a été donné de travailler. Un grand merci à Bich-Thuy pour ses nombreux conseils et encouragements. Merci aux gens du Cemhti qui m'ont beaucoup aidé, en particulier Vincent, merci pour les semaines de manipes qui ne se seraient pas aussi bien déroulées sans son aide, et qui auraient été sans doute beaucoup moins productives. Merci au Pr Joël Mispelter pour son aide sur les bobines. Mes remerciements vont aussi aux gens des équipes de Rennes et d'Angers avec qui il m'a été donné de travailler.

Je remercie le CNRS pour m'avoir financé durant mes 3 premières années de thèse et la Ligue Contre le Cancer pour m'avoir donné la possiblité d'achever mon travail en financant une 4ème année.

Parce ce que dans la vie d'un thésard il n'y a (quand même) pas que la thèse, pour finir je tiens à dire un grand merci aux gens du 108 bis. Je n'en nommerais qu'une partie, mais pas la moindre. Merci à Manu, Ninie, Jipé, Gribouille Bénoit, Luc, Damien et à tous les autres. Merci pour ces 4 ans passés avec vous. Merci pour les repas, les sessions sportives, les soirées, les sorties...merci d'avoir été là pendant 4 ans pour me soutenir et faire du 108 bis un endroit exceptionnel !

Table des matières

Introduction **1**

1 Résonance Magnétique Nucléaire, Imagerie et Spectroscopie par Résonance Magnétique **5**

1.1 La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) 6
1.1.1 Le moment magnétique nucléaire 6
1.1.2 Aspects énergétiques 7
1.1.3 Occupation des niveaux d'énergie 7
1.1.4 Notion de référentiel tournant 7
1.1.5 Résonance Magnétique Nucléaire 7
1.1.6 Notion de T_2^* 12
1.2 L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) 15
1.2.1 Fréquences spatiales et espace fréquentiel 15
1.2.1.1 Propriétés de l'espace k 15
1.2.2 Le codage de l'espace 18
1.2.2.1 Notion d'impulsion spatialement sélective . . . 20
1.2.2.2 Gradient de sélection de tranche 20
1.2.2.3 L'espace k et le codage de l'information 22
1.2.3 Séquences de base en IRM 26
1.2.3.1 Séquence en IRM et parcours de l'espace k . . . 26
1.2.3.2 Séquence écho de gradient 26
1.2.3.3 Séquence écho de spin 28
1.2.4 Contraste 31
1.2.4.1 Contraste obtenu avec une séquence écho de spin 32
1.2.4.2 Contraste obtenu avec une séquence écho de gradient 36
1.3 La Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM) 38
1.3.1 Spectroscopie 1D du noyau d'hydrogène 38
1.3.1.1 Déplacement chimique 38
1.3.2 Couplage hétéronucléaire 39
1.3.3 Couplage homonucléaire 40
1.3.4 Spectroscopie $2D$ homonucléaire 40

1.3.4.1 Structure générale d'une séquence de spectroscopie $2D$: obtention de la deuxième dimension fréquentielle. 41
1.3.4.2 Exemple de la séquence TOCSY [6] 41
1.3.4.3 Structure d'un spectre $2D$ homonucléaire, de corrélation 42
1.3.5 Méthode de RMN HRMAS 42
1.3.5.1 Principe de la HRMAS 42
1.3.5.2 Théorie de la RMN HRMAS 43
1.4 La spectroscopie localisée 48
1.4.1 La méthode PRESS 49
1.4.2 La méthode d'imagerie de déplacement chimique 50
1.4.3 Les modules additionnels 51
1.4.3.1 Utilisation des gradients crushers 51
1.4.3.2 Suppression du signal de l'eau 52
1.4.4 Etude du métabolisme cérébral par spectroscopie du carbone ^{13}C. 54
1.4.4.1 Acquisition *ex vivo* versus *in vivo* 54
1.4.4.2 Utilisation de produit marqués ^{13}C 55
1.4.4.3 Méthodes directes 55
1.4.4.4 Méthodes indirectes 56
1.4.4.5 Spectroscopie du carbone ^{13}C chez la souris . . 57
1.4.4.6 La méthode POCE-PRESS 57
1.5 Sonde de mesure 60
1.5.1 Détection du signal 60
1.5.1.1 Induction magnétique 60
1.5.1.2 Propriétés du champ magnétique 61
1.5.2 Sonde de mesure 61
1.5.3 Contraintes imposées lors de la construction d'une sonde 61
1.5.4 Electronique de la bobine de détection 62
1.5.5 Les différents types de bobines 65
1.5.5.1 Bobines homogènes : l'exemple de la bobine de Helmholtz 65
1.5.5.2 Bobines de surface 68
1.5.5.3 Comparaison des deux types de bobines présentées 70
1.5.5.4 Bobine de surface ou bobine volumique 71
1.5.6 Bilan sur les sondes 73

2 Construction d'une sonde pour la spectroscopie ^{1}H filtrée ^{13}C 75
2.1 Structure à 2 canaux 76
2.1.1 Les différents montages pour les acquisitions proton filtrées ^{13}C 76
2.1.2 Choix de la structure pour l'ensemble support et détecteur 76

2.1.2.1 Contraintes liées à la construction de la sonde . 77
2.1.2.2 Support de l'animal 77
2.1.2.3 Evolution des bobines de mesures 80
2.1.2.4 Evolution des circuits d'adaptation 82
2.1.3 Efficacité *in vitro* de la sonde développée 88
2.1.3.1 Dispositif expérimental pour les acquisitions *in vitro* 88
2.1.3.2 Validation de la bobine pour les acquisitions $^1H-^{13}C$ 88
2.1.3.3 Comparaison avec le montage rat 89
2.2 Mesure de température 91
2.2.1 Utilisation d'un complexe de lanthanide pour la mesure de la température 91
2.2.2 Calibration du système de chauffage du spectromètre RMN 92
2.2.3 Étalonnage en température de l'échantillon 93
2.2.4 Protocole de mesure de l'élévation de la température de l'échantillon 95
2.3 Conclusion sur la conception de la bobine 96

3 Etude du métabolisme tumoral 97
3.1 Contexte biologique 98
3.1.1 Métabolisme cérébral de la souris 98
3.1.1.1 Réseau vasculaire cérébral 98
3.1.1.2 Cellules cérébrales (Fig. 3.1) 98
3.1.1.3 Les métabolites cérébraux observables en SRM du proton 100
3.1.1.4 Métabolisation du glucose 103
3.1.2 Nature des tumeurs étudiées 104
3.1.3 Traitement des tumeurs par un composé antivasculaire . 105
3.1.4 Métabolisme du glucose par un tissu sain 105
3.2 Matériels et méthodes 108
3.2.1 Protocole d'injection des cellules tumorales 108
3.2.2 Suivi de l'évolution des tumeurs et traitements des souris 108
3.2.3 SRM des tumeurs 108
3.2.3.1 Traitements des spectres avec le logiciel JMRUI 109
3.3 Résultats 111
3.3.1 Résultats obtenus en imagerie par résonance magnétique 111
3.3.2 Résultats obtenus en SRM ^1H 112
3.3.3 Résultats obtenus en SRM $^1H-^{13}C$ 113
3.3.3.1 Normalisation par le pic de Cr/P-Cr 115
3.4 Discussion et conclusion 119
3.4.1 Evolution des volumes tumoraux 119
3.4.2 Observations faites en spectroscopie ^1H 119
3.4.3 Observations faites en spectroscopie $^1H-^{13}C$ 119

3.4.4 Conclusion sur l'étude de l'antivasculaire 120
3.5 Conclusion sur la méthode de spectroscopie ^{1}H filtrée ^{13}C utilisée pour létude du métabolisme cérébral de la souris 122

4 SRM de la drosophile 125
4.1 Contexte 126
4.2 Matériels et méthodes 128
4.2.1 Matériel utilisé pour l'étude 128
4.2.2 Elevage des drosophiles 129
4.2.3 Drosophiles utilisées 129
4.2.4 Protocole pour les acquisitions de spectroscopie HRMAS sur drosophiles 129
4.2.5 Séquences utilisées 131
4.2.5.1 Spectroscopie globale 131
4.2.5.2 Spectroscopie localisée 132
4.2.6 Problème de la normalisation des données 133
4.3 Résultats 135
4.3.1 Vitesse de rotation 135
4.3.2 Mise en place de la localisation 136
4.3.3 Résultats obtenus sur les deux souches étudiées 138
4.3.3.1 Spectres obtenus sur la souche *Oregon R* 138
4.3.3.2 Spectres obtenus sur la souche Up^{101} 143
4.3.4 Observation d'un signal parasite 144
4.3.5 Résultats obtenus en spectroscopie localisée 145
4.3.6 CSI de la drosophile 147
4.3.6.1 Résultats obtenus en CSI 149
4.4 Discussion et conclusion 153
4.4.1 Validation de la localisation 153
4.4.2 Normalisation des données 154

Annexes 159

A Calcul du champ magnétique le long de l'axe de la bobine de Helmholtz 159

B Détails de la séquence POCE 163

C Traitement des données à l'aide de JMRUI 169
C.1 Interface du logiciel JMRUI 169
C.2 Préparation des données avant approximation 170
C.3 Calcul de l'approximation d'un spectre à l'aide d'AMARES . . . 170
C.3.1 Définition de la liste des pics à simuler 170
C.3.2 Paramètres ajustables pour le calcul de l'approximation . 171
C.4 Résultats obtenus 174

D Données de spectroscopie sur les différents métabolites 177

Glossaire

CHESS	CHEmical Shift Selective
CSI	de l'anglais Chemical Shift Imaging, imagerie de déplacement chimique
FOV	de l'anglais Field Of View, champ de vue
Gcf	gradient de codage en fréquence
Gcp	gradient de codage de phase
Gsc	gradient de sélection de coupe
HRMAS	de l'anglais, High Resolution Magic Angle Spinning, rotation à l'angle magique à haute résolution
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
MAS	de l'anglais, Magic Angle spinning, rotation à l'angle magique
NA	Nombre d'accumulation
NOE	de l'anglais, Nuclear Overhauser Effect, effet nucléaire Overhauser
OVS	de l'anglais, Outer Volume Suppresion, module pemettant de supprimé le signal provenant de l'extérieur du volume d'intérêt
POCE-PRESS	de l'anglais, Proton Observed Carbon Edited-PRESS, séquence de spectroscopie localisée avec édition des carbones et observation des protons
PRESS	de l'anglais, Point RESolved Spectroscopy, séquence de spectroscopie localisée
rf	radio-fréquence
SRM	Spectroscopie par Résonance Magnétique
STEAM	de l'anglais, Stimulated Echo Acquisition Mode, séquence de spectroscopie localisée avec acquisiton d'un écho stimulé
T_E	Temps d'Echo
T_R	Temps de Répétition
TOBSY	de l'anglais TOtal throught Bond correlation SpectroscopY
TOCSY	de l'anglais TOtal Correlation SpectroscopY
VAPOR	de l'anglais VAriable pulse Power and Optimized Relaxation delays
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire

Abréviations utilisées pour les métabolites

GABA	Acide Gamma Amino Butyrique
Ala	Alanine
Cr/P-Cr	Créatine / Phospho-Créatine
Glcα	Glucose α
Glcβ	Glucose β
Glu	Glutamate
Gln	Glutamine
Ins	Inositol
Lac	Lactate
NAA	N-acétyl-aspartate
PCho+GPC	Phospho-Choline + Glycéro-Phospho-Choline
Tau	Taurine

De façon générale on désigne par « Ala C3 » le pic de associé aux protons liés au troisième carbone de l'alanine. Cette notation est utilisé dans le troisième chapitre.

Introduction

La recherche médicale utilise de plus en plus des méthodes faisant appel à des principes physiques en particulier dans le domaine de l'imagerie et des méthodes annexes qui ont bien souvent été développées en parallèle de l'imagerie (l'imagerie permettant généralement la localisation). A ce jour il est possible de distinguer plusieurs grandes classes telles que les différentes méthodes d'imageries optiques (imagerie de bioluminescence [42], fluorescence [65]), les méthodes faisant appel aux rayons X (scanner, radiographie) [40], les méthodes nucléaires (TEP pour Tomographie par Emission de Positon, SPECT (pour Single Photon Emission Computed Tomography) [7], les méthodes utilisant la résonance magnétique nucléaire, ou les méthodes acoustiques (échographie) [32]. Toutes ces méthodes possèdent à la fois des avantages et des inconvénients et il est impossible de définir une méthode qui soit supérieure aux autres. Les distinctions possibles entre ces différentes méthodes, outre le principe physique utilisé, sont souvent dues aux différences entre les résolutions -spatiales et temporelles- atteignables, les différences de seuil de détections, l'incertitude de localisation, les différents protocoles possibles (exemple de l'imagerie et du doppler avec les ultrasons)...

Parmi toutes ces méthodes, l'imagerie par résonance magnétique, ainsi que la spectroscopie par résonance magnétique sont deux méthodes de choix pour l'étude du vivant, cela provient surtout de leur aspect non invasif. Aujourd'hui le nombre de méthodes à disposition est impressionnant. L'imagerie anatomique et la spectroscopie font bien évidement partie des méthodes les plus utilisées, mais on peut également trouver des méthodes telles que la diffusion [79] ou l'imagerie fonctionnelle (IRMf) [16], qui permettent d'accéder à des informations structurelles et fonctionnelles sur le cerveau, l'élastographie [71], qui permet d'accéder à une information mécanique, l'angiographie [14], qui permet d'accéder à la structure vasculaire. Toutes ces méthodes ont déjà fait leurs preuves mais peuvent être constamment améliorées soit en les adaptant le mieux possible aux différentes pathologies à étudier, soit en adaptant ces méthodes aux avancées technologiques. Les besoins de la recherche peuvent aussi amener à des adaptations, c'est le cas lorsque l'on cherche à repousser les limites de détection si l'on travaille sur des animaux de plus en plus petits.

Mes travaux ont porté sur deux espèces animales de petite taille. La première, la souris, est relativement commune lorsque l'on travaille en imagerie médicale, c'est actuellement l'animal le plus utilisé dans ce domaine. Cela est en

grande partie dû aux nombreux modèles transgéniques qui offrent de multiples modèles de pathologies humaines, et qui nous ouvrent un champ extraordinaire pour la recherche.

Le deuxième animal, beaucoup moins commun (dans le cadre de l'IRM et de la SRM), sur lequel j'ai été amené à travailler est la drosophile (*Drosophila melanogaster*). L'intérêt de cet animal provient, tout comme c'est le cas avec les souris transgéniques, de la génétique de l'animal. En effet la drosophile possède un génome qui est facilement modifiable par les généticiens, de plus, malgré les différences évidentes entre un mammifère et la drosophile, cette dernière possèdent 70% de gènes homologues aux gènes humain qui sont impliqués dans les maladies génétiques, des cancers ou maladies neurodégénératives [22]. Les mouches possèdent de nombreux autres avantages. Elles peuvent être facilement entretenues en laboratoire pour un coût réduit. Leur cycle de vie est de 2 semaines seulement, ainsi il est envisageable de faire des études sur plusieurs générations tout en conservant des périodes d'études assez courtes.

J'ai choisi de présenter mon travail de la manière suivante. Le premier chapitre a un rôle introductif, il a pour but de donner les outils qui seront utiles à la compréhension du vocabulaire et des notions utilisés par la suite et qui sont relatifs à l'IRM et la SRM. Dans un deuxième chapitre je présente le travail réalisé pour la construction d'une bobine dédiée à la spectroscopie proton découplée carbone ^{13}C *pour l'étude du métabolisme cérébral de la souris. Les 2 chapitres suivants concernent des travaux réalisés en spectroscopie sur 2 sujets d'étude. Le premier sujet d'étude est le métabolisme d'un modèle de gliome ainsi que l'effet d'un traitement sur ce même métabolisme. L'autre partie concerne les travaux de développement de la spectroscopie pour l'étude de la drosophile.*

Chapitre 1

Résonance Magnétique Nucléaire, Imagerie et Spectroscopie par Résonance Magnétique

1.1 La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

1.1.1 Le moment magnétique nucléaire

Un atome est composé d'un noyau et d'un ou plusieurs électrons. Le noyau se décompose en nucléons de deux types, les neutrons et les protons qui portent les charges électriques positives. Si l'on raisonne du point de vue de la mécanique classique il est possible de considérer que les noyaux atomiques sont en rotation, c'est cette rotation qui entraîne la création d'un moment magnétique nucléaire noté $\vec{\mu}$. Afin de décrire le comportement du moment magnétique nucléaire la mécanique quantique fait appel au nombre de spin I. Dans le tableau 1.1 on peut retrouver les valeurs de I en fonction de la parité du nombre de charges et de masse d'un noyau atomique.

Nombre de charge	Nombre de Masse	Nombre de spin I	Exemples
Pair	Pair	0	^{12}C ; ^{16}O
Pair	Impair	$\frac{1}{2}$; $\frac{3}{2}$;$\frac{5}{2}$	^{13}C
Impair	Pair	1	^{2}H ; ^{14}N
Impair	Impair	$\frac{1}{2}$;$\frac{3}{2}$	^{1}H

Table 1.1 – Valeur du nombre de spin en fonction de la parité du nombre de masse et du nombre de charge d'un noyau atomique.

La valeur du nombre de spin est très importante en RMN. En effet les noyaux atomiques qui possèdent un nombre de spin qui est nul ne sont pas visibles en RMN. De plus la valeur de I renseigne sur le nombre d'orientations possibles d'un moment magnétique nucléaire sous l'action d'un champ magnétique externe $\vec{B_0}$. En effet à partir de la valeur de I on peut calculer les différentes valeurs que peut prendre le moment magnétique μ_z selon la direction du champ magnétique externe. On a $\mu_z = \gamma\hbar m$ avec $m = I; I-1; I-2 \ldots -I$, qui est le nombre quantique magnétique.

Exemple pour un atome d'hydrogène ^{1}H :

$$I = \frac{1}{2} \rightarrow m = -\frac{1}{2}; \frac{1}{2}$$
$$\mu_z = \gamma\hbar m = \pm\frac{\gamma\hbar}{2}$$

1.1.2 Aspects énergétiques

En l'absence de champ magnétique extérieur tout les états de spin sont dits dégénérés. Ils possèdent tous la même énergie.

En présence d'un champ magnétique externe dirigé selon l'axe $\vec{z}$ il y a interaction entre le moment magnétique nucléaire et le champ magnétique externe. L'énergie magnétique associée à cette interaction est égale à

$$E_m = -\vec{\mu_0}.\vec{B_0} = -\gamma\hbar m B_0 = \nu_0 h m \text{ avec } \nu_0 = -\frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

1.1.3 Occupation des niveaux d'énergie

Afin d'exposer comment se répartissent les différents niveaux d'énergie nous allons nous appuyer sur l'exemple des noyaux d'hydrogène ^1H. L'équation de Boltzmann nous renseigne sur la répartition statistique des différents niveaux d'énergie pour l'ensemble des atomes. Dans le cas de l'atome d'hydrogène, le moment magnétique nucléaire est associé à deux niveaux d'énergie possibles : $E_1 = \frac{-h\nu_0}{2}$ et $E_2 = \frac{h\nu_0}{2}$ associés aux valeurs $m = \frac{1}{2}$ et $m = -\frac{1}{2}$.

D'après l'équation de Boltzmann, la probabilité que le moment magnétique nucléaire d'un atome d'hydrogène occupe le niveau d'énergie E_i est de :

$$P_i = \frac{e^{-\frac{E_i}{k_B T}}}{e^{-\frac{E_1}{k_B T}} + e^{-\frac{E_2}{k_B T}}} \tag{1.1}$$

Une application numérique permet de se rendre compte de la faible différence de probabilité qui correspond à une faible différence entre les niveaux d'énergie. Si l'on considère une température de 20°C le calcul nous montre que pour 1 000 032 noyaux d'atomes d'hydrogène soumis à un champ magnétique externe de 9,4 T, il y a en a 500 032 au niveau d'énergie E_1 et 500 000 au niveau d'énergie E_2. Cela met en relief un des problèmes rencontrés en SRM et IRM, qui est le peu de signal malgré la présence de nombreux atomes, car c'est la différence qui est observable en IRM et en SRM.

1.1.4 Notion de référentiel tournant

Nous allons ici distinguer deux référentiels. Le premier est le référentiel du laboratoire. Il est considéré, au vue de la durée des expériences, comme étant galiléen. Ce référentiel reste inapproprié par rapport aux phénomènes décrits ensuite. Le référentiel qui est souvent utilisé pour décrire les expériences de RMN est un référentiel tournant à la fréquence ν qui est la fréquence de travail.

1.1.5 Résonance Magnétique Nucléaire

Nous allons dans un premier temps décrire le comportement d'un moment magnétique nucléaire seul. On décrit un moment magnétique nucléaire comme

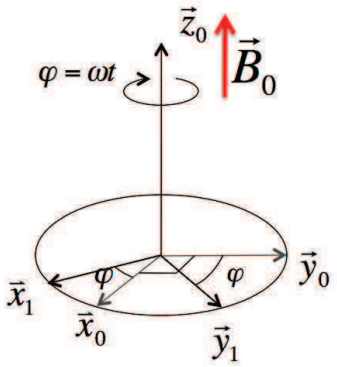


FIGURE 1.1 – Repère tournant $(\vec{x_1},\vec{y_1},\vec{z_1})$ à la pulsation $\omega = 2\pi\nu$. par rapport au repère fixe du laboratoire $(\vec{x_0},\vec{y_0},\vec{z_0})$

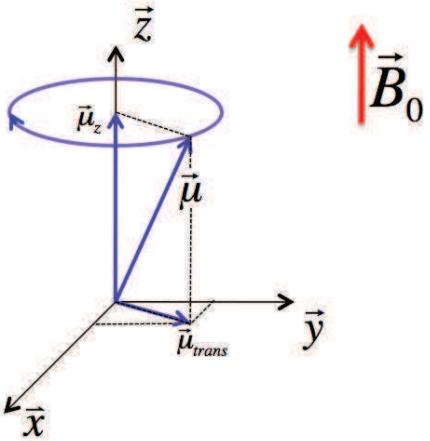


FIGURE 1.2 – Moment magnétique $\vec{\mu}$ et sa décomposition dans le repère $(\vec{x},\vec{y},\vec{z})$ en deux composantes, $\vec{\mu_{trans}}$ qui est la composante transversale et $\vec{\mu_z}$ qui est la composante longitudinale.

un vecteur que l'on peut décomposer en une partie selon l'axe longitudinal, et une partie selon le plan transversal à cet axe (cf Fig.1.2).

Mouvement de précession libre

Sous l'effet d'un champ magnétique externe les moments magnétiques de chaque atome ont un mouvement de précession autour de leurs positions d'équilibre définie par le champ magnétique appliqué. Ce mouvement de précession provient de l'interaction entre le moment magnétique nucléaire et le champ magnétique. En effet l'interaction des deux créée un couple $\vec{\Gamma}$ défini par :

$$\vec{\Gamma} = \vec{\mu} \wedge \vec{B_0} = \frac{d\vec{L}}{dt} = \frac{1}{\gamma}\frac{d\vec{\mu}}{dt} \text{ avec } \vec{\mu} = \gamma\vec{L}$$

$\vec{L}$ étant le moment de la force exercée par le champ magnétique sur le noyau atomique. En considérant un champ magnétique appliqué selon $\vec{z}$ dans un repère cartésien orthonormé on peut réécrire l'équation en projection sur les 3 axes :

$$\begin{cases} \frac{d\mu_x}{dt} = & \gamma\mu_y B_z \\ \frac{d\mu_y}{dt} = & -\gamma\mu_x B_z \\ \frac{d\mu_z}{dt} = & 0 \end{cases}$$

Ce système d'équations a pour solution :

$$\begin{cases} \mu_x(t) = & \mu_x^{t=0}\cos(wt) \\ \mu_y(t) = & \mu_y^{t=0}\sin(wt) \\ \mu_z(t) = & \mu_z^{t=0} \end{cases}$$

Le moment magnétique nucléaire décrit donc un cône autour de l'axe du champ magnétique extérieur. Il possède une composante selon l'axe longitudinal qui est constante, et une composante transversale qui décrit un cercle au cours du temps.

Action d'un champ magnétique tournant sur le moment magnétique nucléaire

Dans cette partie il est question d'un champ magnétique tournant mais en réalité, dans le cadre d'une expérience de RMN c'est un champ magnétique oscillant qui est utilisé (champ magnétique toujours dirigé selon la même direction et qui est variable en intensité). Ce champ magnétique oscillant peut être décomposé en deux champs magnétiques tournants en sens inverse (cf. Fig.1.3). Seule la composante tournant dans le même sens que les moments magnétiques va avoir un effet sur ceux-ci.

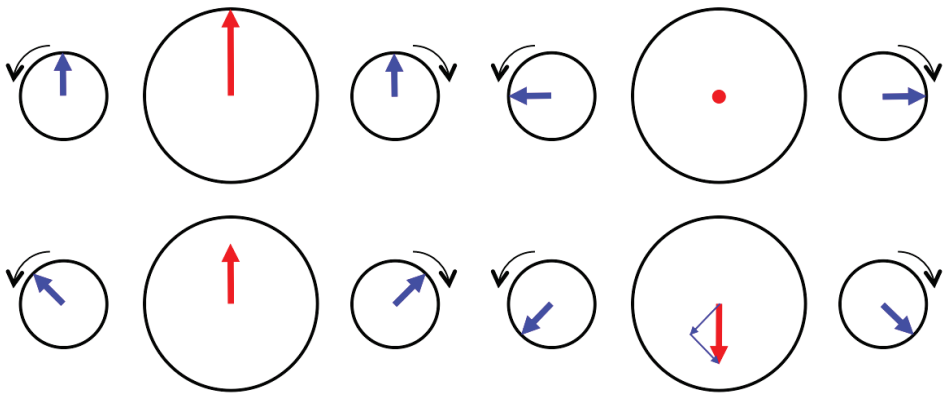


FIGURE 1.3 – Sur cette figure j'ai représenté la décomposition d'un champ oscillant (en rouge), en deux champs tournants dans des sens opposés (en bleu). J'ai représenté 4 cas, sur le dernier, en bas à droite, j'ai également représenté la somme vectorielle des deux champs tournants qui se superpose au champ oscillant.

On considère toujours un moment magnétique dont la projection dans le repère tournant est la suivante : $\vec{\mu_x}$, $\vec{\mu_y}$ et $\vec{\mu_z}$.

On considère maintenant que l'on applique un champ magnétique variable tournant b_1. Il est appliqué à la fréquence ν perpendiculairement à l'axe du champ B_0 selon l'axe x du repère tournant. L'application de ce champ magnétique tournant va avoir pour conséquence une mise en rotation, de pulsation $\omega_1 = -\gamma b_1$, du moment magnétique nucléaire autour de l'axe x du repère tournant. La durée d'application de ce champ variable est calculée de façon à avoir une rotation de $\frac{\pi}{2}$. A l'issu de la rotation le moment magnétique nucléaire va être dans une nouvelle position. Les composantes selon les axes y et z vont avoir subit une rotation de $\frac{\pi}{2}$, la composante selon x ne va pas avoir subi de modification. Si l'on considère l'état de l'aimantation juste avant (à t^-) et juste après (à t^+) l'impulsion on peut écrire :

$$\left\{\begin{array}{c} \mu_x(t^-) \\ \mu_y(t^-) \\ \mu_z(t^-) \end{array}\right. \xrightarrow{\text{impulsion } \frac{\pi}{2}} \left\{\begin{array}{c} \mu_x(t^+) = \mu_x(t^-) \\ \mu_y(t^+) = \mu_z(t^-) \\ \mu_z(t^+) = -\mu_y(t^-) \end{array}\right.$$

Le moment magnétique se retrouve alors dans une configuration instable, la configuration la plus stable étant l'état décrit juste avant. Après application du champ radiofréquence b_1 le moment magnétique va retourner dans sa position d'origine qui correspond à se position de moindre énergie.

Cas d'un ensemble de noyaux en présence d'un champ magnétique homogène

Un ensemble de noyau en présence d'un champ magnétique homogène s'appelle un isochromat de spins. En pratique nous observons le signal provenant de nombreux moments magnétiques, ainsi c'est la variation d'aimantation globale qui nous intéresse.

En présence d'un champ magnétique les moments magnétiques nucléaires vont s'orienter selon une direction privilégiée qui est celle de l'axe du champ magnétique appliqué. Les signes des différents moments magnétiques nucléaires sont répartis sur l'axe z selon la statistique de Boltzmann (Eq.1.1). Sur la figure 1.4 j'ai représenté la partie en excès dans une direction des moments magnétiques. Si l'on considère la résultante de l'ensemble des moments magnétiques selon le plan transversal alors, étant donné le grand nombre de moments magnétiques, la résultante va être nulle par effet de moyenne. La résultante de l'ensemble des moments magnétiques va donc être portée par l'axe longitudinal comme indiqué sur le schéma.

Nous allons donc raisonner sur la résultante de l'ensemble des moments magnétiques dans la suite de ce paragraphe. L'acquisition du signal RMN peut grossièrement se décomposer de la façon suivante :

- A l'état de repos, sous la seule action du champ magnétique permanent $\vec{B_0}$, l'aimantation totale de l'échantillon s'aligne avec $\vec{B_0}$;
- Durant la phase d'excitation par le champ tournant, l'aimantation tourne autour du vecteur rotation $\vec{\omega_T}$, où ω_T est la pulsation de travail. Durant cette même phase, l'aimantation bascule aussi autour d'un axe perpen-

diculaire au champ B_0 à la pulsation $\omega_1 = -\gamma b_1$ avec b_1 l'intensité du champ magnétique appliqué selon la direction perpendiculaire à l'axe du champ $\vec{B_0}$;

– Après la phase d'excitation l'aimantation retourne dans sa position de repos. Au cours de cette phase appelée relaxation, l'aimantation admet un mouvement qui est la combinaison de deux rotations dans le repère du laboratoire. Un mouvement de rotation autour de l'axe du champ permanent à la pulsation $\omega_0 = -\gamma B_0$, avec B_0 le champ local et un autre autour d'un axe perpendiculaire à B_0.

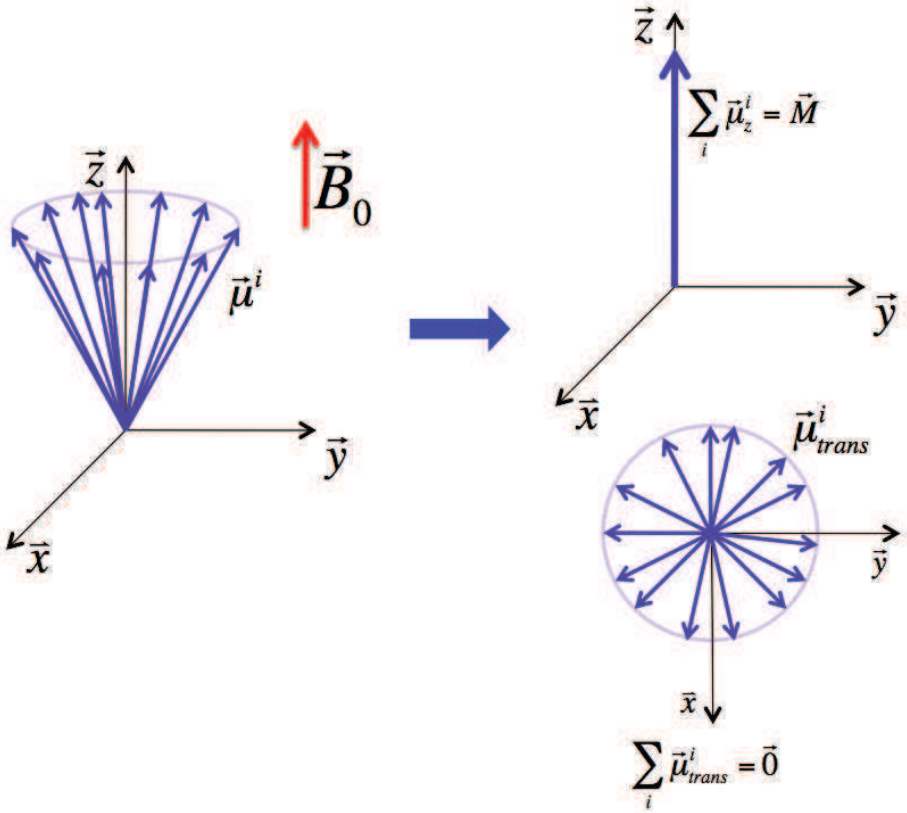


FIGURE 1.4 – Résultante d'un ensemble de moments magnétiques soumis à un champ magnétique permanent. Les moments magnétiques en excès sont tous dispersés sur un cône, il en résulte une composante non nulle selon l'axe longitudinal mais une composante nulle selon le plan transversal du fait du grand nombre de moments magnétiques.

Le signal qui nous intéresse est recueilli au cours de la phase de relaxation autour de la valeur de la pulsation caractéristique ω_T. Les principales informations qui le caractérise sont deux temps caractéristiques T_1 et T_2. Ces deux temps sont appelés respectivement temps de relaxation longitudinal et transversal.

Sur la figure 1.5 sont représentées les évolutions temporelles de la relaxation selon les deux axes, longitudinal et transversal. Si l'on se place dans un repère tournant à la pulsation ω_0 par rapport au repère fixe du laboratoire alors, en première approximation, ces évolutions peuvent êtres décrites par les équations 1.2 et 1.3.

$$M_z(t) = A(1 - exp(-\frac{t}{T_1})) \text{ selon l'axe longitudinal} \tag{1.2}$$

$$M_{x,y}(t) = Aexp(-\frac{t}{T_2})exp\left(i\left(\omega - \omega_T\right)t\right) \text{ selon l'axe transversal} \tag{1.3}$$

Le terme $\omega - \omega_0$ est égal à $-(\gamma B - \gamma B_0) = -\gamma B_\Delta$ avec B_Δ la valeur de l'écart entre le champ local B et le champ permanent B_0. En se plaçant dans un tel repère on s'intéresse à la valeur de l'écart au champ et non pas au champ lui-même.

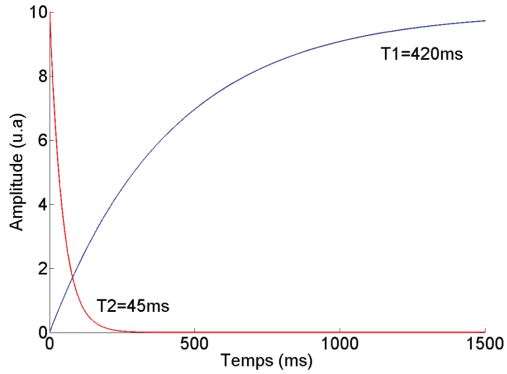


FIGURE 1.5 – En bleu évolution de l'aimantation selon la direction longitudinale, en rouge évolution de l'aimantation selon la direction transversale, dans le repère tournant. On a tracé ici le cas particulier où l'on a $\omega = \omega_T$ dans les équations 1.2 et 1.3

1.1.6 Notion de T_2^*

Je viens d'aborder la notion des temps caractéristiques, T_1 et T_2, du phénomène de résonance magnétique nucléaire. Il existe un troisième temps caractéristique appelé T_2^*, ce temps est à associer à un système réel dans lequel il n'est pas possible d'avoir un champ magnétique parfaitement homogène.

Cas d'un ensemble d'isochromats

On parle d'isochromat pour un ensemble de noyaux qui sont en présence d'un champ magnétique de même intensité et même direction. Étant plongés dans un même champ, les spins de ces atomes vont précesser à la même pulsation.

Si l'on s'intéresse maintenant à un champ qui n'est pas homogène, il est possible de distinguer plusieurs isochromats au sein d'une même zone d'acquisition. Sur la figure 1.6 on a représenté une zone dans laquelle le champ n'est pas homogène. A titre d'exemple cette zone est divisée en quatre parties de tailles égales et le champ prend des valeurs allant de $9{,}4T$ à $9{,}4 + 3.10^{-6}T$ par pas de $10^{-6}T$. Sur la figure 1.7 on a représenté les évolutions temporelles de

l'amplitude (A) et de la phase du signal (B) pour les 4 zones. Ces évolutions ont été calculées à partir de la formule 1.3 avec $T_2 = 22ms$. On a également représenté l'amplitude du signal provenant de l'ensemble du volume qui est égale à la norme de la somme des signaux provenant des 4 zones. On remarque que les amplitudes des signaux provenant des 4 zones sont égales, mais que les phases sont différentes au cours du temps. La sommation des signaux étant vectorielle, et ne possédant pas la même phase à tout moment, on aboutit à une amplitude du signal du voxel qui ne correspond pas à la somme des amplitudes des signaux des 4 domaines. Le signal obtenu est approximativement décrit par une exponentielle décroissante. A partir de cette approximation on peut calculer un temps de décroissance associé au signal. On trouve un temps caractéristique de 13 ms, celui-ci est plus court que le temps T_2 attribué aux différentes zones. Ce nouveau temps est classiquement nommé T_2^*.

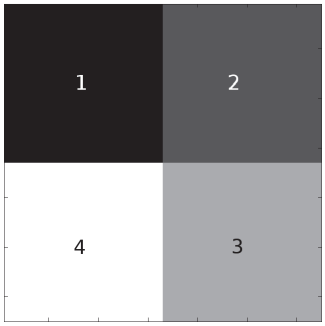


FIGURE 1.6 – Représentation d'un voxel pour lequel le champ magnétique n'est pas homogène. Les valeurs de l'écart au champ $B_0 = 9{,}4T$ pour les zones 1 à 4 est respectivement de 0, 1.10^{-6}, 2.10^{-6} et 3.10^{-6}

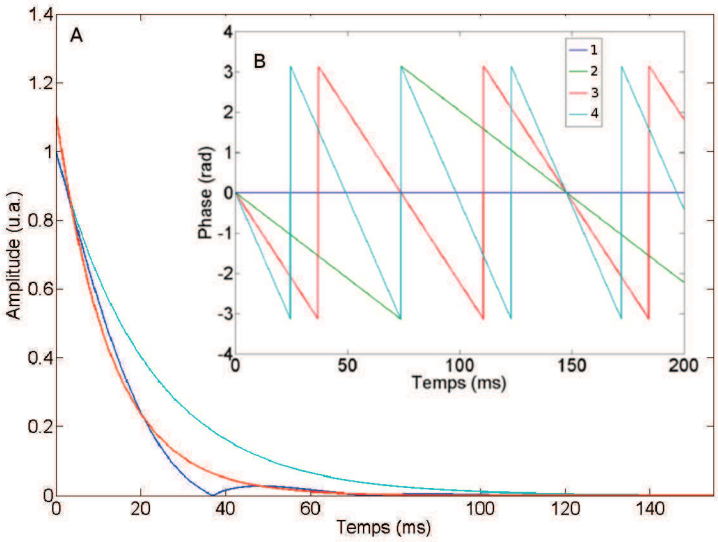


FIGURE 1.7 – A) En turquoise, évolution de l'amplitude pour les 4 zones considérées séparément, $T_2 = 22ms$; En bleu, évolution de l'amplitude du signal obtenue à partir de l'ensemble du voxel (signal normé à 1) ; En rouge, approximation exponentielle faite sur la courbe bleue, $T_2^* = 13ms$.B) Evolution de la phase pour les différentes zones du voxel

Le phénomène de résonance magnétique nucléaire se caractérise donc par une perturbation d'un état d'équilibre et un retour à ce même état. Lors du retour à l'équilibre, en utilisant un détecteur, il va être possible de réceptionner un signal appelé signal de FID (pour Free Induction Decay, signal de précession libre). C'est ce signal qui va porter l'information, que ce soit dans le cadre de l'imagerie ou de la spectroscopie par résonance magnétique. Ce signal acquis dans le domaine temporel, après application d'une transfromée de fourier, donne un spectre. Nous allons voir par la suite comment il est possible d'utiliser ce signal pour faire de l'imagerie ou de la spectroscopie.

1.2 L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

Dans cette partie je vais principalement présenter comment il est possible d'obtenir une information spatiale avec le signal de précession libre obtenu au cours des acquisitions. Je vais également présenter quelques notions parmi les plus répandues en IRM.

1.2.1 Fréquences spatiales et espace fréquentiel

Une notion importante en IRM, et plus généralement en traitement de l'image, est la notion de fréquence spatiale. Afin de comprendre ce qu'est une fréquence spatiale le mieux est de faire le parallèle avec la notion de fréquence temporelle. En effet la fréquence temporelle se définie par le nombre de répétitions d'un évènement ponctuel (par exemple le tac d'un métronome) ou d'un motif continu (par exemple le bruit d'une sirène) par unité de temps (l'unité étant la seconde si l'on exprime la fréquence en Hertz). Ainsi la fréquence spatiale se définie par le nombre de répétition d'un motif, discret ou continu, par unité de distance (le mètre dans le système international). De plus, comme c'est le cas dans le cas d'une fréquence temporelle, il est possible d'associer un espace fréquentiel à toute image. On parle alors d'espace réel pour l'image de départ et d'espace réciproque (aussi appelé espace fréquentiel, de Fourier ou espace k). Je vais présenter ici quelques notions pour comprendre les relations qui existent entre espace réel et espace réciproque.

1.2.1.1 Propriétés de l'espace k

Sur la figure 1.8 nous avons représenté un espace réel ainsi que son espace k associé. On peut noter que pour un espace réel de dimension $N_x \times N_y$ l'espace réciproque associé est de dimension $N_x \times N_y$. Les relations liant les différents paramètres présentés sur la figure 1.8 sont les suivantes :

$$\begin{cases} \Delta\vec{k}_x = & \frac{1}{N_x \Delta\vec{x}} \\ \Delta\vec{k}_y = & \frac{1}{N_y \Delta\vec{y}} \end{cases}$$

$$\begin{cases} \vec{k}_x = & \frac{1}{\vec{x}} \\ \vec{k}_y = & \frac{1}{\vec{y}} \end{cases}$$

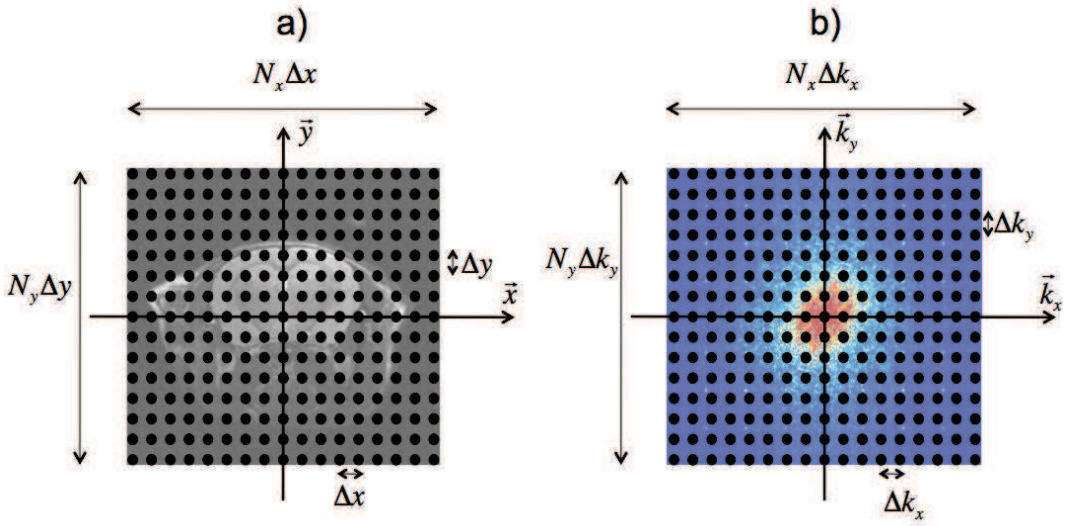


FIGURE 1.8 – Schéma illustrant les liens existants entre l'espace réel et l'espace k. En **a)** espace réel comportant $N_x \times N_y$ points, en **b)** espace k associé comportant également $N_x \times N_y$ points, le signal rouge représente le signal le plus intense.

On peut voir avec ces équations qu'il existe une relation inversement proportionnelle entre les deux espaces, réel et réciproque. C'est cette relation qui est illustrée sur la figure 1.9 qui permet de présenter quelques propriétés de l'espace k. Sur cette figure j'ai représenté 3 images avec leurs espaces k associés. Les images réelles (Fig.1.9 a, b et c) présentent des variations spatiales régulières qui sont répétées de façon de plus en plus espacées, cela constitue notre motif de base. Ces variations spatiales se font selon un axe horizontal. Si l'on observe les espaces k associés (Fig.1.9 d, e et f) on peut voir qu'ils comportent tous 3 deux points qui se répartissent à équidistance du centre de l'espace k selon une droite horizontale. Nous allons expliquer ces deux points.

Si l'on considère une image à 2 dimensions avec un repère cartésien associé, il est possible de parcourir l'image selon un sens positif ou négatif. Ainsi il est possible de rencontrer des valeurs de fréquences négatives dans l'espace k, contrairement à un espace fréquentiel associé à un espace temporel [1]. Le fait de pouvoir parcourir cet espace selon une même direction dans deux sens opposés en observant les mêmes variations de signal nous indique que l'espace k est en fait un espace qui présente une symétrie centrale, c'est la raison pour laquelle les espaces réciproques comportent 2 points qui sont diamétralement opposés.

Sachant que l'espace k est en fait un espace symétrique on peut se contenter d'observer la moitié de l'espace. Le point que comporte la moitié droite de l'espace k forme une droite horizontale avec le centre de l'espace. Cela indique une variation qui dépend de la position selon l'axe horizontal de l'image réelle.

1. on ne peut pas remonter le temps mais l'on peut parcourir une image dans les deux sens

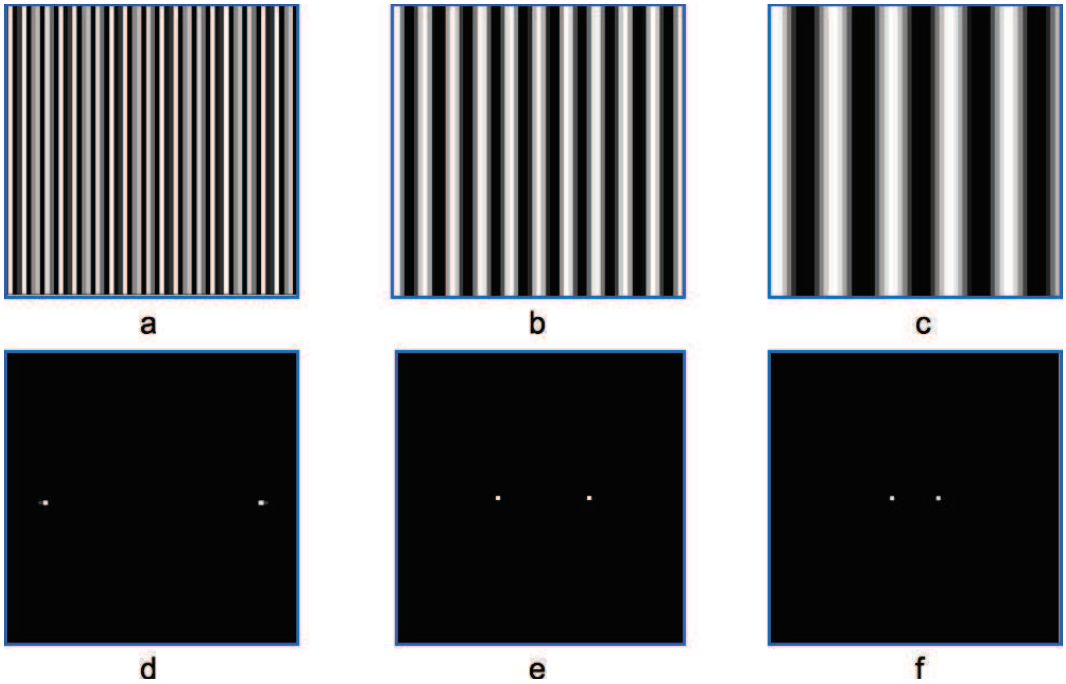


FIGURE 1.9 – Images représentants des motifs réguliers variant selon l'axe horizontal (a, b et c) et leurs espaces k associés (d, e, f).

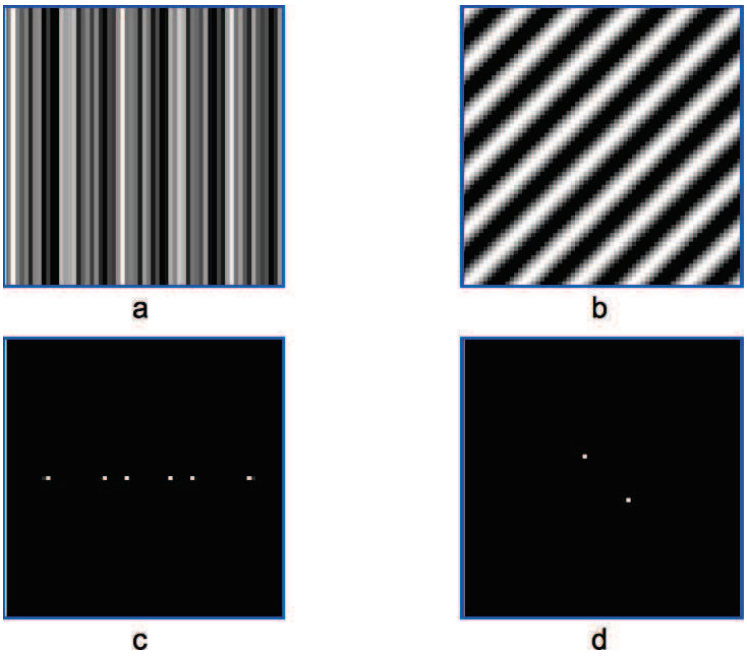


FIGURE 1.10 – Images représentants des motifs réguliers variant selon l'axe horizontal (a, b) et leurs espaces k associés (c, d).

C'est en effet ce que l'on observe sur les images a, b et c de la figure 1.9. Sur la figure 1.10 b) et d) on peut voir que cette notion de directionalité se retrouve dans le cas de motifs qui font un angle de $\frac{\pi}{4}$ avec l'horizontal.

Un autre point important à commenter est la distance par rapport au centre de l'espace k. J'ai dit plus haut qu'il existe une relation inversement proportionnelle entre l'espace k et l'espace réel, ainsi plus la taille du motif de base est faible et plus la fréquence spatiale associée dans l'espace k est élevée [2].

Sur la figure 1.10 a) et c) une propriété supplémentaire est illustrée. L'image en a) est en fait la superposition des images a), b) et c) de la figure 1.9, ainsi sur l'image c) on retrouve la superposition des espaces k associés à ces mêmes images.

On peut ici récapituler les points que nous venons de voir :

- l'espace k est un espace qui comporte une symétrie centrale ;
- plus on s'éloigne du centre de l'espace k plus les fréquences sont associées à des motifs qui se répètent à courtes distances (fréquences spatiales élevées) ;
- la direction passant par un point de l'espace k et le centre de cet espace indique le sens d'évolution du motif ;
- si une image résulte de la superposition de deux images alors l'espace fréquentiel associée à cette image sera la superposition des espaces k.

Afin de conclure sur la notion de fréquence spatiale je pense qu'il est bien de présenter l'image présente sur la figure 1.11.a qui est une coupe axiale d'un cerveau de souris. Sur la figure 1.11.b on peut voir que la répartition des données dans l'espace k est la suivante : au centre on retrouve la valeur moyenne du signal qui est associée à la fréquence nulle de l'image. Plus la distance au centre, en module, est grande et plus les fréquences associées sont élevées. De façon générale la majeure partie de l'information est concentrée au centre de l'espace k. En effet on peut se rendre compte que 1/64 de la surface de l'espace k (Fig.1.11.e) regroupe la plus grande partie de l'information visuelle (Fig.1.11.g), alors que le reste de l'espace k (Fig.1.11.f) comporte l'information concernant les contours de l'image (Fig.1.11.h). Le point important à retenir ici est que l'ensemble des données de l'espace k a son importance, que ce soit le centre, pour l'information globale, ou bien les bords, pour les détails de l'image.

1.2.2 Le codage de l'espace

Lorsque l'on acquiert le signal en IRM les données sont recueillies dans l'espace k. Si l'on prend l'exemple d'une acquisition de type $2D$ on souhaite pouvoir obtenir l'information provenant d'une tranche bien déterminée, ainsi il va être nécessaire dans un premier temps de sélectionner un volume d'intérêt, une tranche dans ce cas là, avant de réaliser l'obtention du signal.

2. On retrouve une nouvelle fois le parallèle évident avec la notion de fréquence temporelle, fréquence qui est d'autant plus élevée que l'événement se répète vite.

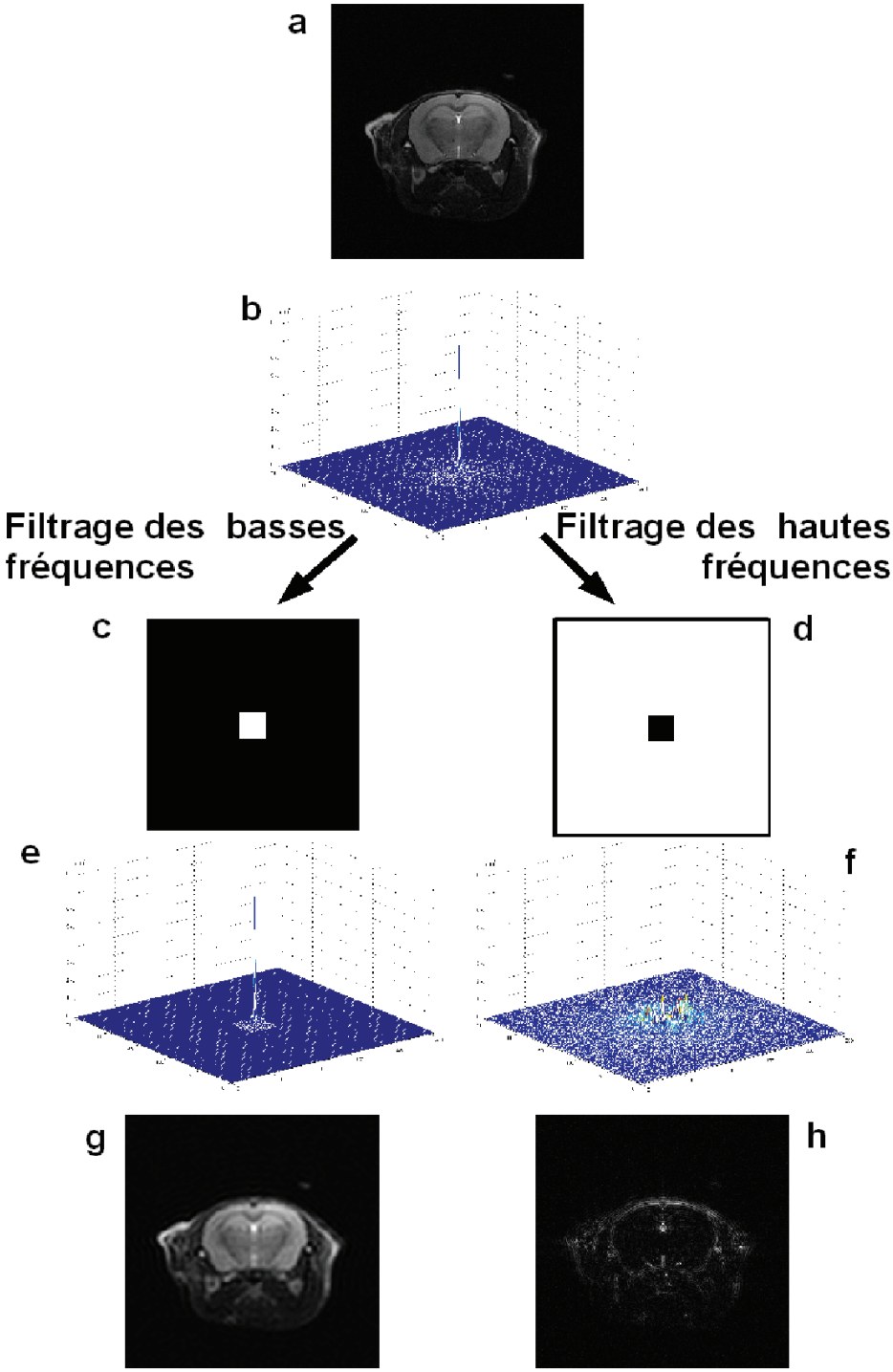


FIGURE 1.11 – a)Image IRM d'une coupe de cerveau de souris ; b)Plan de Fourier associé à l'image (a)(échelle $\times 1$) ; c)Filtre utilisé pour obtenir les basses fréquences spatiales ; d)Filtre utilisé pour obtenir les hautes fréquences spatiales ; e)Partie basse fréquence du plan de Fourier (échelle $\times 1$) ; f)Partie haute fréquence du plan de Fourier (échelle $\times 10$) ; g)Représentation de la partie basse fréquence de l'image (a) de départ dans l'espace réel ; h)Représentation de la partie haute fréquence de l'image (a) dans l'espace réel.

Afin de pouvoir coder l'information en IRM des gradients de champ magnétique sont utilisés. Ces gradients, présents au nombre de 3, pour les trois directions de l'espace x, y et z, sont de types linéaires. Ces gradients, lorsqu'ils sont activés, ajoutent au champ magnétique $\vec{B_0}$ un terme dépendant de la position, ainsi on a un champ magnétique qui peut s'écrire $\vec{B}(x,y,z) = \vec{B_0} + \Delta\vec{B}(x,y,z) = \vec{B_0} + (G_x.x)\vec{x} + (G_y.y)\vec{y} + (G_z.z)\vec{z}$ avec $\vec{x}$, $\vec{y}$ et $\vec{z}$ les vecteurs unitaires selon les trois axes et G_x, G_y et G_z les trois valeurs de gradients selon les trois directions de l'espace.

1.2.2.1 Notion d'impulsion spatialement sélective

Que ce soit en IRM ou en SRM la notion d'impulsion sélective est très importante. En effet contrairement à la spectroscopie RMN, qui s'intéresse souvent au signal provenant de l'ensemble de la zone de détection de la sonde utilisée (cette sonde étant pour la plupart du temps adaptée à l'échantillon étudié), en IRM ou SRM le signal qui nous intéresse provient d'un volume bien précis, telle qu'une tranche ou un voxel.

Impulsion d'excitation spatialement sélective

Afin d'expliquer comment une impulsion peut être spatialement sélective je vais m'appuyer sur l'exemple d'une impulsion carrée de largeur τ modulée par une porteuse de fréquence f_0 (cf. Fig.1.12). La transformée de Fourier d'une impulsion carrée est un sinus cardinal dont la distance entre les deux points d'annulation centraux sont distant de $\frac{2}{\tau}$. Cette bande de fréquence va correspondre à une bande de fréquence à mettre en lien avec la valeur des gradients imposés sur l'échantillon.

En effet pour un gradient G_z imposé selon l'axe on va avoir un plan de l'espace, en z_0 qui va correspondre à la valeur f_0 tel que l'on ait :

$$f(x,y,z_0) = f_0 = -\frac{\gamma}{2\pi}(B_0 + G_z.z_0)$$

Ainsi la zone qui va être excitée va être définie comme étant la zone centrée en z_0, perpendiculaire à l'axe $\vec{z}$. Cette zone va être excitée selon le profil d'excitation qui correspond à la transformée de fourier de l'impulsion carrée définie plus haut.

En général les impulsions utilisées pour sélectionner une tranche ne sont pas carrées. On utilise des impulsions qui sont plutôt des sinus cardinaux ou des hermitiennes tronquées, qui ont des transformées de Fourier qui se rapprochent plus d'un signal carré. Ce sont des d'impulsions qui permettent d'obtenir une excitation mieux localisée dans l'espace et *in fine* un signal qui l'est lui aussi.

1.2.2.2 Gradient de sélection de tranche

En imagerie il est possible de définir plusieurs types d'orientation pour les coupes. Les 3 orientations les plus communes sont les orientations coronale,

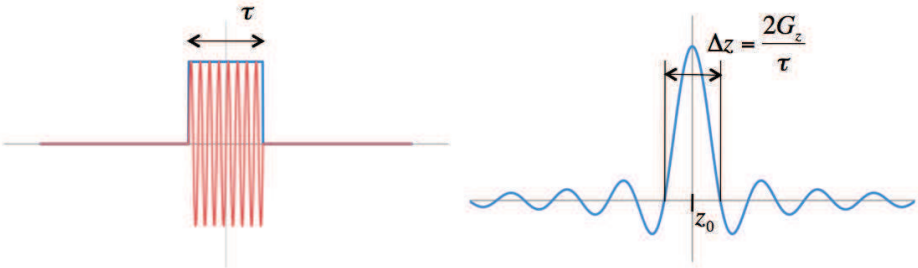


FIGURE 1.12 – A gauche on retrouve une impulsion d'excitation de type porte de largeur τ (en bleue) modulée par une porteuse de fréquence f_0 en rouge. Le profil d'excitation obtenue en utilisant une telle impulsion va être du type sinus cardinal (à droite). La speudo-période du profil associé à ce sinus cardinal dépend de la largeur de la porte utilisée. La position centrale de l'excitation (z_0) dépend de la fréquence de modulation (f_0).

sagittale et axiale (Fig. 1.13) Pour certains types d'acquisitions il est possible de réaliser des coupes dites obliques.

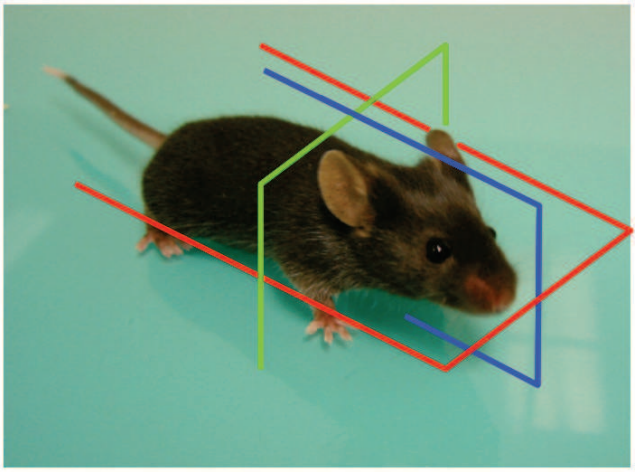


FIGURE 1.13 – Schéma montrant les trois orientations les plus communes en imagerie par résonance magnétique. En vert plan de coupe pour une coupe axiale, en rouge, plan pour une coupe de type coronale, en bleu plan pour une coupe de type sagittale.

Lorsque l'on impose un gradient sur l'un des axes par exemple z on va alors avoir une dépendance de $\vec{B}$, le champ magnétique local, avec z. Afin d'imager une coupe perpendiculaire à l'axe z en position z_0 il suffit de travailler autour de la fréquence associée à la position z_0 qui est $\frac{\gamma B(z_0)}{2\pi}$. Concrètement lorsque l'on va appliquer le gradient de sélection de coupe il va falloir appliquer une onde radiofréquence spatialement sélective afin d'exciter la coupe désirée. Les

figures 1.12 et 1.14 illustre la sélection de coupe par l'application d'un gradient et d'une impulsion sélective.

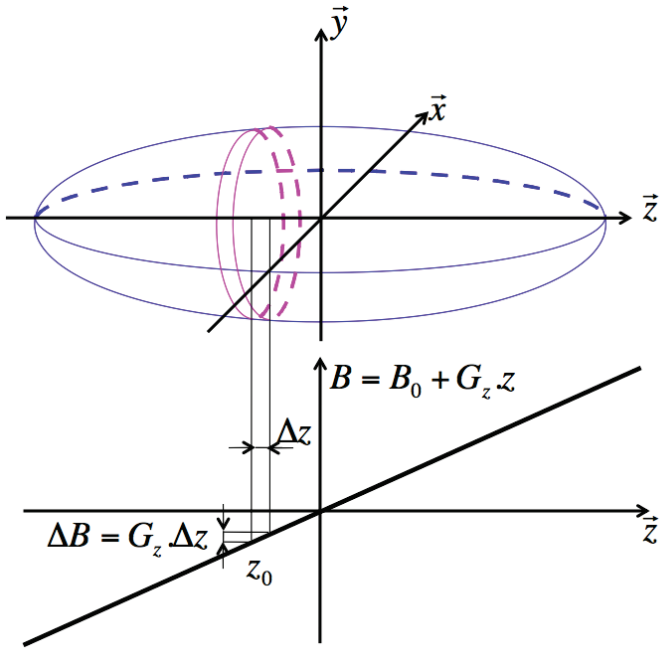


FIGURE 1.14 – Exemple de sélection de coupe dans un plan perpendiculaire à l'axe $\vec{z}$. On a représenté le cas d'un gradient égale à G_z dans la direction $\vec{z}$ avec une épaisseur de coupe Δz autour de la fréquence z_0. Cette sélection va pouvoir se faire si le gradient est combiné avec une impulsion radiofréquence sélective.

1.2.2.3 L'espace k et le codage de l'information

En IRM l'acquisition du signal se fait dans l'espace des fréquences. Il est possible de passer de l'espace k à l'espace réel par une opération appelée transformée de Fourier à 2 dimensions. Le signal obtenu étant de la forme $S(\vec{k_x}, \vec{k_y})$ on va obtenir le signal dans l'espace réel en utilisant la formule de la transformée de Fourier à $2D$ dont l'expression est :

$$S(x,y) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} S(k_x, k_y) e^{i(\omega_x x + \omega_y y)} dk_x dk_y$$

avec ω_x et ω_y, les pulsations associées aux dimensions x et y, exprimées en m^{-1}. Ces pulsations sont à mettre en lien avec les fréquences spatiales puisque l'on a $\omega_x = -\gamma(B_0 + G_x.x) = 2\pi k_x$ et $\omega_y = -\gamma(B_0 + G_y.y) = 2\pi k_y$

En IRM les signaux recueillis sont de types numériques, et donc sont codés sur un nombre de valeurs fini. L'espace fréquentiel associé est donc également de dimension finie. Pour une image de dimension $m \times n$ on aura une espace fréquentiel associé de dimension $m \times n$.

L'expression de la transformée de Fourier dans le cas de signaux numériques de taille $m \times n$ se fait sous la forme suivante :

$$S(x,y) = \sum_{k_x=-\infty}^{+\infty} \sum_{k_y=-\infty}^{+\infty} S(k_x, k_y) e^{i(\omega_x x + \omega_y y)} dk_x dk_y$$

qui peut se simplifier sous la forme suivante, les autres termes étant nuls :

$$S(x,y) = \sum_{k_x=-\frac{m}{2}+1}^{+\frac{m}{2}} \sum_{k_y=-\frac{n}{2}+1}^{+\frac{n}{2}} S(k_x, k_y) e^{i(\omega_x x + \omega_y y)} dk_x dk_y$$

Relation entre espace k et gradients

Il existe une relation entre les intensités de gradients appliquées et le déplacement associé dans l'espace k. Les intensités de gradients de champ magnétique peuvent être exprimées en $Hz.m^{-1}$, ces gradients sont appliqués durant une durée déterminée. Si l'on calcule l'intégrale du gradient appliqué durant cette période on trouve donc une valeur en m^{-1} qui a la dimension d'une fréquence spatiale et qui correspond à un déplacement dans l'espace k. Ainsi un gradient d'intensité G appliqué dans la direction x durant une durée Δt va créer un déplacement dans l'espace k d'une valeur $G.\Delta t$ selon l'axe $\vec{k_x}$.

Codage de phase

Avant l'acquisition du signal on applique un gradient de champ, appelé gradient de codage de phase, sur l'axe y. Le fait d'ajouter un terme au champ magnétique va créer une variation de la fréquence de précession selon y. Lorsque l'on coupe le gradient de codage de phase le champ magnétique revient à sa valeur initiale, $B(z_0)$ mais les différents point de l'espace réel ne possèdent plus la même phase. En effet le fait d'avoir appliqué un gradient de champ durant une durée limitée à créé un déphasage entre les différents points de l'espace réel (Fig. 1.15.b).

L'intensité du gradient de phase appliqué est liée à la position sur l'axe k_y. En faisant varier le gradient de phase à chaque répétitions de la séquence on va pouvoir se déplacer dans l'espace fréquentiel.

Codage en fréquence

Pendant la séquence, en parallèle de l'acquisition du signal on applique un gradient selon l'axe x appelé gradient de fréquence ou gradient de lecture. Ce gradient doit être appliqué durant toute la durée de la lecture afin que la fréquence des différents noyaux reste la même en une même position de l'espace (Fig. 1.15.c) et d)). L'application du gradient de fréquence durant l'acquisition a pour conséquence un balayage selon l'axe k_x de l'espace k. Ainsi au cours d'une acquisition nous allons pouvoir acquérir le signal de toute une ligne de l'espace k.

Le codage réalisé en fréquence et en phase permet de « signer » le signal qui va être acquis. Cette signature va permettre de situer le signal dans l'espace k, et ainsi de reconstituer l'ensemble de l'espace k à partir de plusieurs acquisitions.

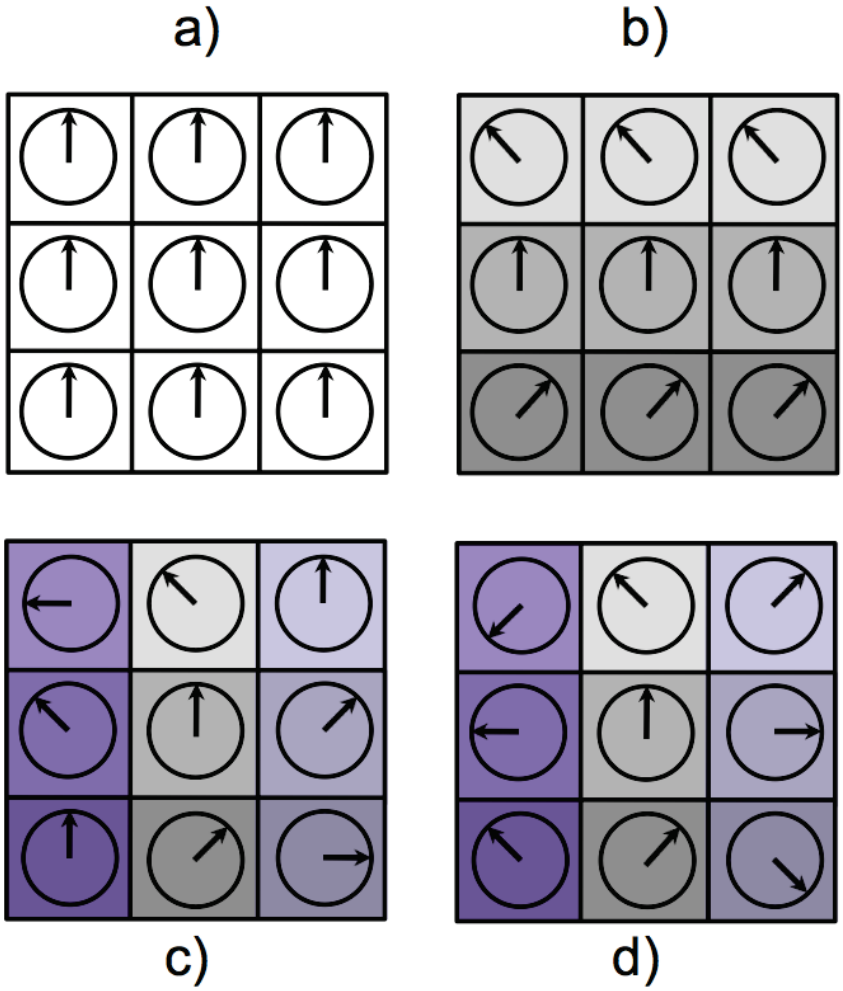


FIGURE 1.15 – **a)** Etat initial des phases dans une tranche sélectionnée par le gradient de sélection de tranche. On a divisé la tranche en une matrice de taille 3×3. Le champ étant constant dans l'ensemble de la tranche, toutes les phases sont égales. On considère que l'on a un champ de référence qui est homogène. Durant la première phase de l'acquisition les différentes parties de la matrice oscillent à la même fréquence. **b)** Etat des phases après l'application du gradient de phase. Le gradient à été appliqué durant une durée fixe, les signaux ont donc acquis un déphasage entre eux qui va rester constant tant qu'aucun autre gradient n'est appliqué. Durant l'application du gradient de phases les différentes parties de la matrice ne possèdent pas toutes la même fréquence. Après extinction de ce gradient l'ensemble des moments magnétiques oscillent à la fréquence initiale. **c)** Etat des phases à l'intant t_1 durant l'application du gradient de fréquence **d)** Etat des phases dans la tranche à un instant t_2 alors que le gradient de fréquence est toujours appliqué. Les différentes zones n'ont pas la même fréquence de rotation, le déphasage s'accroit entre les différentes zones de la matrice.

1.2.3 Séquences de base en IRM

1.2.3.1 Séquence en IRM et parcours de l'espace k

Comme il a été présenté plus haut une acquisition d'IRM consiste en l'acquisition des données dans l'espace réciproque. Pour cela on utilise les différents gradients. On va avoir le codage en phase qui va permettre de se déplacer dans une direction et le codage en fréquence qui va permettre de se déplacer dans la direction perpendiculaire.

Dans les paragraphes suivants nous allons présenter deux séquences de base en IRM, à chacune de ces séquences nous allons associer un diagramme séquentiel présentant les différentes impulsions et gradients utilisés ainsi qu'un schéma présentant le parcours décrit dans l'espace k au cours de l'acquisition.

1.2.3.2 Séquence écho de gradient

La séquence d'écho de gradient est une séquence d'imagerie très simple qui consiste en une unique impulsion radiofréquence. Cette impulsion doit être d'angle inférieur ou égal à 90° (le plus souvent elle y est très inférieure). Lors de l'application de l'impulsion le signal bascule d'un angle α et relaxe ensuite vers sa position d'équilibre. On va alors observer la décroissance du signal selon l'axe transversal. Le fait d'avoir une impulsion en générale inférieure à 90° fait qu'il reste une aimantation résiduelle selon $\vec{z}$ ainsi le retour à l'équilibre se fait plus rapidement. Cela permet de diminuer le temps de répétition de façon importante, c'est d'ailleurs l'intérêt principal de cette séquence qui permet de réaliser des images de façon très rapide. A chaque répétition on acquiert une ligne de l'espace k.

Sur les figures 1.16 et 1.17 j'ai représenté la séquence ainsi que les déplacements associés dans l'espace k.

Sur la figure 1.16 on peut remarquer que le gradient de sélection de coupe est appliqué simultanément avec l'impulsion radiofréquence. L'acquisition du signal se fait autour de $t = T_E$ simultanément avec l'application du gradient de codage en fréquence. Auparavant il y a application simultanée du gradient de codage de phase, d'un gradient de codage en fréquence et d'un gradient de rephasage selon la direction de la sélection de coupe. Le gradient de codage de phase est un gradient incrémentable et va donc prendre des valeurs différentes à chaque T_R, chaque valeur d'incrément va impliquer un déplacement différent dans l'espace k. Les aires des deux gradients de codage en fréquences ont un rapport de 2. Ce rapport est important à respecter car il permet d'obtenir un écho de gradient qui soit phasé lors de l'acquisition.

Sur la figure 1.17 j'ai représenté le parcours de l'espace k durant une séquence d'écho de gradient. On peut voir en rose le parcours effectué lors de l'application simultanée du gradient de codage de phase et du gradient négatif de codage en fréquence. En rouge le parcours effectué lors de l'application du gradient de codage en fréquence (positif), ou gradient de lecture. Ce gradient est appliqué lors de l'acquisition, l'information est obtenue pour l'ensemble des

points de l'espace k qui sont balayés durant cette phase. A l'issue d'un T_R le signal pour une ligne est donc acquis. On effectue la même opération autant de fois que nécessaire pour remplir tout l'espace, c'est à dire autant de fois qu'il y a de lignes dans l'espace k.

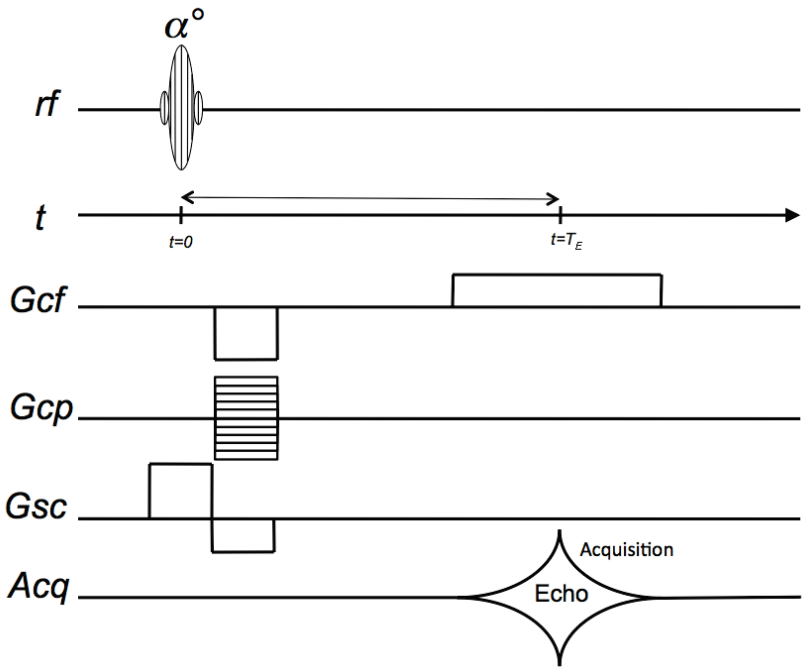


FIGURE 1.16 – Diagramme de la séquence écho de gradient.

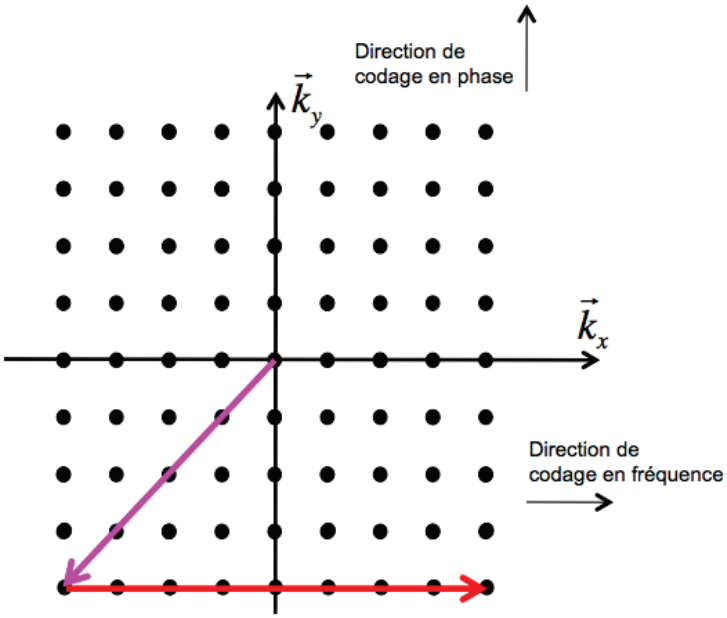


FIGURE 1.17 – Parcours de l'espace k durant une répétition de la séquence écho de gradient décrite sur la figure 1.16.

1.2.3.3 Séquence écho de spin

La séquence d'écho de spin est une séquence d'imagerie composée de 2 impulsions comme représenté sur la figure 1.18 [27]. Idéalement la première impulsion est une impulsion d'un angle de 90°, dans le cas réel les inhomogénéités du champ B_1 font que l'impulsion n'est pas uniforme dans toute la zone d'observation, la deuxième impulsion est de 180°. La deuxième impulsion est appliquée à un temps $\frac{T_E}{2}$ après la première impulsion et l'acquisition du signal se fait au temps T_E. On acquiert alors le signal d'écho de spin qui est un signal rephasé. On répète cet enchainement à intervalle régulier (définie par le T_R), on acquiert à chaque fois une ligne de l'espace k. Cette séquence permet d'avoir accès à un signal pondéré en T_2, T_1 ou en densité de proton (cf. 1.2.4). Afin d'avoir accès aux différentes pondérations il faut faire varier les paramètres T_E et T_R. La différence principale entre l'écho de gradient et l'écho de spin est que l'écho de gradient permet de refocaliser les gradients imposés alors que l'écho de spin permet de refocaliser tout les gradients, imposés et naturels.

Sur la figure 1.18 on peut voir que les gradients de sélection de coupe sont appliqués simultanément avec les impulsions radiofréquences qui sont toutes deux des impulsions sélectives. Le gradient appliqué juste après l'impulsion à 90° sert à rephaser selon la direction de la sélection de coupe. Il n'est pas nécessaire d'appliquer un tel gradient après l'impulsion de 180° car elle est auto-refocalisante.

Sur la figure 1.20 est décrit le mécanisme qui permet de refocaliser les différents isochromats et ainsi avoir accès à un signal évoluant en T_2 et non pas

en T_2^*. Les impulsions sont appliquées à un intervalle de temps $\frac{T_E}{2}$, l'acquisition du signal se fait autour de $t = T_E$ simultanément avec l'application du gradient de codage en fréquence. Auparavant, entre les deux impulsions, un gradient a été appliqué selon la direction de codage en fréquence afin de pouvoir obtenir un signal centré au moment de l'acquisition. Le gradient de codage en phase, qui va être variable en fonction de l'incrément, est également appliqué entre les deux impulsions radiofréquences. Les aires des deux gradients de codage en fréquences ont un rapport de 2. De même les 3 gradients de sélection de coupe ont des aires relative de 2, 1 et 2. Ces conditions sont nécessaire afin d'obtenir un écho qui soit phasé lors de l'acquisition.

Sur la figure 1.19 j'ai représenté en rose le parcours effectué lors de l'application simultanée du gradient de codage de phase et du gradient de codage en fréquence. En orange : lors de l'application de l'impulsion à 180 ° le déplacement associé dans l'espace k est une symétrie centrale par rapport au centre de l'espace. En rouge le parcours effectué lors de l'application du gradient de codage en fréquence, ou gradient de lecture. Ce gradient est appliqué lors de l'acquisition, l'information est obtenu pour l'ensemble des points de l'espace k qui sont balayés durant cette phase. A l'issue d'un T_R le signal pour une ligne est donc acquis. On effectue la même opération autant de fois que nécessaire pour remplir tout l'espace, c'est à dire autant de fois qu'il y a de lignes dans l'espace k.

Tout d'abord l'impulsion à 90° permet de faire basculer l'aimantation globale selon l'axe $\vec{x}$ (Fig.1.20.A). Après l'application de l'impulsion à 90° les différents isochromates vont se comporter de façons différentes. En effet il ne vont pas tous êtres soumis au même champ magnétique local, ainsi il ne vont pas précesser à la même vitesse, certains vont acquérir du retard et d'autre de l'avance (Fig.1.20.B).

A l'instant $\frac{T_E}{2}$ la deuxième impulsion appliquée selon l'axe $\vec{x}$ permet de faire basculer la composante transversale des moments magnétiques (Fig.1.20.C). Ainsi on se retrouve dans la configuration décrite sur la figure 1.20.D), les résultantes des différents isochromates qui étaient en retard de phase ont maintenant une avance de phase, inversement, les résultantes qui étaient en avance de phase ont maintenant du retard. Ensuite la relaxation va s'effectuer comme avant. Les isochromats vont évoluer à la même vitesse que précédemment.

Le fait de faire l'acquisition à l'instant $t = T_E$ permet en fait d'obtenir le signal alors que l'ensemble des résultantes des différents isochromates ont la même phase (Fig.1.20.E). Il est important de noter que lorsque l'on parle d'une séquence d'écho de spin en imagerie, la séquence est en réalité également une séquence d'écho de gradient puisque qu'il y a refocalisation des gradients à l'écho.

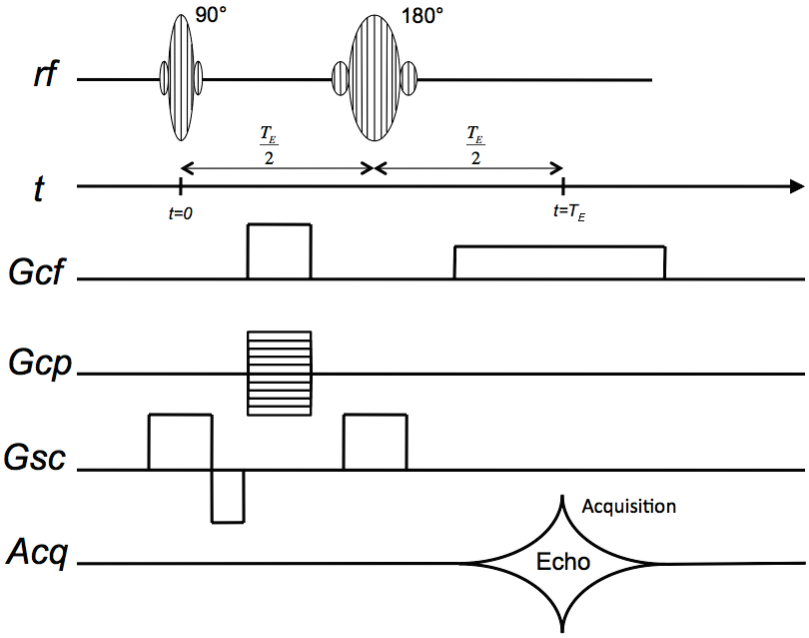


FIGURE 1.18 – Diagramme de la séquence écho de spin.

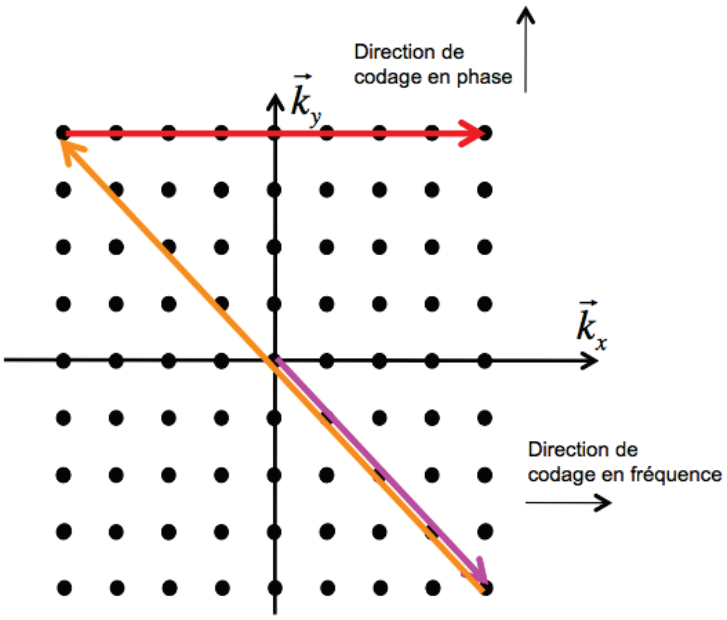


FIGURE 1.19 – Parcours de l'espace k durant une répétition de la séquence écho de spin décrite sur la figure 1.18.

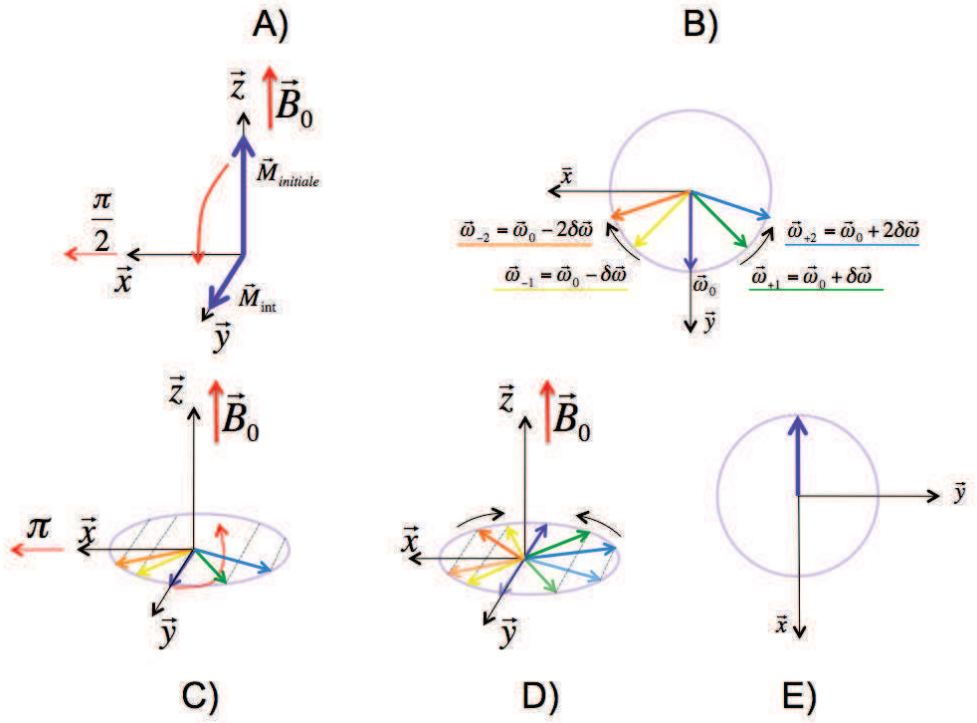


FIGURE 1.20 – Résumé des différentes étapes d'une séquences d'écho de spin. A) : Aimantation globale d'un échantillon soumis à une impulsion de 90°. B) : Evolution des phases de différents isochromats qui sont soumis à des champs locaux différents. Les phases n'évoluent pas toutes de la même façon. C) et D) : Impulsion de 180° appliqué à l'instant $t = \frac{T_E}{2}$ qui permet de faire basculer les moments magnétiques autour de l'axe $\vec{x}$. E) : Etat des phases de l'ensemble des isochromats à l'instant $t = T_E$.

1.2.4 Contraste

En imagerie il est possible de définir différents contrastes. On va ainsi parler de contraste T_1 lorsque la différence de signal entre les tissus est représentative de différences entre les valeurs de T_1.

Le fait de pouvoir procéder à des acquisitions possédant différentes pondération est très utile. En effet certaines structures/organes ne sont pas distinguables avec un type de pondération mais pourront l'être avec un autre. Dans toute cette partie on va s'intéresser à une régime stationnaire, ce régime est atteint au bout de quelque répétitions dans la quasi totalité des cas. C'est d'ailleurs pour cela qu'en pratique plusieurs excitations sont effectuées avant d'acquérir le signal lorsque l'on réalise une acquisition d'imagerie ou de spectroscopie (on parle de « dummy scans »).

1.2.4.1 Contraste obtenu avec une séquence écho de spin

Afin de comprendre comment il est possible avec une même séquence d'obtenir des images avec différents « contrastes » nous allons donner ici les équations qui donne la valeur du signal qui va être recueilli lorsque l'on utilise une séquence d'écho de spin. Dans un premier temps le signal qui nous intéresse évolue selon l'axe longitudinal selon l'équation 1.2 donnée dans la partie 1.1.5. Lorsque l'on fait basculer l'aimantation d'un angle $\frac{\pi}{2}$ la valeur de l'aimantation transférée selon l'axe transversal est de :

$$M_{trans}(T_R) = M_0(1 - e^{-\frac{T_R}{T_1}}) \tag{1.4}$$

Ensuite l'évolution selon l'axe transversal (qui est l'axe selon lequel le signal est recueilli) se fait selon l'équation 1.3 donnée dans la partie 1.1.5, ainsi la valeur du signal au moment de l'écho est donné par l'équation :

$$S_{trans}(T_R + T_E) = M_0(1 - e^{-\frac{T_R}{T_1}})e^{-\frac{T_E}{T_2}} \tag{1.5}$$

Les figures 1.21, 1.22 et 1.23 illustrent les signaux obtenus en fonction de trois combinaisons différentes de T_R et T_E. Ces trois figures permettent d'illustrer les 3 types de pondérations. Chaque graphique représente l'évolution du signal pour deux tissus (l'un en rouge l'autre en bleu).

- Le temps $t = 0$ correspond au temps auquel on fait basculer l'aimantation dans le plan transversal ;
- Sur la première partie des graphiques, entre $t = 0$ et $t = T_R$, j'ai représenté la valeur de l'aimantation suivant l'axe longitudinal (z) car c'est l'évolution de cette grandeur qui va conditionner le signal qui va être observé par la suite ;
- Lorsque $t = T_R$ on applique l'impulsion $\frac{\pi}{2}$ qui va avoir pour conséquence de faire basculer l'aimantation qui se trouvait selon l'axe longitudinal sur le plan transversal ;
- Sur la deuxième partie, après $t = T_R$ on a représenté le signal suivant l'axe transversal, axe selon lequel le signal est acquis [3].
- Le signal est recueilli autour de la valeur $t = T_R + T_E$

Sur la figure 1.21 on peut se rendre compte que le choix d'un T_R court permet d'avoir un basculement des aimantations alors que l'on est encore en phase de croissance du signal selon l'axe longitudinal. Le fait d'avoir un T_E court permet d'avoir accès à un écart entre les deux signaux, selon l'axe transversal, qui est proche de l'écart que l'on pouvait avoir avant T_R selon l'axe longitudinal.

3. En réalité le signal représenté ici n'est pas observable. On a représenté le signal que l'on obtiendrait si l'évolution se faisait en présence d'un champ parfaitement homogène. Par contre le point qui correspond au temps $t = T_E$ correspond bien au signal recueilli lorsque l'on utilise une séquence écho de spin

Le signal caractérise ainsi la différence des deux signaux avant T_R qui est principalement due à une différence de T_1. On a donc une pondération qui reflète un écart entre les valeurs de T_1.

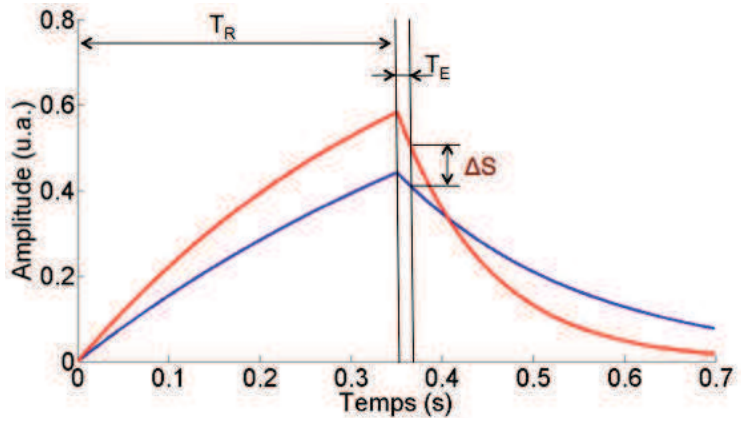


FIGURE 1.21 – Pondération T_1 : Le temps T_R est court par rapport au temps T_1, le paramètre T_E est court par rapport au temps de décroissance T_2. Le signal est recueilli à l'instant $t = T_R + T_E$, ΔS désigne la différence de signal à cet instant.

On peut retrouver cela en utilisant une approche plus mathématique. En reprenant l'équation 1.5 et en considérant 2 tissus caractérisés par les valeurs (T_1^A, T_2^A, ρ^A) et (T_1^B, T_2^B, ρ^B), alors la différence de signal entre ces 2 tissus sera proportionnelle à :

$$C_{A-B} = \rho^A(1 - e^{-\frac{T_R}{T_1^A}})e^{-\frac{T_E}{T_2^A}} - \rho^B(1 - e^{-\frac{T_R}{T_1^B}})e^{-\frac{T_E}{T_2^B}}$$

Si l'on considère des T_R et T_E courts alors on a alors les termes en $e^{-\frac{T_E}{T_2}}$ qui tendent vers 1, ainsi on a :

$$\begin{aligned} C_{A-B} &= \rho^A(1 - e^{-\frac{T_R}{T_1^A}}) - \rho^B(1 - e^{-\frac{T_R}{T_1^B}}) \\ C_{A-B} &= \rho^A - \rho^B + (\rho^B e^{-\frac{T_R}{T_1^B}} - \rho^A e^{-\frac{T_R}{T_1^A}}) \end{aligned}$$

On trouve ainsi que dans cette configuration la différence de signal entre les tissus dépend à la fois de la différence en terme de densité de proton, mais aussi de différences entre les valeurs de T_1. Lorsque l'on considère des tissus aux densités proches, c'est alors le T_1 qui est la variable qui influe la plus sur le contraste.

Sur la figure 1.22 on peut voir que le choix d'un T_R long permet d'atteindre un état quasi stationnaire le long de l'axe longitudinal (z), cet état est ensuite transféré selon l'axe transversal à l'instant T_R, ensuite le signal selon l'axe

transversal décroit en fonction du T_2, ainsi le choix d'un T_E long va permettre d'accentuer les différences si les T_2 sont différents.

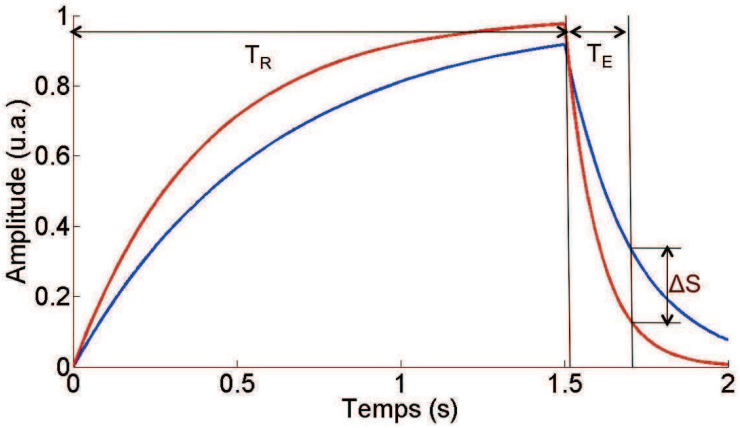


FIGURE 1.22 – Pondération T_2 : Le temps T_R est long par rapport au temps T_1, le paramètre T_E est long par rapport au temps de décroissance T_2. Le signal est recueilli à l'instant $t = T_R + T_E$, ΔS désigne la différence de signal à cet instant.

De même que dans le cas précédent on peut considérer l'écart de signal C_{A-B} entre les deux tissus. Dans le cas où l'on a un T_R long on va avoir les termes en $e^{-\frac{T_1}{T_R}}$ qui vont tendre vers 0, ainsi on va avoir :

$$C_{A-B} = \rho^A e^{-\frac{T_E}{T_2^A}} - \rho^B e^{-\frac{T_E}{T_2^B}}$$

qui dépend de nouveau de la densité de proton, mais aussi, cette fois, de la différence entre les valeurs de T_2 des deux tissus.

Sur la figure 1.23 les signaux diffèrent seulement en terme de densité de proton, les T_1 et T_2 des deux zones étant égaux. Pour réaliser une pondération proton il faut choisir un T_R long devant la valeur de T_1, cela permet d'avoir la quasi totalité de l'aimantation selon l'axe longitudinal. On a alors juste avant T_R une différence de signal qui est due à la différence de densité. Juste après le basculement des protons on retrouve ce signal sur l'axe transversal, ainsi, en réalisant une acquisition rapidement après T_R on acquière un signal qui rend compte de la différence de densité de proton.

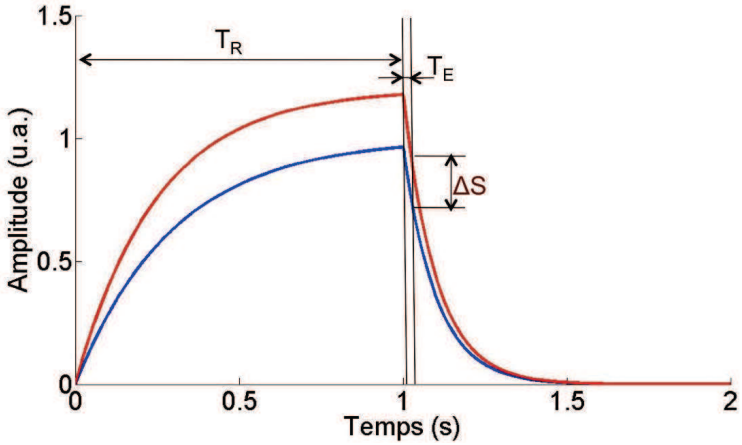


FIGURE 1.23 – Pondération en densité de proton (ρ : Le temps T_R est long par rapport au temps T_1, le paramètre T_E est court par rapport au temps de décroissance T_2. Le signal est recueilli à l'instant $t = T_R + T_E$, ΔS désigne la différence de signal à cet instant.

Si l'on considère l'écart de signal C_{A-B} entre les deux tissus avec un T_1 long et un T_2 court alors on va avoir $(1 - e^{-\frac{T_1}{T_R}}) \to 1$ ainsi que $e^{-\frac{T_E}{T_2}} \to 1$ et donc :

$$C_{A-B} = \rho^A - \rho^B$$

ce qui correspond à une différence due seulement à la densité de proton.

Comme on a pu le voir avec les formules permettant de calculer le contraste entre deux tissus afin de pouvoir dire qu'un signal est exclusivement pondéré en fonction d'un paramètre il est nécessaire de faire des hypothèses. En fait quelque soit le signal recueilli et les paramètres utilisés ont va avoir une mélange de pondération avec tout de même un paramètre de pondération prédominant.

Sur la figure 1.24 nous avons présenté les différentes valeurs de paramètres à utiliser dans le cas d'une séquence écho de spin afin d'obtenir des images pondérées en T_1, T_2 et en densité de protons, notée ρ.

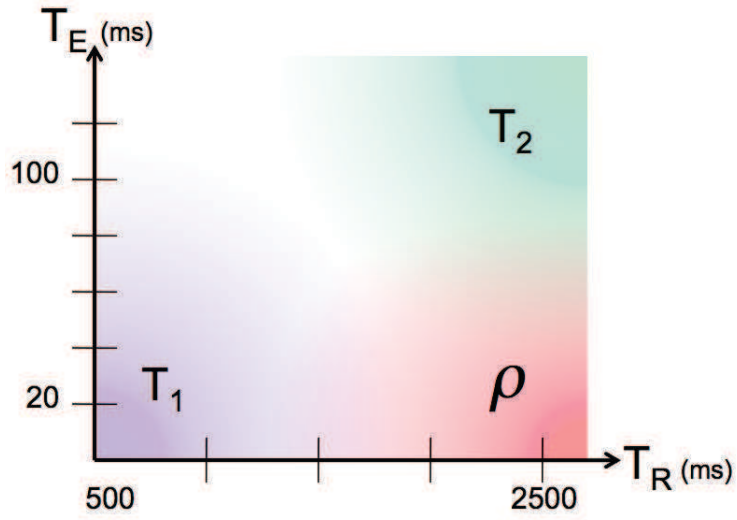


FIGURE 1.24 – Schéma indiquant le type de pondération pour une séquence d'écho de spin en fonction des paramètres utilisés pour le T_R et le T_E. On peut voir sur cette figure que l'utilisation de paramètres intermédiaires aboutit à des images qui ne sont pas pondérées par rapport à un seul paramètre.

1.2.4.2 Contraste obtenu avec une séquence écho de gradient

Il est également possible d'obtenir différents contrastes en utilisant une séquence écho de gradient. Je ne vais pas reprendre tout le raisonnement fait pour l'écho de spin mais présenter rapidement comment obtenir les différents contrastes possible (T_2^*, T_1 et ρ) avec une séquence écho de gradient.

Dans le cas d'une séquence d'écho de gradient les deux paramètres qui vont influer sur le type de pondération sont l'angle de bascule α et le T_E, le T_R est dans tout les cas court par rapport au T_1, c'est d'ailleurs l'intérêt d'utiliser une séquence écho de gradient que d'utiliser un T_R court. On a alors 4 cas de figure présentés ci-après (Fig.1.25).

- Si l'on utilise un angle important et une valeur de T_E trop importante on va avoir disparition de contraste car le signal risque d'être complètement détruit du fait de l'évolution en T_2^*.
- Avec un angle de bascule faible on a des effets T_2^* qui sont moins important, dans ce cas il est encore possible d'avoir du signal même avec une valeur de T_E élevée, le signal est alors pondéré en T_2^* ;
- Dans le cas d'un angle faible et d'un T_E court on se retrouve un peu comme dans la même configuration que dans le cas d'une pondération ρ en écho de spin (on est dans le cas de figure d'un T_R court). On transfère peu d'aimantation de l'axe longitudinal dans le plan transversal et l'on observe le signal tout de suite, on a alors une pondération en densité de proton ;

– Dans le dernier cas, T_E court et angle de bascule important, on a une grande partie de l'aimantation selon l'axe longitudinal qui est transférée selon le plan transversal, le signal est ensuite recueilli assez rapidement pour éviter qu'il ne relaxe trop. On va donc obtenir une différence de signal du même ordre de grandeur que la différence de signal dans les deux tissus avant bascule de l'aimantation. Cette différence avant bascule était principalement due à une différence de T_1 (T_R court). Dans ce dernier cas de figure on a ainsi une pondération en T_1.

On retrouve ces propriétés sur la figure 1.25.

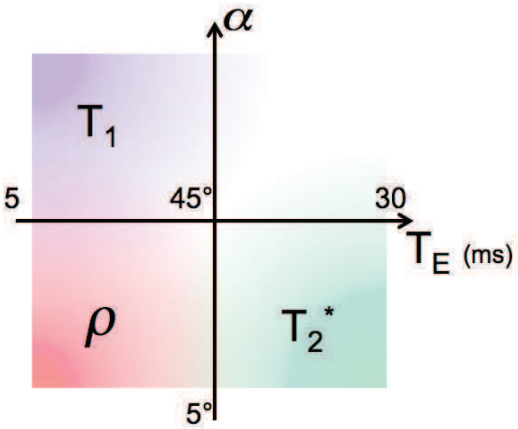


FIGURE 1.25 – Schéma indiquant le type de pondération pour une séquence d'écho de gradient en fonction des paramètres utilisés pour l'angle de bascule α et le T_E. On peut voir sur cette figure que l'utilisation de paramètres intermédiaires aboutit à des images qui ne sont pas pondérées par rapport à un seul paramètre.

1.3 La Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM)

Dans cette partie nous allons principalement raisonner sur les noyaux d'hydrogènes. Hormis certaines valeurs numériques, sauf mentions contraires tout ce qui va être présenté ici, tels que les raisonnements ou définitions, pourra s'appliquer aux autres éléments atomiques.

Les noyaux d'hydrogène possèdent un rapport gyromagnétique qui est une constante. Dans le cas d'un noyau d'hydrogène isolé, la fréquence de précession est alors directement proportionnelle au champ B_0 appliqué.

Dans le cas d'un atome inclus dans une molécule, son noyau va être dans un champ magnétique local modifié. Dans ce cas la fréquence de précession est modifiée par le nuage électronique de la molécule. C'est cette propriété qui est utilisée en spectroscopie. Le décalage en fréquence par rapport à la fréquence de référence va nous renseigner sur la nature/composition du produit observé.

1.3.1 Spectroscopie 1D du noyau d'hydrogène

L'atome d'hydrogène est composé d'un électron et d'un proton qui, à lui seul, forme le noyau. Le noyau de l"atome d'hydrogène possède un spin $\frac{1}{2}$, il est donc possible de l'observer en spectroscopie par résonance magnétique. Le rapport gyromagnétique du proton est de $26{,}75.10^7 rad.s^{-1}.T^{-1}$.

1.3.1.1 Déplacement chimique

On sait que l'environnement électronique diffère en fonctions des différentes fonctions chimiques. Cette différence d'environnement électronique va avoir pour conséquence la création d'un champ magnétique local très légèrement différent du champ magnétique de référence. Afin de caractériser le décalage en fréquence on utilise la notion de déplacement chimique, noté δ et généralement exprimé en *ppm* (parties par million). Ce déplacement chimique est défini de façon à s'affranchir de la valeur du champ magnétique utilisé. Tandis qu'un décalage en fréquence est donné pour une fréquence de référence, proportionnelle au champ magnétique utilisé, le déplacement chimique, lui, est

indépendant. On a :

$$\delta = \frac{f_{mesure} - f_{\text{référence}}}{f_{travail}}.10^6$$

avec f_{mesure} la fréquence mesurée, $f_{travail}$ la fréquence associée au champ de l'aimant et $f_{\text{référence}}$ la fréquence de référence utilisée. Souvent on utilise la fréquence de résonance du TMS (tétraméthylsilane) qui est alors considéré comme ayant un déplacement chimique nul. A titre d'exemple un déplacement chimique de $1ppm$ correspond à $400Hz$ pour un champ de $9{,}4T$ ($400MHz$) et à $300Hz$ pour un champ de $7T$ ($300MHz$).

Afin d'illustrer cette notion de déplacement chimique je vais présenter le spectre de l'éthanol. L'éthanol est un alcool primaire à 2 carbones (ici nous considérons des carbones ^{12}C [4]) (Fig.1.26). Il est possible de distinguer 3 types d'hydrogènes. L'atome d'hydrogène de la fonction alcool, lié à l'oxygène, les deux atomes d'hydrogènes situés sur le premier carbone de la chaîne, et les 3 derniers situés sur le deuxième carbone.

Ces trois groupes d'hydrogènes possèdent chacun des environnements différents. Ils ne voient pas le même paysage électronique, ainsi le champ magnétique local sera différent pour ces trois groupes. Nous allons donc obtenir 3 motifs dans le spectre de l'éthanol, un motif pour chacun des groupes, aux fréquences correspondantes aux champs magnétiques locaux. Pour le moment nous allons considérer ces motifs comme de simples pics. Les intégrales relatives de ces pics vont avoir pour surfaces relatives 1 : 2 : 3 ce qui correspond aux nombres de protons dans ces trois groupements (alcool, CH_2, CH_3).

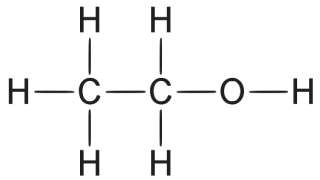


FIGURE 1.26 – Représentation développée de la molécule d'éthanol

1.3.2 Couplage hétéronucléaire

Lorsque dans une même molécule il existe différents noyaux visibles en RMN alors il va y avoir modification du spectre. Typiquement si l'on considère le spectre de l'éthanol en considérant une molécule comprenant des atomes de carbone ^{13}C à la place d'atome de carbone ^{12}C il va être possible d'observer cet effet de couplage.

Concrètement l'effet du couplage sur le spectre va être la séparation d'un pic en plusieurs pics. Si un pic est séparé en plusieurs pics cela signifie que les fréquences de résonance sont modifiées. En effet les noyaux de carbones ^{13}C possèdent un spin 1/2 et peuvent donc occuper deux états d'énergie différents. Ainsi le champ local observé par les noyaux d'hydrogène peut adopter deux

4. les atomes de carbone ^{12}C possèdent un spin nul, ils sont ne sont donc pas observables en RMN

états différents selon que l'atome est lié à un carbone ^{13}C en état « haut » ou en état « bas » . La différence au niveau de la valeur du champ magnétique observé localement est liée à la constante de couplage scalaire (appelé aussi constante de couplage spin-spin ou constante de couplage J). Cette constante est notée J_{AX} lorsque l'on parle du couplage entre les atomes A et X, elle s'exprime en Hz. Cette valeur est indépendante de la valeur du champ de l'aimant (contrairement au déplacement chimique). Le couplage spin-spin est liée à une énergie qui se calcule à l'aide de l'équation :

$$E = h\ J_{AX}\ m_A\ m_X$$

avec m_X la valeur du nombre quantique magnétique associé à l'atome X et m_A la valeur du nombre quantique magnétique associé à l'atome A.

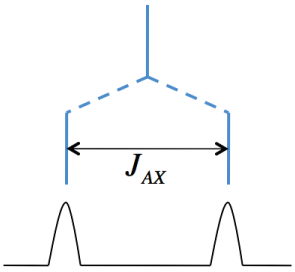


FIGURE 1.27 – Motif obtenu pour un couplage scalaire de type AX avec $I_X = \frac{1}{2}$. La distance entre les deux pics est égale à la constante de couplage J_{AX}. Les intensités des deux pics sont égales.

1.3.3 Couplage homonucléaire

Il existe également des couplages homonucléaires mais les constantes de couplages spin-spin sont plus faibles. Il ne va donc pas toujours être possible d'observer les effets de ces couplages (dans la plupart des cas il ne sont pas observables en SRM ^1H *in vivo*). Nous n'allons pas détailler l'effet de ces couplages ici mais ils faut savoir qu'ils existent et qu'il peuvent aboutir à l'apparition de massifs complexes composés de nombreux pics (on qualifiera alors ces massifs de multiplets).

1.3.4 Spectroscopie $2D$ homonucléaire

Il existe de nombreuses séquences de spectroscopie $2D$. Si l'on travaille sur une molécule il va être possible d'obtenir de nombreux renseignements, en particulier sur les différents couplages entre spins qui peuvent exister tels que les couplages dipolaires et scalaires.

Dans cette partie je vais seulement présenter un exemple de séquence de spectroscopie $2D$ au travers de la séquence TOCSY (TOtal Correlation Spectroscopy) qui permet d'avoir une information sur les couplages scalaires.

1.3.4.1 Structure générale d'une séquence de spectroscopie $2D$: obtention de la deuxième dimension fréquentielle.

Tout d'abord il est important de présenter la structure générale d'une séquence de spectroscopie $2D$ qui se décompose toujours de la façon décrite sur la figure 1.28. Les parties préparation et mélange, qui sont de durées fixes comprennent, en général, une ou plusieurs impulsions. La période de détection est la même que lors d'une acquisition de spectroscopie 1D. Ainsi le codage de la deuxième dimension en fréquence va se faire au niveau de la partie « évolution »qui va avoir une durée variable.

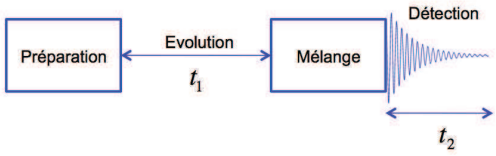


FIGURE 1.28 – Structure générale d'une séquence d'acquisition $2D$ qui comprend 4 phases : Préparation, évolution, mélange et détection.

1.3.4.2 Exemple de la séquence TOCSY [6]

La séquence TOCSY est décrite sur la figure 1.29 . Elle est constituée des étapes suivantes :

- une période de préparation qui comprend un délai pour le retour à l'équilibre et d'une impulsion à 90° qui bascule l'iamantation dans le plan transversal ;
- une période d'évolution, t_1, de durée variable ;
- une période de mélange qui comprend plusieurs impulsions à 180° qui constitue un « spin lock ». Durant cette période un transfert de polarisation se fait entre les protons ;
- une période de détection d'une durée t_2 fixe.

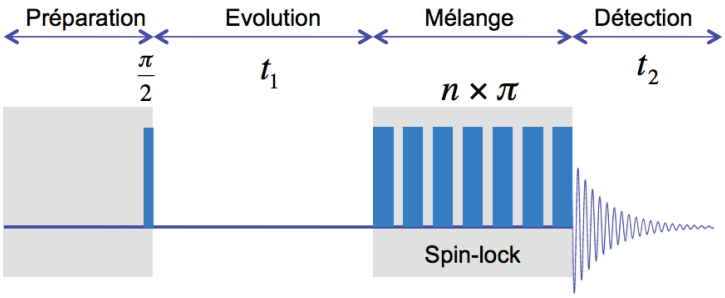


FIGURE 1.29 – Séquence TOCSY. On retrouve sur cette séquence les 4 phases caractéristiques d'une séquence de spectroscopie $2D$. Dans cette séquence la durée t_1 est variable (délai incrémentable).

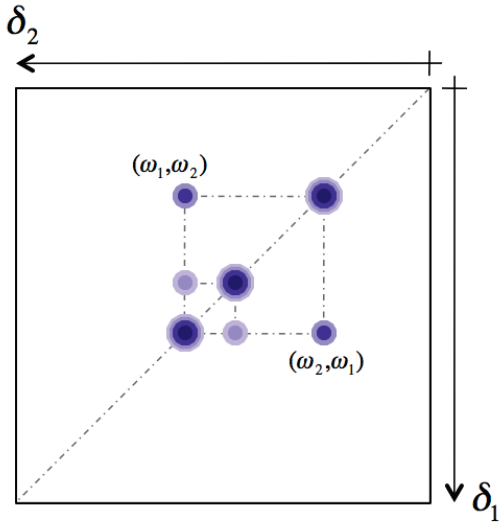


FIGURE 1.30 – Une spectre type de spectroscopie 2D.

1.3.4.3 Structure d'un spectre $2D$ homonucléaire, de corrélation

Un spectre $2D$ est constitué de deux dimensions fréquentielles. Deux parties importantes sont à distinguer, la diagonale et les parties hors-diagonale qui sont symétriques par rapport à la diagonale. La diagonale correspond au spectre $1D$, les pics présents hors diagonale par contre rendent compte d'interactions entre les différents noyaux. En fonction de la séquence $2D$ utilisée les interactions peuvent êtres des couplages scalaires, couplages dipolaires, les échanges chimiques. . .Sur la figure 1.30 j'ai représenté de façon schématique un spectre 2D obtenu avec une séquence TOCSY. Les pics hors diagonale rendent compte de couplages scalaires entre les noyaux. Dans l'exemple qui est donné on a trois pics de résonances (les trois sur la diagonale) dont un pic qui est scalairement couplé avec les deux autres.

Lorsque l'on travaille sur un nouvel échantillon il est possible de réaliser une séquence de ce type pour d'identifier les molécules. Chaque molécule renvoie un motif qui va être spécifique de sa structure chimique. Afin d'identifier les molécules il va falloir reconnaître les motifs leur correspondant dans le spectre qui va être la superposition de plusieurs motifs.

1.3.5 Méthode de RMN HRMAS (High Resolution Magic Angle Spinning)

1.3.5.1 Principe de la HRMAS

Lorsque l'on travaille sur des échantillons biologiques de petite taille il est possible d'avoir recours à la spectroscopie à haut champ. C'est souvent le cas lorsque l'on travaille sur des échantillons de biopsies *ex vivo*. Malgré l'apport en terme de signal et de résolution des hauts champs, les spectres ne sont parfois pas suffisamment exploitables en termes de résolution cela étant principalement

dû à des problèmes d'élargissement de raies dû à diverses interactions. Le principe de la HRMAS est de faire disparaître l'effet de ces interactions. La méthode de HRMAS est une adaptation de la méthode de spectroscopie MAS développée dans le cadre de travaux sur des échantillons solides. Lorsque l'on travaille sur des échantillons biologiques, considérés comme « mous » le nombre d'interactions à considérer, qui sont à l'origine de l'élargissement des raies, est moins important.

1.3.5.2 Théorie de la RMN HRMAS

Le problème d'élargissement de raie provient principalement de trois types d'interactions :

- l'interaction dipolaire proton-proton
- l'interaction d'anisotropie de déplacement chimique
- la différence de susceptibilité magnétique

Il est possible de présenter l'effet de la méthode HRMAS en utilisant l'Hamiltonien de spin. Celui-ci va être présenté sous une forme simplifié ne présentant que les termes liés aux paramètres listés ci-dessus. Après avoir présenté d'où vient la valeur de l'angle magique je ne vais pas détailler l'ensemble des calculs qui permettent de mettre en évidence les effets de la mise en rotation à l'angle magique mais en présenter brièvement les conséquences.

Hamiltonien

En absence d'un champ radiofréquence, l'Hamiltonien de spin peut s'écrire de cette forme :

$$H(r) = H_0 + H_{DD}(r) + H_{sus}(r)$$

avec $H_0 = -\sum_j \gamma^j B_0 I_z^j$ qui est l'interaction des spins avec le champ permanent, I étant le moment angulaire de spin, $H_{DD}(r)$ est le terme provenant du couplage dipôle-dipôle, le dernier terme $H_{sus}(r)$ provient des susceptibilités hétérogènes. Dans le cadre d'études de matériels vivants, c'est ce terme qui est la principale cause d'élargissement de raies.

Il est important de noter que les deux termes de l'Hamiltonien qui sont $H_{DD}(r)$ et $H_{sus}(r)$ dépendent de la position dans l'échantillon, en effet, ces termes dépendent du champ local et non pas du champ statique B_0

Couplage dipôle-dipôle

On associe à chaque spin un moment magnétique $\vec{\mu} = \gamma\hbar\vec{\mathbf{I}}$ qui crée un champ magnétique local. Lorsqu'un voisin interagit avec ce champ, cette interaction est mutuelle, c'est l'interaction dipôle-dipôle. L'expression de ce couplage dépend à la fois de l'aimantation, de l'orientation des moments magnétiques et de la distance entre les deux spins. Si l'on raisonne sur deux spins fixes alors

l'expression de l'Hamiltonien provenant de l'interaction dipôle-dipôle peut s'exprimer de la façon suivante :

$$H_{DD}^{ij}(r) = \frac{q_{ij}}{r_{ij}^3}\left[\vec{I_i}.\vec{J_j} - 3(\vec{I_i}.\vec{e}_{ij})(\vec{I_j}.\vec{e}_{ij})\right]$$

avec $q_{ij} = \frac{\mu_0}{4\pi}\gamma_i\gamma_j$, μ_0 étant la perméabilité magnétique, $\vec{e}_{ij}$ le vecteur unitaire reliant le spin i au spin j et r_{ij} la distance internucléaire.

Lorsque l'on travaille à haut champ il est possible de négliger la partie non séculaire (qui ne commute pas avec l'hamiltonien Zeeman) du couplage dipôle-dipôle. A ce moment là l'expression du couplage est différente selon que le couplage est homonucléaire ou hétéronucléaire. Dans le cas où le couplage est homonucléaire l'expression est :

$$H_{DD,homo}^{ij} = \frac{q_{ij}}{r_{ij}^3}\frac{3cos^2\theta_{ij} - 1}{2}(3I_{iz}.I_{jz} - \vec{I_i}.\vec{J_j})$$

avec θ_{ij} l'angle entre le vecteur $\vec{e}_{ij}$ et le champ magnétique permanent.

Dan le cas où le couplage est hétéronucléaire l'expression est :

$$H_{DD,hetero}^{ij} = \frac{q_{ij}}{r_{ij}^3}\frac{3cos^2\theta_{ij} - 1}{2}2I_{iz}.I_{jz}$$

Ensuite la partie de l'Hamiltonien de spin relative au couplage dipôle-dipôle est la somme sur l'ensemble des spins du système on a :

$$H_{DD} = \sum_{i\neq j} H_{DD}^{ij}$$

Hamiltonien et hétérogénéités de susceptibilité magnétique

Pour donner l'expression de l'Hamiltonien relatif aux interactions de susceptibilité magnétique nous allons avoir besoin de calculer le champ magnétique pour chaque spin. Pour cela il est utile d'introduire l'aimantation $\vec{M}$.

L'aimantation se définie de la façon suivante :

$$\vec{M} = \frac{\chi}{\mu_0}B_0\vec{e}_z$$

avec B_0 l'intensité du champ magnétique permanent, $\vec{e}_z$ le sens d'application de B_0 et χ la susceptibilité magnétique de l'échantillon. Cette susceptibilité est dépendante de la position.

L'aimantation globale est égale à la somme de l'aimantation de spin et de l'aimantation électronique. En RMN c'est l'aimantation de spin qui est importante car c'est cette aimantation qui engendre le signal RMN, par contre dans la plupart des cas c'est l'aimantation électronique qui est prépondérante. Pour la suite des calculs nous allons donc négliger le terme de l'aimantation globale provenant de l'aimantation de spin.

En considérant un échantillon pour lequel la susceptibilité n'est pas homogène (ce qui est le cas pour un échantillon vivant) il est possible de considérer l'échantillon comme un ensemble de volumes Δv possédant une susceptibilité uniforme et qui possèdent un moment magnétique $\vec{m}_i$ tel que :

$$\vec{m}_i = \vec{m}_i(r_i) = \frac{\chi_i}{\mu_0} B_0 \Delta v . \vec{e}_z$$

Les moments magnétiques de chaque région induisent un champ magnétique homogène à l'intérieur d'elle-mêmes mais également un champ dipolaire autour de celles-ci. En tout point le champ magnétique macroscopique va ainsi être égal au terme homogène induit par la région elle-même plus le terme correspondant à l'ensemble des champs dipolaires induits. On a donc :

$$\vec{B}(r) = \frac{2}{3}\nu_0 \vec{m}(r) + \sum_i \frac{\mu_0}{4\pi r_i^3} \left[3(\vec{m}_i.\vec{e}_i)\vec{e}_i - \vec{m}_i\right]$$

Les spins nucléaires sont des dipôles de tailles microscopique et le champ magnétique ressenti n'est pas le champ magnétique macroscopique défini ici mais le champ de dimension microscopique $\vec{B}_{sus}(r)$. Ce champ microscopique est égal à :

$$\vec{B}_m(r) - \frac{2}{3}\mu_0 \vec{m}(r)$$

Le terme séculaire de l'Hamiltonien de spin devient :

$$H_m(r) = \sum_i \frac{\mu_0}{4\pi r_i^3}(3cos^2\theta_{ij} - 1)I_{jz}$$

et l'Hamiltonien de spin global quand à lui est :

$$\sum_{i \neq j} \sum_i \frac{\mu_0}{4\pi r_i^3}(3cos^2\theta_{ij} - 1)I_{jz}$$

avec i qui correspond à l'ensemble des régions de l'échantillon et j correspond à l'ensemble des spins du système.

De nouveau on retrouve ici un terme qui est proportionnel à $3cos^2\theta_{ij} - 1$, ainsi les deux principaux phénomènes qui induisent un élargissement des raies des spectres RMN ont des expressions qui sont proportionnelles à ce terme.

Effet de la mise en rotation à l'angle magique

L'angle magique est l'angle qui correspond à la valeur de θ_{MAS} tel que $3cos^2\theta_{MAS} - 1 = 0$. En faisant tourner l'échantillon autour d'un axe $\vec{u_{MAS}}$ formant un angle θ_{MAS} avec la direction d'application du champ magnétique on réalise un moyennage dans le temps de la direction des spins qui forment alors un angle moyen égale à θ_{MAS} avec le champ permanent.

La mise en rotation de l'échantillon à l'angle magique va avoir plusieurs conséquences :

– En imposant une vitesse de rotation assez grande il va être possible de faire diminuer l'effet d'élargissement des signaux du spectre dû aux couplages dipôles-dipôles ainsi qu'aux hétérogénéités de susceptibilité magnétique ;
– La mise en rotation va avoir pour conséquence l'apparition de bandes de rotation qui sont présentes à des distances multiples de la vitesse de rotation. L'amplitude de ces pics est déterminé par l'amplitude de l'enveloppe de ces mêmes pics s'il n'y avait pas la rotation (cf.Fig1.31).

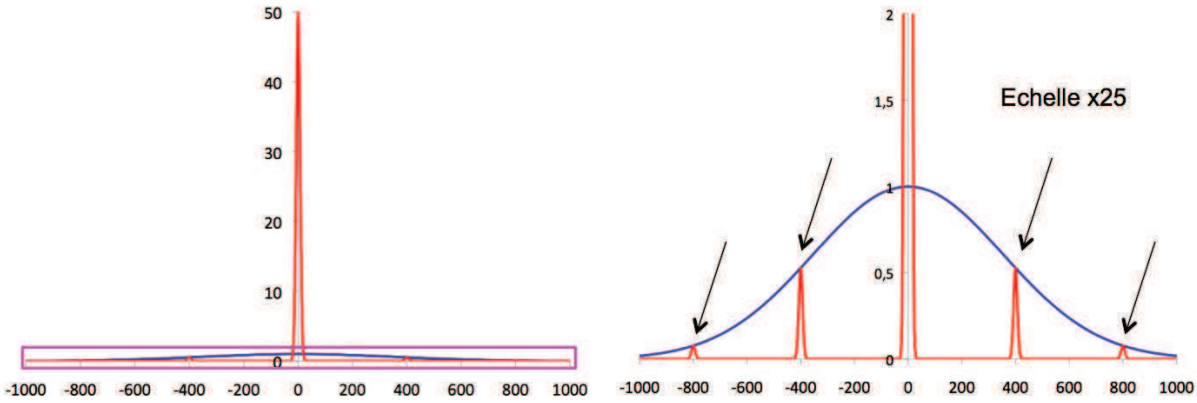


FIGURE 1.31 – Illustration des bandes de rotation. A gauche j'ai représenté deux gaussienne, l'une (en bleue) représentant le signal obtenu sans la rotation, en rouge le signal obtenu avec la rotation (supposé égale à 400 Hz). A droite j'ai représenté le grossissement de la basse du graphique de gauche. On voit que le signal obtenu en 0 et répété tout les 400 Hz et que l'amplitude est égale à l'amplitude du signal obtenu sans rotation.

Une conséquence de la mise en rotation de l'échantillon est la nécessité de synchroniser les acquisitions avec la période de rotation. Pour avoir un signal homogène il est nécessaire que l'échantillon soit dans la même configuration lors de l'application des gradients et des impulsions. Ainsi on va avoir les temps d'écho et les temps de répétition qui vont être des multiples de la période de rotation.

Lors de l'application de gradients selon un axe différent de l'axe de rotation, la rotation va apporter une difficulté supplémentaire. Si l'on souhaite réaliser un gradient perpendiculaire à l'axe de rotation de l'échantillon, il va être obtenu à l'aide des trois gradients G_x G_y et G_z (le plan perpendiculaire à l'axe de rotation étant le plan d'équation $x + y + z = 0$ si l'on considère le plan passant par l'origine du repère). D'autre part si l'on souhaite un gradient qui soit toujours dirigé dans la même direction par rapport à l'échantillon il va être nécessaire d'utiliser des gradients variables selon ces 3 directions. La

variation de ces gradients doit être synchronisée avec la période de rotation de l'échantillon.

1.4 La spectroscopie localisée

Dans le domaine de la SRM on qualifie certaines méthodes de spectroscopie localisée. En effet ces méthodes d'acquisition permettent d'acquérir le signal provenant d'un volume défini par l'expérimentateur. Certaines méthodes, comme c'est le cas pour la méthode ISIS (Image Selected *In vivo* Spectroscopy), ne permettent pas d'obtenir le signal localisé en une seule acquisition mais nécessitent plusieurs acquisitions successives ce qui a pour conséquences de rallonger la durée des expériences [49].

D'autres méthodes comme les méthodes STEAM (STimulated Echo Acquisition Mode) et PRESS (Point RESolved Spectroscopy) permettent d'obtenir le signal localisé en une seule acquisition. Ces deux méthodes sont principalement constituées de 3 impulsions qui génèrent la formation de 3 fid et 5 échos [27] (cf. Fig. 1.32). La différence entre les deux séquences PRESS et STEAM se situe tout d'abord au niveau des valeurs d'angles des impulsions utilisées mais aussi au niveau du signal recueilli. En effet dans le cas de la séquence STEAM c'est l'écho stimulé qui est recueilli, alors que dans le cas de la PRESS, c'est le signal du double écho de spin. La principale différence est l'amplitude du signal théorique récupéré qui est double dans le cas de la séquence PRESS. C'est cette méthode que l'on a choisi d'utiliser et que je vais présenter dans les paragraphes suivant. Je vais également présenter la méthode POCE-PRESS (Proton Observed Carbon Edited-PRESS) qui est en fait une méthode PRESS classique à laquelle ont été ajoutés deux impulsions additionnelles permettant la sélection du signal provenant des protons liés aux carbones ^{13}C, ainsi que le découplage du signal.

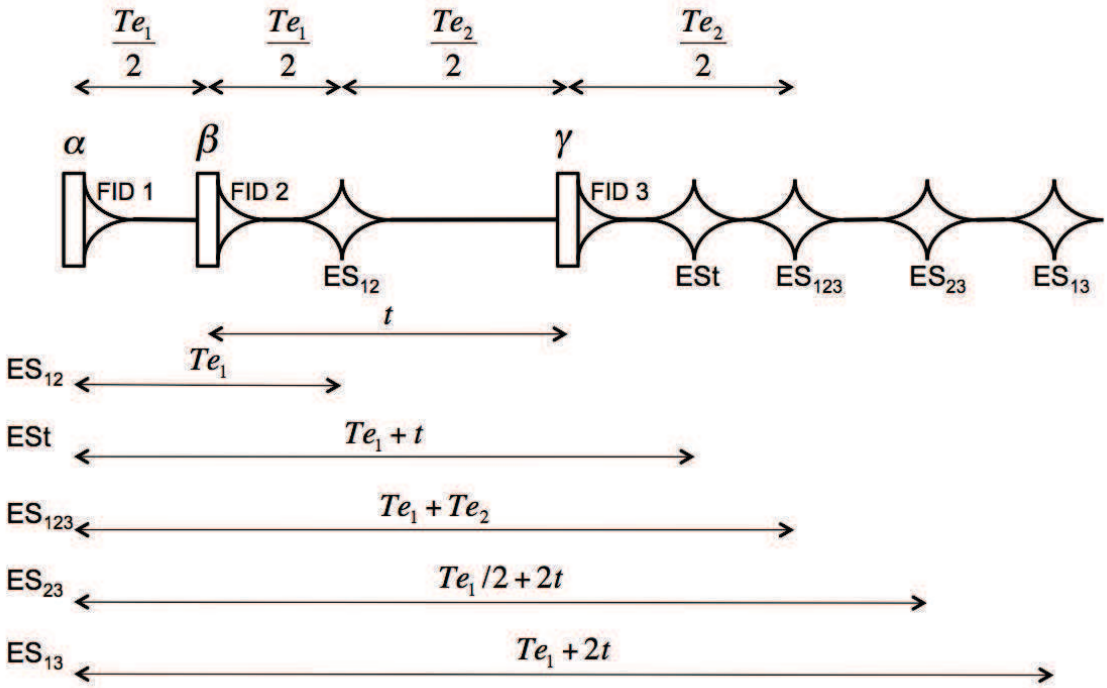


FIGURE 1.32 – Schéma d'impulsions correspondant aux méthodes de spectroscopie localisée STEAM et PRESS. Ces méthodes qui incluent 3 impulsions donnent 3 fid et 5 échos. J'ai indiqué sur la figure les différents temps auxquels apparaissent les échos Dans le cas de la séquence STEAM c'est l'écho stimulé, noté ESt qui est acquis, alors que pour la PRESS c'est le double écho, noté ES_{123}. L'écho stimulé n'apparaît que lorsque les impulsions α, β et γ sont de 90°, ce qui correspond aux valeurs d'impulsion de la méthode STEAM. Dans le cas de la méthode PRESS les valeurs d'impulsions sont de 90, 180 et 180°. Les autres échos apparaissent dans tout les cas mais leur amplitudes sont modulées en fonctions des valeurs d'impulsions utilisées.

1.4.1 La méthode PRESS

La méthode PRESS est une séquence qui consiste en 3 impulsions sélectives accompagnées de gradients de sélection de coupe selon 3 directions de l'espace perpendiculaire entres elles (cf. Fig 1.33). Le volume d'intérêt est ainsi défini comme étant l'intersection des trois plans de coupe sélectionnés lors de l'application des impulsions sélectives.

En plus de permettre la sélection du volume ces 3 impulsions permettent la création de 4 échos (cf. Fig.1.33). Ces échos apparaissent aux instants suivant :

- $t = Te_1$, cet écho correspond à un écho de spin issu des deux premières impulsions ;
- $t = Te_2 + 3\frac{Te_1}{2}$, cet écho correspond à un écho de spin créé par les impulsions 2 et 3 ;

– $t = 2Te_1 + Te_2$, cet écho correspond aux impulsions 1 et 3.
– $t = Te_1 + Te_2$ cet écho correspond à la refocalisation de l'écho créé à l'instant Te_1 par l'impulsion 3 qui est une impulsion d'angle π. Dans le cadre d'une acquisition PRESS c'est cet écho qui va être recueilli car c'est cet écho qui va être le plus intense.

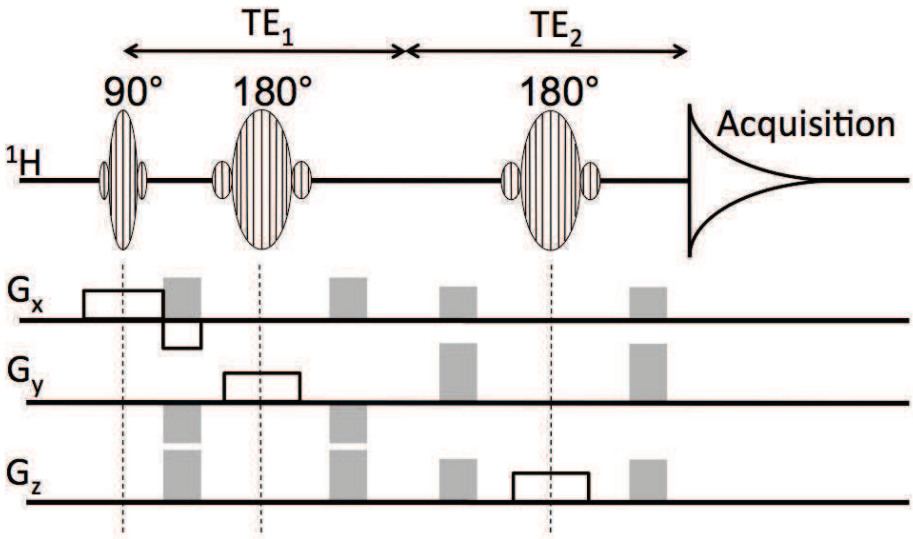


FIGURE 1.33 – Schéma représentant les impulsions radio-fréquence et les gradients selon les 3 axes x, y et z de la séquence PRESS. La séquence PRESS correspond à la séquence décrite sur la figure 1.32 dans le cas où α, β et γ sont respectivement égaux à 90°, 180°et 180°. Le volume d'où provient l'écho est définie grâce aux gradients accompagnés d'impulsions spatialement sélectives. Afin que le signal obtenu soit de la meilleure homogénéité possible on a recours à des gradients « crushers » (représentés en gris) utilisés pour détruire le signal non désiré.

1.4.2 La méthode d'imagerie de déplacement chimique

On parle d'imagerie de déplacement chimique (CSI pour chemical Shift Imaging) lorsque, à l'issu d'une acquisition, on obtient des données de spectroscopie pour tout les voxels d'une image. Le type de CSI le plus courant est du CSI dans un plan de coupe. Le signal obtenu est un signal à 3 dimensions, une dimension spectrale et 2 dimensions spatiales. Je ne vais pas présenter ici cette méthode en détail mais rapidement en expliquer le principe

La séquence CSI repose sur le principe d'un double gradient de codage variable selon deux directions perpendiculaires. Ce double incrément variable permet d'obtenir un signal qui va avoir deux dimensions spatiale et une dimension fréquentielle. A chaque T_R le signal recueilli provient d'un point de l'espace k. Afin de réaliser une acquisition complète il va falloir répéter l'acquisition autant de fois qu'il n'y a de points dans l'espace k.

Dans le cadre des expériences que j'ai réalisé la séquence CSI utilisée est une séquence simplifiée car il n'y a qu'une dimension spatiale, elle est donc un peu plus simple que la séquence présentée ici car elle possède une direction de codage de moins et il n'y a pas de gradients de sélection de tranche car l'on travail sur tout le volume.

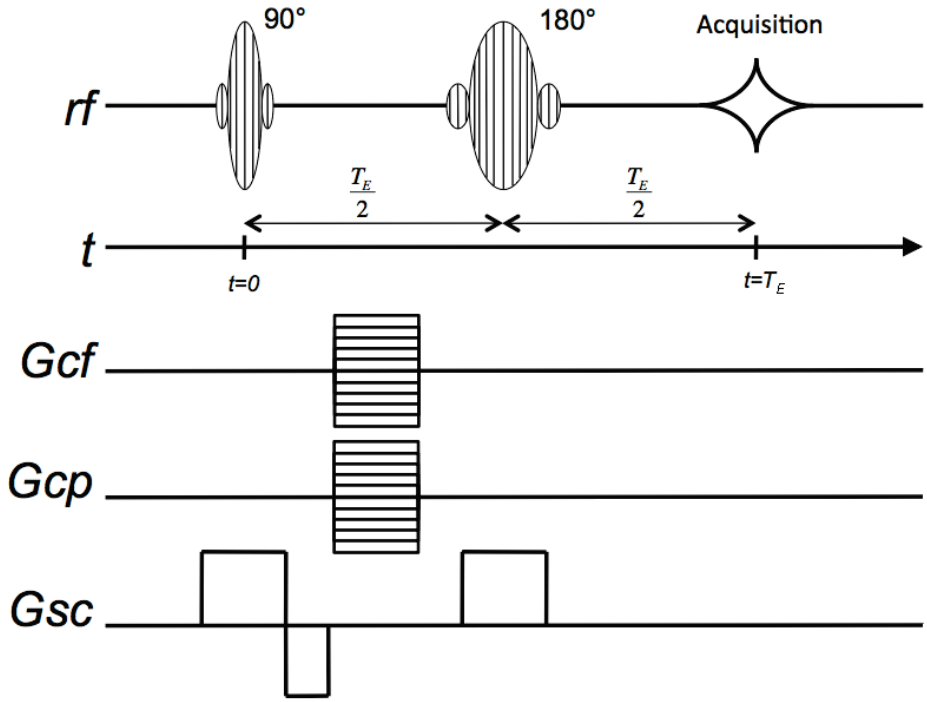


FIGURE 1.34 – Schéma de la séquence CSI. Je donne ici l'exemple d'une séquence CSI réalisée sur une tranche (d'où le gradient de sélection de tranche selon Gsc couplé à l'impulsion de 90° sélective). On applique simultanément les gradients incrémentables selon Gcf et Gcp. Durant l'application de l'impulsion à 180° on applique de nouveau un gradient selon la direction de la sélection de tranche.

1.4.3 Les modules additionnels

1.4.3.1 Utilisation des gradients crushers

Les gradients crushers sont des gradients qui servent à détruire un signal non désiré lorsqu'on utilise des impulsions de refocalisation qui n'ont pas un angle exactement égal à 180°. C'est typiquement le cas lorsque l'on utilise une bobine de surface qui n'est pas en mesure de fournir un champ rf B_1 parfaitement homogène. Dans le cadre du travail présenté dans ce manuscrit les gradients crushers utilisés se présentent sous la forme de 2 gradients, identiques, qui se trouvent juste avant et juste après l'impulsion de refocalisation (cf. Fig.1.35). Le but de ces gradients est de détruire un éventuel signal crée par l'impulsion de refocalisation. La partie ayant subit une impulsion de 180°est

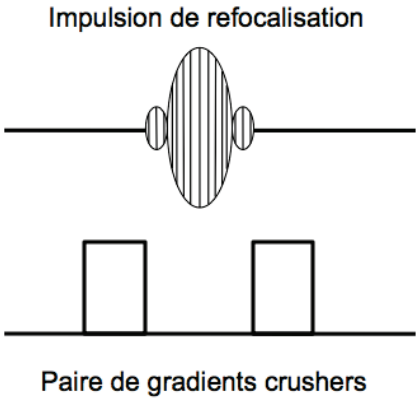


FIGURE 1.35 – Exemple de gradients cruschers. Les gradients sont présents juste avant et juste après l'impulsion de refocalisation.

déphasée puis rephasée parfaitement alors que la partie du signal n'ayant pas subit un 180°parfait va être dispersée.

1.4.3.2 Suppression du signal de l'eau

Lorsque l'on réalise des acquisitions de spectroscopie en solution aqueuse ou *in vivo* il est nécessaire de supprimer le signal de l'eau cela pour deux raisons. D'une part le signal de l'eau représente en règle générale la majeure partie du signal, ainsi la base du pic de l'eau dans un spectre peut très bien être plus importante que le signal provenant d'autre pics du spectre. La deuxième raison est liée au fait que le signal est numérisé. En effet, étant donné que le signal est échantillonné sur un nombre maximum de digit (32 bits au maximum, soit 2^{32} valeurs), si l'amplitude maximum est fixée par la valeur de l'eau (amplitude qui peut être 10000 fois plus grande que pour les métabolites visibles en SRM) alors on va réduire la plage de digitalisation sur laquelle les données qui nous intéressent vont êtres échantillonnées. Cela peut aboutir à une perte d'information.

La suppression du signal de l'eau peut être réalisée de plusieurs façons. Une des méthodes mise en place dans le cadre d'expériences sur le vivant a été la méthode CHESS (CHEmical Shift Selective) [26]. A la base cette méthode comprenait une unique impulsion sélective, à la fréquence de l'eau, d'angle $\frac{\pi}{2}$, qui basculait l'aimantation de l'eau dans le plan transversal avant qu'un gradient crusher ne vienne la disperser. D'autres méthodes comme la méthode VAPOR (VAriable pulse Power and Optimized Relaxation delays) que j'ai utilisé durant ma thèse sont plus complexes et sont composées de plusieurs impulsions. Cette méthode peut être vue comme une évolution de la méthode CHESS, qui a vu plusieurs améliorations au cours du temps avec l'ajout de plusieurs impulsions afin d'optimiser la suppression de l'eau en champs inhomogènes (champ $\vec{B_0}$ ou $\vec{b_1}$) [73, 20]. La méthode VAPOR est plus appropriée pour les bobines

de surfaces alors que la méthode CHESS, qui fonctionne bien pour des faibles écarts au champ, est plus dédiée aux bobines homogènes.

La méthode de suppression VAPOR

La méthode VAPOR et son effet sur le signal de l'eau ont été décrits par Tkac *et al.* en 1999 [66]. En la comparant à d'autres méthodes Tkac *et al.* ont montré l'efficacité de cette méthode par rapport à d'autres méthodes de suppression multi-impulsions, en particulier dans le cadre d'expériences réalisées avec des bobines produisant un champ radiofréquence inhomogène, ce qui est le cas dans le cadre de notre travail car c'est une bobine de surface qui est utilisée pour la détection du signal.

Une modélisation des effets de la méthode VAPOR sur l'aimantation résiduelle est représentée sur la figure 1.36. Cette séquence d'impulsions radiofréquence comporte 7 impulsions possédant 2 amplitudes différentes. Comme on peut le voir sur la figure 1.36 issue de [66], la méthode s'avère très robuste aux variations d'angles de bascule. Avec cette modélisation Tkac montre qu'à l'issue des 7 impulsions on obtient une aimantation résiduelle longitudinale provenant du signal de l'eau inférieure à 2% du signal initial.

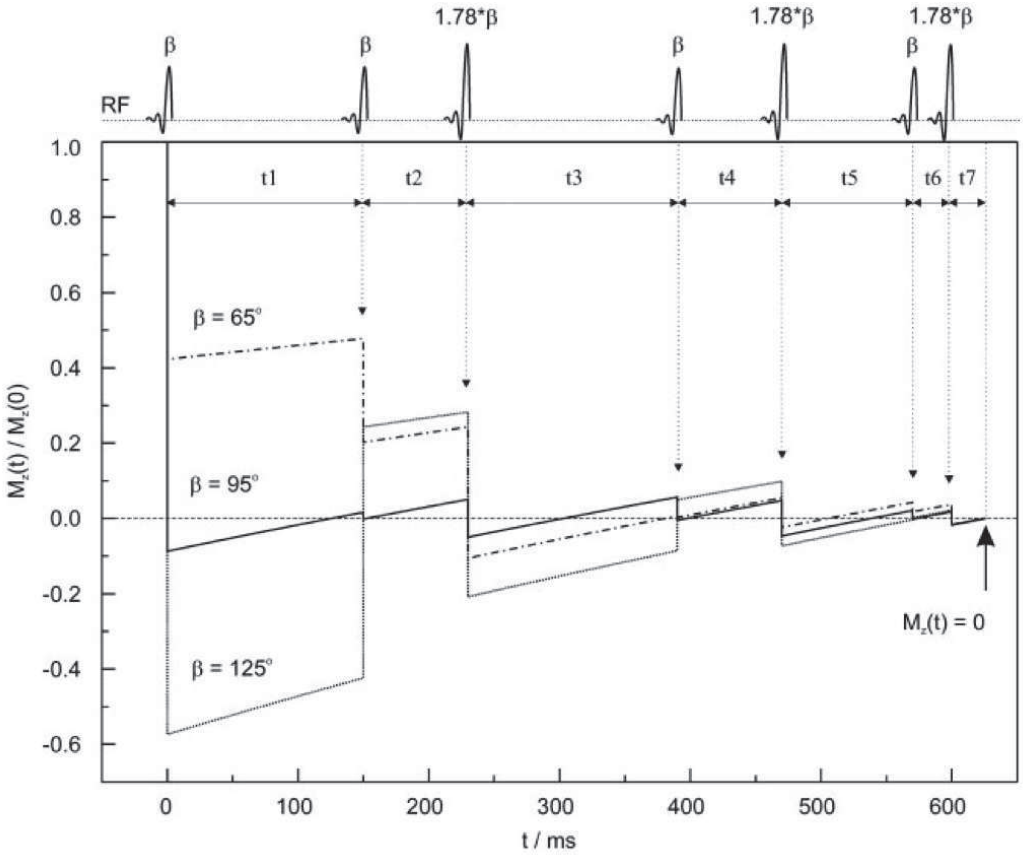


FIGURE 1.36 – Modélisation de l'aimantation longitudinale pour trois angles différents(65°, 95° et 125°) pendant le module de suppression d'eau VAPOR. Sur cette figure figure on peut voir que les deux types d'impulsions sont reliées en intensité. Les délais utilisés ont été optimisés. $t1 = 150\ ms$, $t2 = 80\ ms$, $t3 = 160\ ms$, $t4 = 80\ ms$, $t5 = 100\ ms$, $t6 = 30\ ms$, $t7 = 26\ ms$. Figure issue de [66]

1.4.4 Etude du métabolisme cérébral par spectroscopie du carbone ^{13}C.

Comme nous l'avons présenté plus haut on peut distinguer deux grandes classes de méthodes de détection du carbone ^{13}C, les méthodes directes et indirectes. Il est aussi important de noter la grande différence qui existe entre les acquisitions *in vivo* et *ex vivo*.

1.4.4.1 Acquisition *ex vivo* versus *in vivo*

Le problème lié à la spectroscopie du carbone ^{13}C est le manque de sensibilité. Pour palier à cela, le plus généralement il va être choisi de travailler soit *in vivo* sur des volumes conséquents avec des durées d'acquisitions relativement longues (plusieurs centaines de μL, et plusieurs dizaines de minutes), soit *ex*

vivo sur des extraits obtenus à partir de biopsies ou même d'organes entiers. Travailler *ex vivo* permet d'avoir accès aux méthodes de spectroscopie à haut champ mais apporte une difficulté supplémentaire, en effet l'utilisation de cette méthode impose de stopper le métabolisme le plus rapidement possible après la mort de l'animal. On peut noter les progrès réalisés aux niveaux des méthodes d'arrêt du métabolisme. Afin d'arrêter le métabolisme le plus vite possible l'animal était sacrifié de façon rapide puis le cerveau était prélevé. Ensuite seulement le métabolisme était stoppé en plongeant le cerveau dans un bain d'azote liquide. Après cela il faut encore utiliser un bain d'acide perchlorique qui va bloquer les réactions enzymatiquess. Cette méthode est efficace mais ne permet pas de stopper le métabolisme assez rapidement. Les tissus cérébraux ne possédant pas une bonne conductivité thermique il est possible que le centre du cerveau mette plusieurs dizaines de secondes avant de geler. Il en résulte la présence d'un fort taux de lactate dans les données de spectroscopie qui montre une forte activité en anaérobie et donc une activité *post mortem* du métabolisme cérébral. Aujourd'hui une méthode permettant de stopper le métabolisme cérébral de façon plus efficace à été mise au point. Cette méthode utilise des micro ondes focalisées afin d'augmenter très rapidement la température cérébrale. Cela a pour conséquence l'inactivation des enzymes dans le cerveau et ainsi de stopper tout changement *post mortem*. Contrairement à la première méthode où il est nécessaire de sacrifier l'animal avant de prélever le cerveau, dans cette dernière méthode c'est l'application des micro ondes qui permet simultanément de sacrifier l'animal et de stopper le métabolisme [37]. Il faut également prendre en comptes les avantages et inconvénients de chacune des façons de procéder.

Le cadre de notre étude étant la dynamique du métabolisme cérébral le choix d'une étude *in vivo* s'impose. En effet une étude *ex vivo* imposerait de devoir sacrifier n animaux par point de mesure, plutôt que de travailler sur n animaux et de réaliser autant de points de mesure que nécessaire.

1.4.4.2 Utilisation de produit marqués ^{13}C

Quelque soit l'élément étudié il est courant d'utiliser des produits marqués, avec des isotopes détectables en résonance magnétique nucléaire, afin d'améliorer la détection du signal. C'est le cas lorsque l'on étudie le carbone ^{13}C. L'abondance naturelle du carbone ^{13}C étant de l'ordre de 1% le fait d'utiliser des molécules fortement marqués permet d'augmenter considérablement le signal émis par l'échantillon. Il est possible d'utiliser des molécules qui sont uniformément marquées [], ou bien sur un seul atome de la molécule marquée[] .

1.4.4.3 Méthodes directes

Lorsque l'on a recours à une méthode de découplage des protons liés aux carbones ^{13}C, outre la simplification des spectres avec la superposition d'une

partie des pics, il est possible de gagner un facteur sur le rapport signal sur bruit allant de deux, pour les CH et CH_2, jusqu'à 8/3 dans le cas des CH_3.

L'effet Overhauser peut apporter une amélioration maximum du signal d'un facteur :

$$NOE = 1 + \frac{\gamma_i}{2\gamma_0}$$

avec γ_i le noyau irradié et γ_0 le noyau observé. Ainsi dans le cas d'une irradiation des protons avec une observation des carbones ^{13}C il est possible d'obtenir au mieux une amélioration d'un facteur 3. L'inconvénient étant que les atomes de carbones ^{13}C doivent être directement liés au protons.

La méthode DNP est en plein essor depuis 10 ans [33], cette méthode permet une amélioration du rapport signal sur bruit d'un facteur supérieur à 10000 [4], un tel accroissement du SNR permet d'obtenir des résolutions temporelles de l'ordre de la seconde, y compris *in vivo* [18] . Cette méthode nécessite par contre un important dispositif et l'effet hyperpolarisé du carbone ^{13}C s'estompant rapidement la cinétique est par contre de courte durée après injection du produit.

1.4.4.4 Méthodes indirectes

Pour parer au manque de sensibilité des méthodes de détections directes il est possible de ne pas détecter directement les atomes de carbone 13 présents dans les molécules mais d'observer les protons qui sont liés aux carbones ^{13}C. Ainsi il est possible d'accroître considérablement le signal détecté car le signal renvoyé par les protons est 4 fois plus grand que celui renvoyé par le carbone ^{13}C. Avec une telle méthode il est alors possible de travailler *in vivo* sur des volumes de taille plus raisonnable si l'on désire réaliser de la spectroscopie localisée. Une des méthodes utilisée en détection indirecte est le double transfert de polarisation. Certains protocoles ont déjà été utilisés dans le cadre d'études *in vivo* chez le macaque et le chat. Ce sont des méthodes de spectroscopie 2D hétéronucléaires $^1H -^{13} C$ avec transfert de polarisation inverse, c'est à dire qu'il y a dans un premier temps transfert des protons vers les carbones ^{13}C puis des carbones ^{13}C vers les protons. Ces méthodes permettent en théorie d'obtenir une amélioration du rapport signal sur bruit d'un facteur $(\gamma_H/\gamma_C)^{5/2} = 32$ [19]. Malheureusement ces méthodes comportent de nombreuses impulsions ce qui implique une accumulation d'erreurs sur la valeur des angles, avec parfois des délais assez longs impliquant une sensibilité aux mouvements assez importante ainsi qu'aux effets de relaxation. D'un point de vue expérimental ce type de méthodes ne permet pas, a priori, d'offrir une sensibilité suffisante dans des temps raisonnables dans le cadre d'études en spectroscopie localisée chez la souris.

La spectroscopie $1D$ filtrée $^1H -^{13} C$ constitue une bonne alternative. En effet cette méthode nous offre une sensibilité égale à celle du proton et offre les nombreux autres avantages des méthodes de spectroscopie en proton. Les

avantages de ces méthodes sont principalement la diminution du temps d'acquisition pour un même nombre d'accumulations par rapport aux méthodes $2D$ hétéronucléaires qui nécessitent un temps d'incrémentation t_1, ainsi que la diminution du nombre d'impulsions, ce qui limite la possibilité d'erreur sur la valeur des angles d'impulsions.

1.4.4.5 Spectroscopie du carbone ^{13}C chez la souris

Chez la souris à ce jour il y a eu peu d'études réalisées en spectroscopie qui concernaient le carbone ^{13}C. Les études réalisées l'ont surtout été *ex vivo* ou bien sur organes entiers. Dans sa revue de 2003 sur la spectroscopie du carbone ^{13}C, utilisée dans le cadre de l'étude du métabolisme, Zwingmann ne cite qu'une dizaine de références concernant la souris. Cette valeur est à comparer à la cinquantaine de références citées qui concernent des études sur le rat. Toutes les publications citées sont alors effectuées sur des extraits [29, 30]. Depuis d'autres études on été réalisées en particulier des études *in vivo* sur le métabolisme cérébral mais sur des volumes très important relativement à la taille du cerveau ($175\mu L$ dans le cas de l'étude menée par Nabuurs *et al.* en 2008 [47]).

1.4.4.6 La méthode POCE-PRESS

La méthode de spectroscopie ^1H filtrée ^{13}C utilisée au cours de mon travail de thèse est la méthode POCE-PRESS [17]. Cette méthode se décompose en fait en 2 étapes car elle nécessite de soustraire les spectres 2 à 2. Comme indiqué sur la figure 1.37 la séquence est composée d'une séquence PRESS à laquelle on a ajouté 2 modules selon le deuxième canal d'excitation (le canal carbone). Ces deux modules ont deux rôles différents. Le premier, composé d'une impulsion d'inversion permet d'éditer les protons liés à un carbone ^{13}C et d'inverser leur signal (cf. Tab.1.2). Ainsi en utilisant cette impulsion 1 fois toutes les 2 acquisitions le signal obtenu va être différent. Cette différence va provenir des protons liés à des carbones ^{13}C. En faisant la soustraction de deux spectres obtenus consécutivement on va accéder à l'information qui concerne uniquement les protons liés à des carbones ^{13}C.

Le deuxième module est composé d'un train d'impulsions qui réalise le découplage $^1H -^{13} C$. Il est appliqué tout au long de la réception du signal et permet de découpler le signal des protons liés aux carbones ^{13}C. Lorsque le signal est couplé le motif obtenu est composé de 2 pics répartis symétriquement autour de la valeur de référence du proton (cf. 1.3.2). Ce découplage permet d'obtenir un pic en position central d'amplitude double (cf. Tab.1.2).

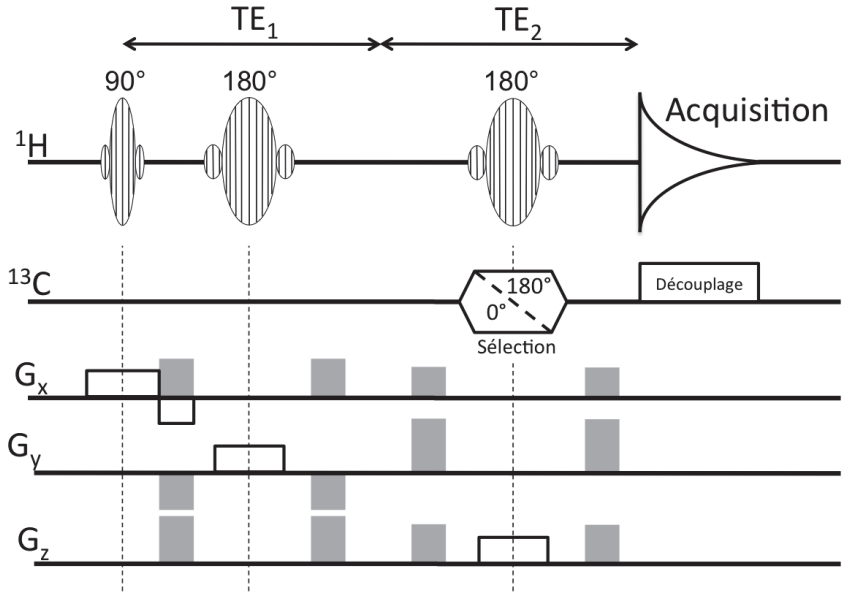


FIGURE 1.37 – Séquence utilisée pour l'acquisition de type POCE-PRESS. 1H : canal proton, 13C : canal carbone, Gx, Gy et Gz représentent les 3 axes des gradients de champ magnétique. Pour l'inversion du signal des protons liés aux carbone ^{13}C on utilise une impulsion d'édition toute les deux séquences. Le découplage est effectué durant l'acquisition du signal. Les gradients sont représentés par des rectangles. Les rectangles blancs sont les gradients qui sont appliqués en même temps que les impulsions sélectives et servent à la définition du volume (le petit gradient selon G_x sert à la refocalisation), les gris représentent les gradients crushers. La valeur de TE_2 a été fixée à $1/J_{CH}$ avec $J_{CH} = 127Hz$. La séquence inclue également un module de suppression d'eau de type VAPOR qui n'est pas indiqué sur la figure.

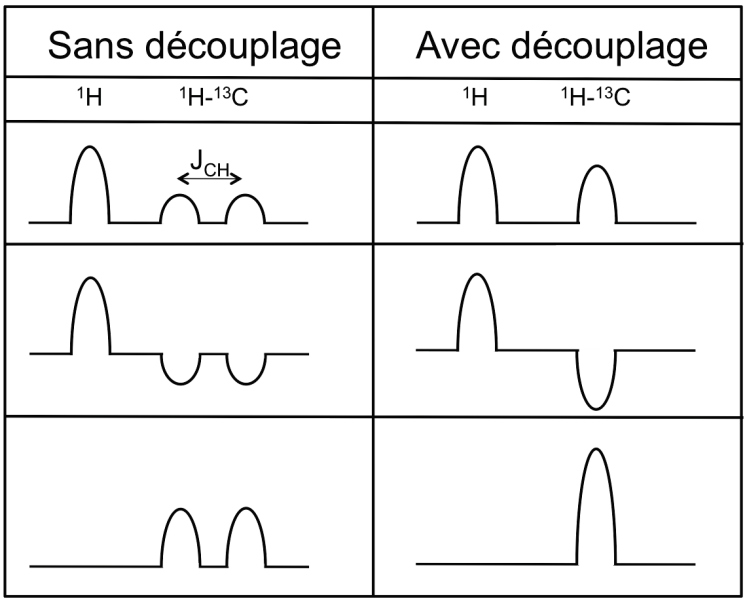


TABLE 1.2 – Schema d'explication du comportement des pics du spectre RMN soumis à la séquence POCE-PRESS. J'ai représenté ici les signaux provenant des protons non liés à des carbones ^{13}C (^{1}H), ou liés à des carbones ^{13}C ($^{1}H -^{13} C$.) La première ligne correspond aux acquisitions sans l'impulsion d'inversion de la séquence POCE-PRESS, la deuxième aux acquisitions avec l'impulsion d'inversion. La troisième ligne correspond à la différence des deux première lignes. On a représenté le signal lorsque qu'il y a découplage ou non des carbones ^{13}C.

1.5 Sonde de mesure

De tout les éléments se trouvant le long de la chaine d'acquisition en RMN la sonde de mesure (aussi appelé bobine ou détecteur) est la partie qui se trouve être la partie la plus adaptable et, de ce fait, la plus importante. En effet, nous allons ici voir qu'il est nécessaire de penser la sonde de mesure en fonction de chaque type d'étude, en particulier en fonction de l'organe à étudier.

Cette élément de la chaine d'acquisition est d'autant plus important que dans bien des cas la bobine joue un rôle d'émetteur et de récepteur. Ainsi un bon émetteur sera également un bon récepteur.

1.5.1 Détection du signal

1.5.1.1 Induction magnétique

Notion de déplacement de charge

Les matériaux conducteurs ont la particularité de posséder des électrons libres. Ces électrons lorsqu'ils rentrent en mouvements créent un courant électrique. Le courant électrique est définie comme un déplacement de charge électrique par unité de temps.

On a l'intensité du courant électrique :

$$i = \frac{dq}{dt}$$

avec q le nombre de charge électrique, t le temps.

Lorsque l'on considère un circuit dans lequel circule un courant on peut associer un potentiel électrique V en tout point de celui-ci, défini à une constante près. On peut alors définir une tension entre deux points du circuit électrique.

$$u_{ab} = V_b - V_a$$

Loi de Faraday

Faraday au cours de ses expériences à énoncé cette propriété : « *Quand le flux du champ magnétique à travers un circuit fermé change, il apparaît un courant électrique.* »

Cette loi s'exprime sous forme mathématique par la formule :

$$e = -\frac{d\phi}{dt}$$

avec e la tension appelée force électromotrice et ϕ le flux de champ magnétique à travers le circuit fermé.

Ainsi avec un circuit électrique adapté on va pouvoir détecter une variation de champ magnétique sous forme de courant électrique et donc de tension. C'est cette propriété qui est utilisée en IRM ou RMN. Le circuit électrique se présentant sous diverses formes.

Principe de réciprocité

Le principe de réciprocité est très important lorsque l'on développe un détecteur pour l'IRM ou la SRM. En effet ce principe indique que la sensibilité en un point M d'un détecteur de type circuit fermé est lié au champ magnétique qu'il crée en ce même point. Ainsi une sonde qui est capable de créer un champ magnétique intense et homogène sera également un bon détecteur et inversement.

1.5.1.2 Propriétés du champ magnétique

Conservation du flux magnétique

On définit les lignes de champ magnétique comme étant les lignes orthogonales aux équipotentielles du champ magnétique. Si l'on considère un contour fermé alors l'ensemble des lignes de champ qui s'appuient sur ce contour définissent un tube de champ magnétique. Le flux d'un champ magnétique dans un tube de champ magnétique se conserve.

1.5.2 Sonde de mesure

Une sonde IRM ou SRM est composée de deux parties. La première partie est le support, la deuxième est la partie active de la sonde, le système d'émission réception, qui est usuellement appelée bobine.

Une bobine est en fait un circuit électronique fermé ce qui, conformément à la loi de Faraday, permet la détection de variations de champ magnétique. Comme tout appareil de détection une bobine se doit d'être la plus possible adaptée à l'étude. Au final beaucoup de paramètres rentrent en compte pour l'élaboration de la sonde, nous allons en présenter une partie.

1.5.3 Contraintes imposées lors de la construction d'une sonde

Les contraintes sont multiples lorsque l'on développe une sonde pour IRM ou SRM. Elles peuvent être de natures diverses, physiques, de sécurité ou sont

imposées par rapport au conventions usuelles. Enfin certaines contraintes s'appliquent au support ou à la bobine tandis que d'autres s'appliquent aux deux. Nous avons regroupé une partie de ces contraintes et des solutions associées dans la liste qui suit :

- contraintes de sécurité dues à la présence d'un champ magnétique :
  - Utilisation de matériaux non magnétiques. Pour la partie support il est courant d'utiliser des matériaux synthétiques comme le plexiglass ou l'époxy qui peuvent s'usiner très facilement et qui sont d'un coût peu élevé. Malgré l'avantage de ces matières il faut tout de même fairte attention au fait qu'elle contiennent pour la plupart des protons et qu'elle peuvent donc renvoyer un signal
- contraintes spatiales dues au diamètre de l'ouverture de l'aimant :
  - Adapter le support de la bobine au volume disponible et privilégier une répartition dans l'axe de l'aimant pour utiliser la forme cylindrique de l'espace disponible.
- contraintes électroniques du fait que la chaîne de traitement est accordée à 50Ω
  - Adapter l'impédance de la bobine à 50Ω de façon à maximiser le signal reçu
- Contraintes dues à la présence d'un animal vivant
  - Installation sur le support de bobine d'un système anesthésie gazeuse
  - Afin de s'assurer que l'animal ne puisse pas trop bouger pendant la durée des acquisitions on doit incorporer au support un système de contention composé d'une barre de dents et de deux barres d'oreille. En effet malgré l'anesthésie l'animal bouge quand même, cela est principalement du au mouvement de la cage thoracique lors de la respiration.
  - Prendre en compte la dépression thermique de l'animal engendrée par l'anesthésie. Afin de compenser cette dépression il est nécessaire d'intégrer au support de la sonde un système de chauffage en parallèle d'un système de mesure de température de l'animal.
  - Mesure des rythmes respiratoire et cardiaque, prévoir une place pour les différents capteurs de mesure ainsi que pour la chaîne de transmission des signaux.

1.5.4 Electronique de la bobine de détection

Les bobines peuvent être modélisées par un circuit électronique de type RLC, je vais présenter ici le fonctionnement d'un circuit de ce type. Pour cela je vais utiliser la notion d'impédance Z qui est le terme reliant l'intensité I, parcourant un composant électronique, à la tension U à ses bornes ($U = ZI$). Ce terme d'impédance est un terme qui dépend de la fréquence.

Le circuit électronique d'une bobine peut être modélisé en prenant en compte trois éléments (c'est le cas pour tout type de circuit électronique). La

résistance du circuit, notée R (considérée ici comme étant constante), la capacité, notée C et l'inductance, notée L. La capacité et l'inductance dépendent de la fréquence du signal.

Si l'on considère ces 3 éléments mis bout à bout l'impédance totale du circuit est la somme de ces impédances. On a alors :

$$Z(\omega) = Z_R + Z_{L(\omega)} + Z_{C(\omega)}$$

Avec ω qui est la pulsation, proportionnelle à la fréquence ($\omega = 2\pi f$).

L'expression développée de l'impédance s'exprime :

$$Z(\omega) = R + jL\omega + \frac{1}{jC\omega} = \frac{U}{I}$$

Avec cette expression de l'impédance on peut voir que la relation entre courant et tension aux bornes de la bobine est dépendante de la fréquence. Le principe d'une bobine est d'avoir une impédance de circuit qui permette d'avoir un signal maximum lorsque l'on se trouve à la fréquence de référence du spectromètre imageur. Si l'on s'intéresse à l'amplitude du signal, on a $|I(\omega)| = \frac{|U(\omega)|}{|Z|}$ avec

$$|Z| = \sqrt{R^2 + (L\omega - \frac{1}{C\omega})^2}$$

L'amplitude de l'intensité est maximale lorsque l'amplitude de l'impédance est minimale (car inversement proportionnelle). Cette amplitude est dépendante de la fréquence, on attend la valeur minimale d'impédance lorsque :

$$\frac{d}{d\omega}\left(\sqrt{R^2 + (L\omega - \frac{1}{C\omega})^2}\right) = 0 \Leftrightarrow \frac{d}{d\omega}\left((L\omega - \frac{1}{C\omega})^2\right) = 0$$

$$\frac{d}{d\omega}\left((L\omega - \frac{1}{C\omega})^2\right) = 2(L + \frac{1}{C\omega^2})(L\omega - \frac{1}{C\omega})$$

Ce dernier terme est égale à 0 lorsque l'on a

$$(L\omega - \frac{1}{C\omega}) = 0$$

Ainsi pour avoir une intensité d'amplitude maximale, il faut que l'on ait

$$\omega = \omega_0 = \frac{1}{\sqrt{LC}}$$

ω_0 est appelé la fréquence de résonance du circuit RLC.

Dans la pratique le circuit de la bobine comporte plusieurs éléments. D'une part la géométrie de la bobine représente l'inductance du circuit, à cette bobine est associé un circuit d'adaptation qui comporte plusieurs capacités variables

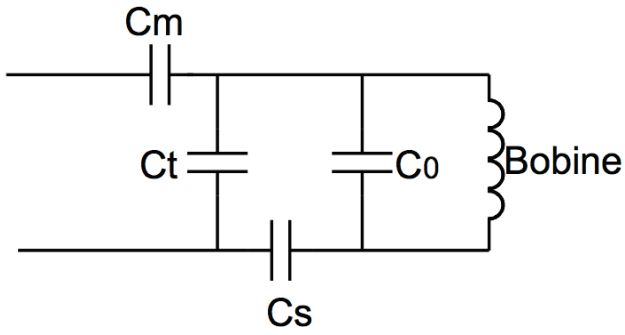


FIGURE 1.38 – Schéma de circuit d'adaptation classique utilisé pour la conception de bobine en IRM et SRM. Ce schéma correspon aux éléments présentés dans le tableau 1.3

répertoriées dans le tableau 1.3. Sur la figure 1.38 j'ai donné un exemple d'un circuit d'adaptation couramment utilisé [45]

Composant	Notation usuelle	Intérêt
Capacité de pré-accord	C_0	Permet une adaptation grossière de l'impédance de la bobine, cette capacité étant en parallèle avec les autres capacités elle permet en fait d'utiliser des capacités plus faible ensuite
Capacité de symétrisation	C_S	Permet de symétriser le circuit par rapport à la masse, cela diminue les couplages capacitifs et le champ électrique. En diminuant le champ éléctrique on diminue également l'échauffement.
Capacité de matching	C_M	Permet d'adapter le circuit à la valeur de 50Ω, le circuit amont de la bobine étant adapté à cette valeur cela permet de réduire les pertes par réflexion du signal, aussi bien en émission qu'en réception.
Capacité de tunning	C_T	Permet d'adapter la fréquence de résonance du circuit à la fréquence de travail de l'imageur.

TABLE 1.3 – Tableau récapitulatif des différents éléments du circuit d'adaptation associé à une bobine.

1.5.5 Les différents types de bobines

Il existe deux grandes classes de bobines. Les bobines homogènes, qui servent souvent à la détection d'un signal sur un volume, et les bobines de surface qui permettent de détecter le signal de façon plus localisée. Ces dernières ont pour défaut de détecter le signal de façon non homogène, mais ces bobines permettent d'avoir un signal plus intense pour les zones à proximitées de celles-ci, elles sont donc le plus souvent utilisées pour des études localisées.

Quelque soit la classe de la bobine celle-ci doit pouvoir créer un champ magnétique variable qui soit perpendiculaire au champ magnétique de l'aimant. Cette orthogonalité est nécessaire si l'on souhaite pouvoir perturber de façon efficace l'équilibre du champ magnétique de l'échantillon, ainsi l'orientation de la bobine dans le spectromètre sera imposée par cette contrainte.

A titre d'exemple je vais comparer ici deux bobines, l'une volumique et l'autre de surface. La particularité de ces deux bobines et qu'elles sont toutes deux constituées de boucles circulaires (1 pour la bobines de surface et deux pour la bobine volumique).

1.5.5.1 Bobines homogènes : l'exemple de la bobine de Helmholtz

Il existent beaucoup de bobines homogènes différentes. A titre d'exemple je vais présenter la bobine de type Helmholtz. Cette bobine est constitué de deux boucles circulaires de même diamètre qui sont disposées selon un axe commun à une distance égale au rayon des boucles. (cf Fig. 1.39).

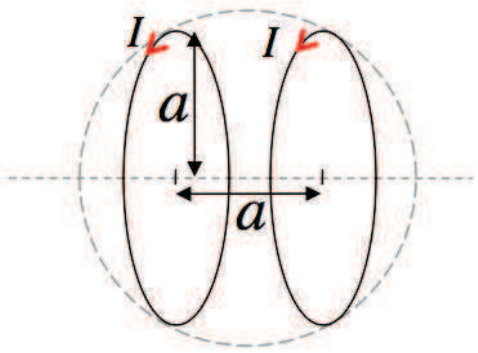


FIGURE 1.39 – Schéma de la bobine de Helmholtz. Cette bobine est constituée de 2 spires parralèles, de même rayons a et disposées à une distance égale au rayon.

En annexe A j'ai calculé le champ magnétique le long de l'axe de la bobine.

Si l'on prend le centre du repère au point central entre les deux spires, alors chacune des spires est placée en $\pm\frac{a}{2}$, l'expression du champ magnétique pour un point situé en z est alors :

$$\vec{B}(z) = \frac{\mu_0 I}{2}\left[\frac{a^2}{\sqrt[\frac{3}{2}]{a^2+(z-\frac{a}{2})^2}} + \frac{a^2}{\sqrt[\frac{3}{2}]{a^2+(z+\frac{a}{2})^2}}\right]$$

Valeur du champ magnétique au niveau de la bobine

Le calcul du champ magnétique créé par la bobine en tout de point de l'espace a été réalisé à l'aide d'un logiciel dédié présenté dans le livre de Mispelter *et al.*[45]. J'ai représenté sur la figure 1.40 le champ magnétique dans trois plans de l'espace. On peut voir sur cette figure que le champ magnétique créé par la bobine est relativement homogène en terme d'intensité, et que la direction du champ magnétique est relativement uniforme au centre de la bobine (cf. fig 1.40 .d avec la représentation des lignes de champ).

Il est intéressant de remarquer que les lignes de courant sont particulièrement bien contenues dans la bobine, ces lignes de courant définissant un tube magnétique de surface relativement constante il est donc logique que l'on observe un champ magnétique relativement homogène au niveau de la bobine.

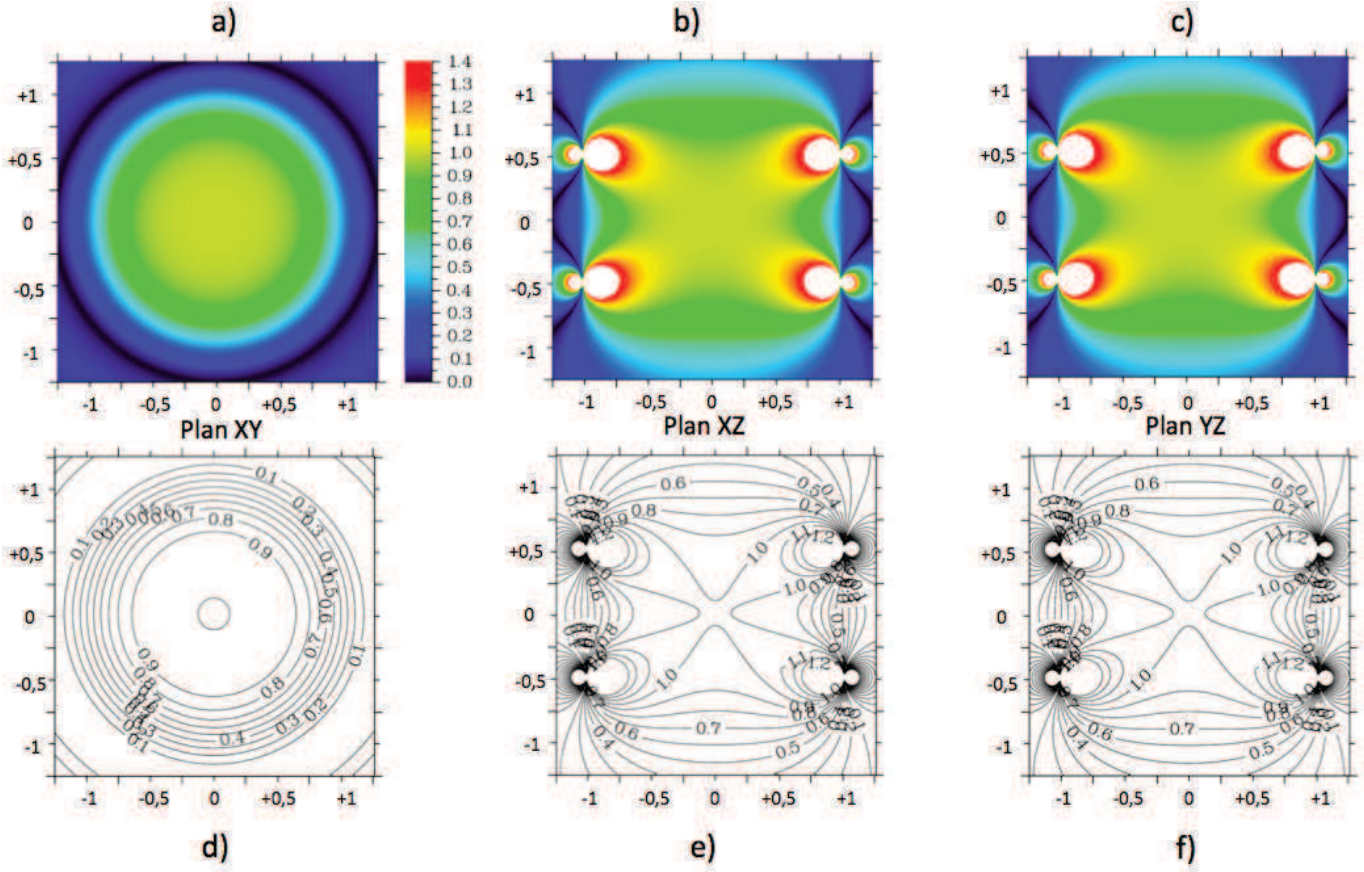


FIGURE 1.40 – Carte du champ créé par une bobine de Helmholtz constituée de deux spires de rayon a. Carte de champ obtenu à l'aide du logiciel développé par J. Mispelter [45]

1.5.5.2 Bobines de surface

Nous allons dans cette partie considérer une bobine de surface constituée d'une simple boucle circulaire. Avec le calcul présenté dans la partie précédente il est possible de calculer le champ magnétique créé le long de l'axe de la bobine en fonction de la distance par rapport au centre de la bobine. Sur la figure 1.42 on peut voir que la valeur du champ magnétique créé diminue fortement avec la distance. A une distance de a (le rayon de la boucle) la valeur du champ a déjà diminué de 65%.

Sur la figure 1.41. a, b, et c on peut voir que le champ magnétique est symétrique par rapport au plan passant par la boucle ainsi que par rapport aux plans perpendiculaires à la boucle passant par le centre de celle ci. On peut également remarquer que le champ est maximum dans le plan de la bobine. Plus on va s'éloigner du centre de la bobine et plus le champ magnétique va diminuer. Cela est en accord avec le principe de conservation du flux dans un tube de champ magnétique. En effet sur les figure 1.41.d, e et f on remarque que les lignes de champs s'écartent de plus en plus, ainsi la surface d'un tube de champ croît constamment, pour garder un flux constant l'intensité du champ magnétique doit diminuer.

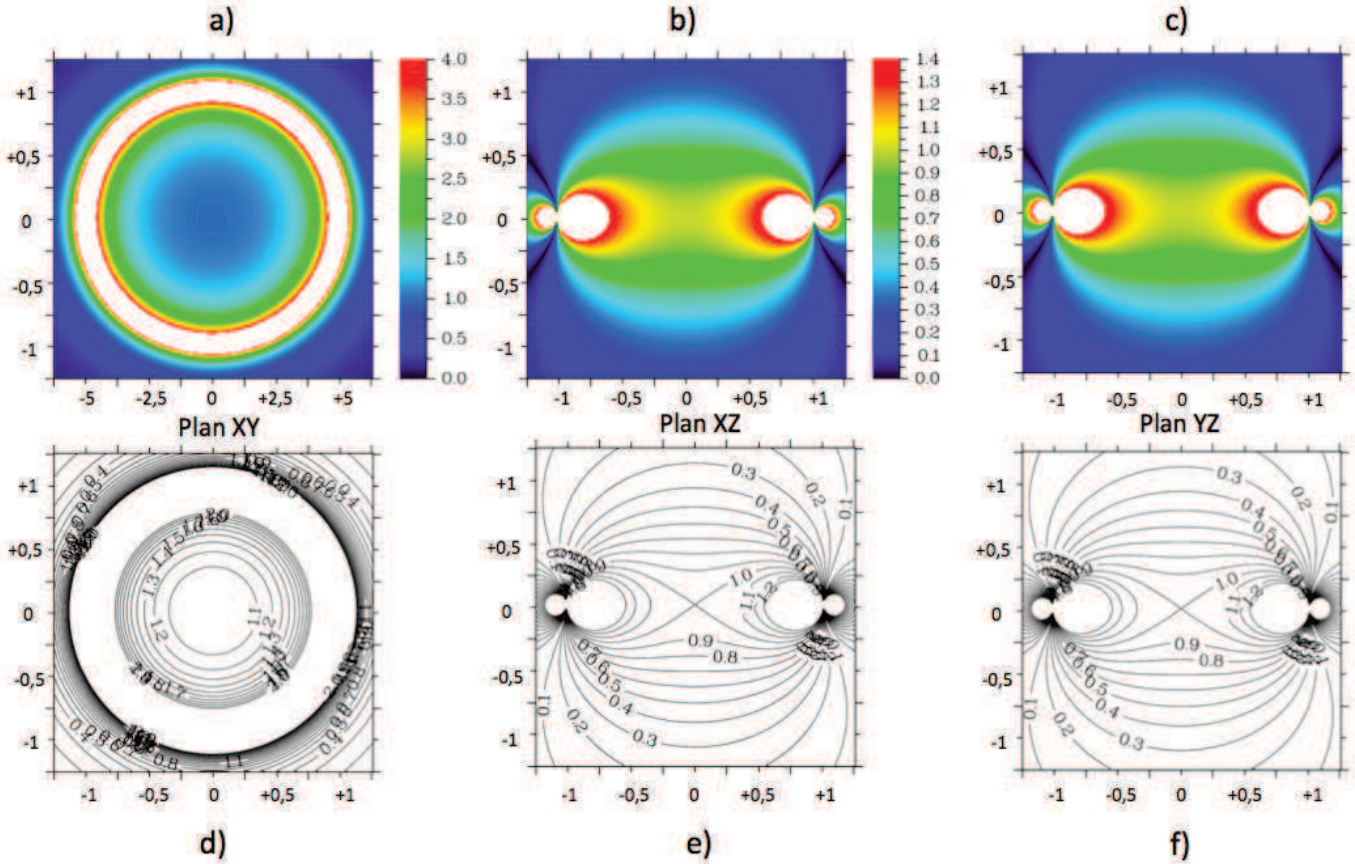


FIGURE 1.41 – Carte du champ créé par une bobine constituée d'une spire de rayon a. Carte de champ obtenu à l'aide du logiciel développé par J. Mispelter [45]

1.5.5.3 Comparaison des deux types de bobines présentées

Nous allons nous intéresser à l'évolution du champ magnétique selon l'axe des deux bobines présentées ci-dessus. J'ai choisi pour cela de représenter sur les figures 1.42 et 1.43 les champs magnétiques normés (par rapport à la valeur maximale), en fonction de la distance à l'axe normée (par rapport au rayon).

Evolution dans le cas d'une simple boucle

Valeur du champ magnétique normalisé par rapport au champ magnétique au centre de la boucle en fonction de la distance au centre de la bobine (boucle de rayon a)

Valeur au centre de la bobine :

$$B(0) = \frac{\mu_0 I}{2} \frac{a^2}{\sqrt[\frac{3}{2}]{a^2}}$$

Valeur en fonction de la distance par rapport au centre (distance exprimée en fonction de a) :

$$B(ax) = \frac{\mu_0 I}{2} \frac{a^2}{\sqrt[\frac{3}{2}]{a^2 + (xa)^2}} = \frac{\mu_0 I}{2} \frac{a^2}{\sqrt[\frac{3}{2}]{a^2}} \frac{1}{\sqrt[\frac{3}{2}]{1 + x^2}}$$

Ainsi on obtient facilement l'expression du champ magnétique normalisé par rapport à la distance :

$$\frac{B(ax)}{B(0)} = \frac{1}{\sqrt[\frac{3}{2}]{1 + x^2}} \tag{1.6}$$

Evolution dans le cas de la bobine de Helmholtz

Valeur au centre de la bobine ($z = 0$), point équidistant des deux boucles :

$$B(0) = \frac{\mu_0 I}{2} \frac{2a^2}{\sqrt[\frac{3}{2}]{a^2 + \left(\frac{a}{2}\right)^2}} = \frac{\mu_0 I}{2} \frac{2a^2}{\sqrt[\frac{3}{2}]{\frac{5a^2}{4}}} = \frac{\mu_0 I}{2} \frac{a^2}{\sqrt[\frac{3}{2}]{a^2}} \frac{2}{\sqrt[\frac{3}{2}]{\frac{5}{4}}}$$

Valeur en fonction de la distance par rapport au centre (distance exprimée en fonction de a) :

$$B(ax) = \frac{\mu_0 I}{2} \left[\frac{a^2}{\sqrt[\frac{3}{2}]{a^2 + (ax - \frac{a}{2})^2}} + \frac{a^2}{\sqrt[\frac{3}{2}]{a^2 + (ax + \frac{a}{2})^2}} \right]$$

$$B(ax) = \frac{\mu_0 I}{2} \frac{a^2}{\sqrt[\frac{3}{2}]{a^2}} \left[\frac{1}{\sqrt[\frac{3}{2}]{1 + (x - \frac{1}{2})^2}} + \frac{1}{\sqrt[\frac{3}{2}]{1 + (x + \frac{1}{2})^2}} \right]$$

Ainsi on obtient facilement l'expression du champ magnétique normalisée par rapport à la distance :

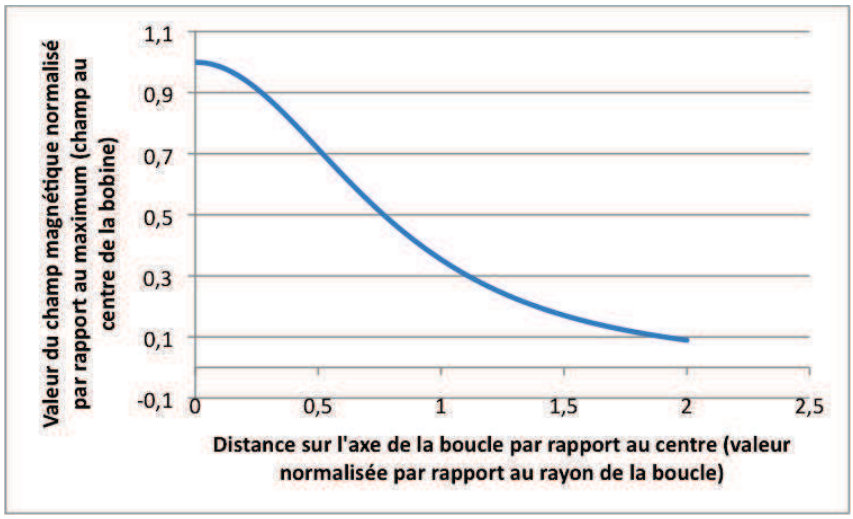


FIGURE 1.42 – Evolution, selon l'axe de la bobine, du champ magnétique crée par une circulation de courant dans une boucle. Le graphique représente la valeur normalisée du champ par rapport au champ maximum (au centre de la boucle). Courbe obtenue à partir de l'équation 1.6

$$\frac{B(ax)}{B(0)} = \frac{\sqrt[3/2]{\frac{5}{4}}}{2}\left[\frac{1}{\sqrt[3/2]{1+(x-\frac{1}{2})^2}} + \frac{1}{\sqrt[3/2]{1+(x+\frac{1}{2})^2}}\right] \tag{1.7}$$

1.5.5.4 Bobine de surface ou bobine volumique

Comme on peut le voir avec cette partie les deux types de bobines, de surface et volumique, ont des propriétés totalement différentes. Si l'on se réfère à l'intensité du champ magnétique, selon l'axe central, créé par les deux bobines présentées on s'aperçoit que la bobine de surface créé un champ très hétérogène par rapport au champ créé par la bobine de Helmholtz (malgré la similarité qui existe entre ces deux bobines, la bobine de Helmholtz étant tout simplement l'association de deux boucle de surface).

En faisant cette observation on pourrait penser que les bobines volumiques sont bien meilleures, surtout lorsque l'on tient compte du principe de réciprocité, en effet ces bobines se révèlent être de bien meilleurs détecteurs lorsque l'on travaille sur un volume qui peut être adapté à la bobine.

Lorsque l'on travaille sur le vivant il en est autrement. Ainsi il n'est pas toujours possible d'adapter l'échantillon à la bobine mais c'est bien l'inverse que l'on doit faire. A titre d'exemple je vais maintenant présenter deux bobines, une boucle de surface, et une bobine de Helmholtz mais en m'intéressant aux tailles relatives de ces deux bobines, tailles qui devront êtres adaptées à l'échantillon en question qui est considéré comme étant dans un premier cas une tête de souris, dans un deuxième cas une souris corps entier.

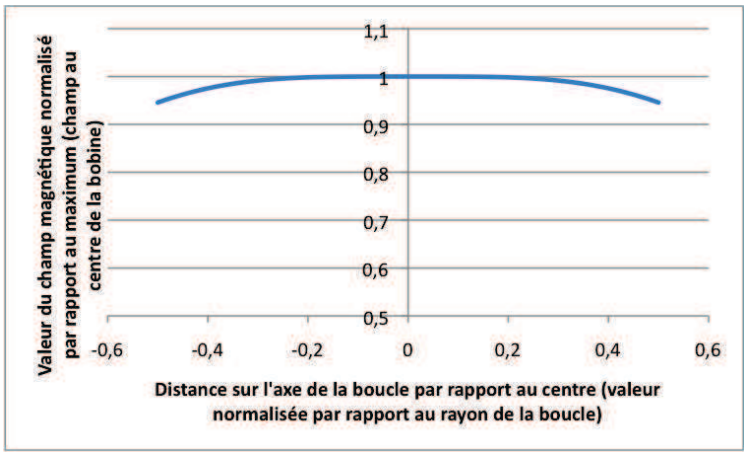


FIGURE 1.43 – Evolution, selon l'axe, du champ magnétique crée par une bobine de Helmholtz. Le graphique représente la valeur normalisée du champ par rapport au champ maximum (au centre de la bobine, à équidistance des deux boucles). Les deux boucles se trouvent respectivement en +0,5 et −0,5. Courbe obtenue à partir de l'équation 1.7

Bobine adaptée à l'étude d'un cerveau de souris

On va ici considérer une tête de souris qui fait environ 3 cm de long pour 2 cm de large.

Pour imager le cerveau d'une souris nous allons avoir besoin d'une bobine de surface dont le diamètre est de l'ordre de grandeur de la largeur de la tête de la souris. Ainsi une bobine de surface d'un diamètre de 13 mm suffit amplement.

Afin d'imager la même zone avec une bobine de Helmholtz il va falloir une bobine dont l'espace inter-spire soit supérieur à la largeur de la tête de la souris. Ainsi il est nécessaire d'utiliser une distance l d'au moins 20 mm entre les boucles. Comme cette distance est liée au diamètre D des boucles $D = 2l$. Ainsi on va devoir utiliser des boucles de diamètre beaucoup plus grand pour la bobine de Helmholtz que dans le cas d'une simple boucle de surface. Cela va avoir deux conséquences. Une géométrie qui ne va pas être la plus adaptée à l'étude (zone accessible beaucoup plus grande que la zone d'intérêt), et une intensité de champ magnétique qui va être plus faible au final que dans le cas d'une boucle de surface adaptée à l'étude.noyaux

Bobine adaptée à l'étude d'une souris corps entier

Pour imager le corps entier d'une souris si l'on souhaite le faire avec une bobine de surface il est nécessaire d'utiliser une bobine qui recouvre entièrement la souris. Cela signifie d'utiliser une bobine d'un diamètre de l'ordre de 6 cm.

En utilisant une bobine de Helmholtz avec des spires de même taille on va alors avoir une distance inter-spires de 3 cm, un tel écart est suffisant pour y placer une souris. En considérant une telle bobine de Helmholtz avec des spires

de la même taille que la bobine de surface on va alors avoir une meilleure homogénéité du signal ainsi qu'un champ magnétique créé plus important. Ainsi dans ce cas là c'est la bobine volumique qu'il est préférable d'utiliser.

1.5.6 Bilan sur les sondes

J'ai fait le choix dans cette partie de présenter une bobine de Helmholtz comme exemple de bobine volumique. J'ai fait ce choix dans le but de présenter, de façon simple, la logique à suivre pour le choix entre les différents types de bobines. En pratique le type de bobine volumique qui est le plus utilisé est la bobine « birdcage ».

Dans cette partie j'ai présenté ce qu'est une sonde en IRM ou SRM du petit animal. La sonde est donc constituée de deux parties bien distinctes, le support et le détecteur, mais qui doivent s'adapter les unes aux autres. De plus le paramètre le plus important est le travail *in vivo*. Le fait de travailler sur l'animal vivant impose des contraintes à la fois pour l'élaboration du support (matériels de suivie des paramètres physiologiques, anesthésie ...) mais également sur la sonde à utiliser. Dans la quasi totalité des expériences c'est le sujet de l'étude, et donc la structure d'intérêt, qui va nous imposer le détecteur si l'on souhaite avoir le meilleur signal possible. Une fois un support déterminé et un type de bobine défini il reste encore beaucoup de travail. En effet comme je l'ai dit plus haut les deux bobines présentées ne sont que deux exemples et il existe beaucoup de géométries possible pour un détecteur, qu'il soit volumique ou surfacique.

Chapitre 2

Construction d'une sonde pour la spectroscopie ^{1}H filtrée ^{13}C

Comme indiqué en introduction, au cours de ma thèse j'ai dû construire une sonde de détection, incluant la double bobine et le support, pour le travail en spectroscopie proton filtrée carbone ^{13}C localisé sur le cerveau de souris. Je vais présenter ce travail dans ce chapitre.

2.1 Structure à 2 canaux

2.1.1 Les différents montages pour les acquisitions proton filtrées ^{13}C

La sonde développée est une sonde prévue pour être utilisée dans le cadre d'acquisitions proton filtrées carbone ^{13}C (que l'on notera également $^{1}H-^{13}C$). Dans la littérature il est possible de trouver différentes structures pour ce genre de sonde. Les associations les plus courantes sont les deux suivantes :

- bobine de surface en proton et bobine de surface en carbone [69, 31] ;
- bobine de surface en quadrature pour le canal proton et bobine de surface pour le canal carbone [78, 56, 77] ;

Il est également possible de trouver des systèmes comprenant deux bobines de surfaces carbones disposées en quadrature en parallèle d'une bobine proton [70], ou bien des combinaisons avec bobine volumique proton (birdcage) et bobine de surface carbone.

Dans le cadre de notre étude nous avons fait le choix de nous baser sur le montage déjà développé au sein de l'équipe pour le même type de détecteur conçu pour le rat. Ce montage est un montage comprenant deux bobines de surfaces (1 pour la voie proton, 1 pour la voie carbone). Ce choix se justifie très facilement car les bobines de surface sont en général les mieux adaptées pour l'étude du cerveau (meilleur SNR).

La taille de la bobine proton est déterminée par la taille de la zone d'intérêt. Afin d'avoir une bobine qui nous permettent d'obtenir l'information depuis toute la largeur du cerveau de l'animal nous avons choisi une bobine d'une taille de 13 mm . Ensuite la taille de la bobine carbone est choisie plus grande que la bobine proton de sorte d'avoir une zone de découplage qui couvre tout le volume de détection de la bobine proton.

A partir de cette configuration de bobine, nous avons travaillé sur le circuit d'adaptation afin d'avoir un dispositif qui soit le plus efficace possible.

2.1.2 Choix de la structure pour l'ensemble support et détecteur

Lorsqu'il a s'agit de construire la bobine il a fallu prendre plusieurs contraintes en compte. Certaines de ces contraintes ont déjà été présentées dans la partie

1.5.3. Je vais en préciser ici quelques unes ainsi qu'en présenter d'autres. Ensuite je présenterai les différentes géométries/configurations qui ont été testées pour le dispositif de mesure.

2.1.2.1 Contraintes liées à la construction de la sonde

Dans le cadre de nos travaux les acquisitions sont réalisées avec le canon de gradient $BG06S$ Bruker. Ce canon de gradient possède un diamètre interne de 60 mm afin d'être adapté à des études sur la souris et d'avoir des gradients intenses (gradients jusqu'à 900 $mT.m^{-1}$). Un tel diamètre laisse peu de place pour y insérer le support, le dispositif de détection ainsi que l'animal. De plus, afin de disposer du signal le plus intense possible il faut veiller à ce que la zone d'intérêt (dans notre cas le cerveau de l'animal) soit au centre de l'aimant. Ainsi la position de l'animal est imposée.

La sonde développée est une sonde à 2 canaux d'excitation, il est donc nécessaire de composer avec 2 bobines et 2 circuits d'adaptation ce qui va occuper plus d'espace. Notre sonde va être dédiée à l'étude du métabolisme cérébral, la conception du dispositif doit donc tenir compte de la nécessité d'avoir un accès dégagé au niveau de la tête de l'animal pour pouvoir approcher au plus près les bobines.

2.1.2.2 Support de l'animal

Pour le support de l'animal nous avons choisi des matières compatibles avec un environnement magnétique. Nous avons donc choisi d'utiliser un tube en epoxy d'un diamètre extérieur de 59 mm qui a servi a tenir l'ensemble de la structure. Sur celui-ci ont été monté deux éléments. Un élément qui permet de fixer le support sur une glissière. Un autre élément qui sert de berceau pour accueillir l'animal. Ces deux éléments sont fait en plexiglass.

Berceau de l'animal

Le berceau de l'animal a été conçu pour accueillir plusieurs éléments (cf. Fig.2.1 et 2.2)

- l'animal, ce qui implique que le support doit intégrer de quoi assurer la contention de l'animal, c'est à dire les barres d'oreilles, ainsi que la barre de dents. La position de la barre de dents est ajustable en profondeur et les barres d'oreilles sont adaptables en hauteur. Ces deux ajustements permettent en général de travailler sur toutes les souris adultes ;
- l'arrivée du gaz pour l'anesthésie, que j'ai choisi de faire arriver par la barre de dents. Ainsi la barre de dents est un tube PVC doté d'un masque recouvrant le museau de l'animal par lequel arrive le gaz ;
- une place est prévu pour des tubes en plastique souple permettant la circulation d'eau tiède afin de maintenir l'animal au chaud (l'anesthésie pouvant entrainer une baisse de la température de l'animal d'autant plus lorsque que celle-ci est prolongée) ;

- le berceau est conçu de façon à servir de support pour la sonde de mesure. Afin de pouvoir s'adapter aux différents animaux, il est important de prévoir un support qui soit mobile en hauteur ainsi qu'en profondeur. Etant donnée que la bobine est conçue de façon à pouvoir imager le cerveau de la souris sur toute sa largeur, il n'est pas nécessaire de prévoir un ajustement latéral précis.
- afin de suivre le rythme respiratoire de l'animal nous avons également disposé un capteur de pression sous le ventre de l'animal. Celui-ci ne prend quasiment pas de place et ne nécessite pas d'aménagement particulier, il en est de même avec le suivi en température de l'animal qui se fait via une sonde rectale .

Le berceau et le support de la sonde, intégrée à celui-ci, sont représentés de façon schématique sur les figures 2.1 et 2.2. En légende sont indiqués les différents emplacements où s'intègrent, entres autres, les barres d'oreilles et la barre de dents.

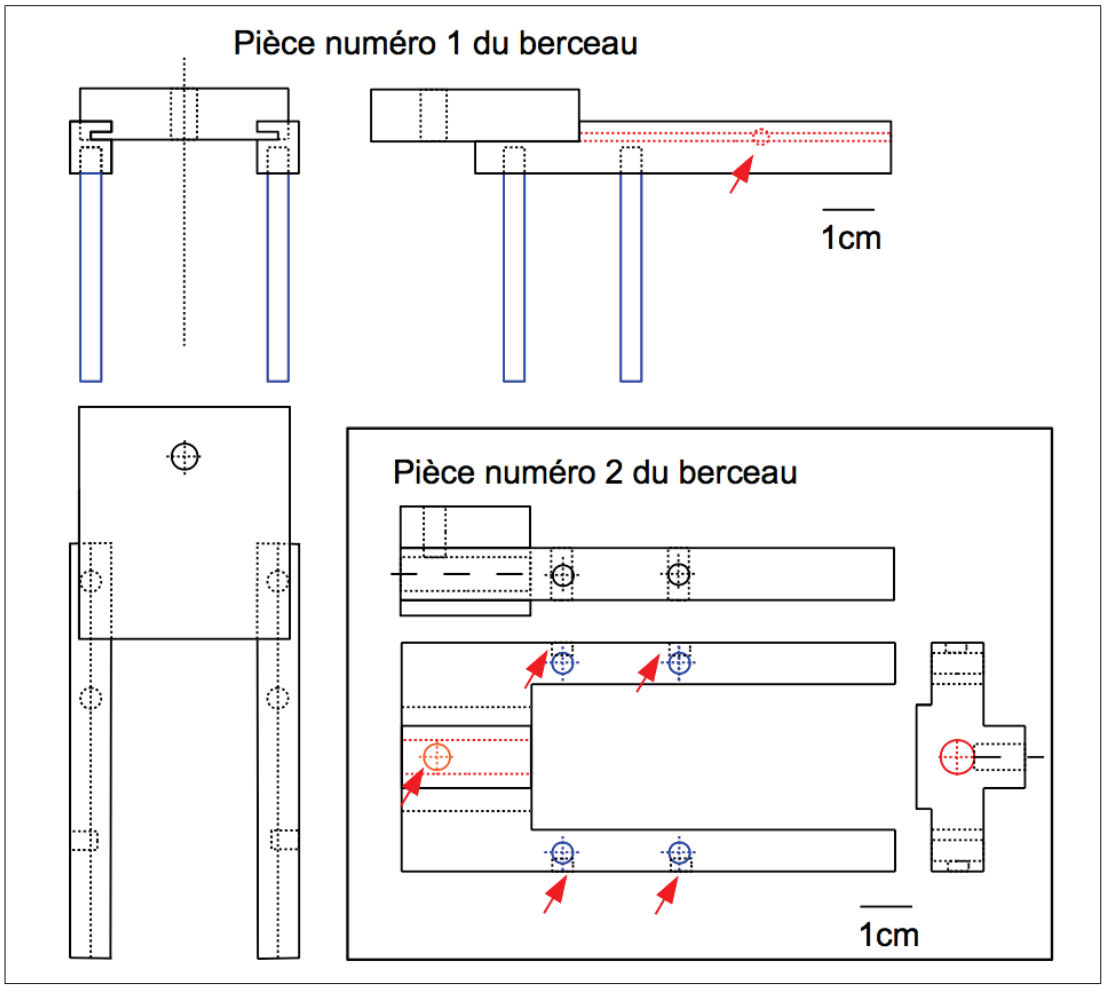


FIGURE 2.1 – Schéma des deux premières pièces constituant le berceau de l'animal. Pour chacune des pièces j'ai représenté 3 vues. La pièce numéro 1 sert à porter la bobine. Le circuit d'adaptation se glisse dans la rainure mise en évidence en rouge. La position de la bobine peut ainsi être ajustée en profondeur (on dispose de quelques centimètres). Du fait des tiges (représentées en bleues) il est également possible de régler la position en hauteur. Cette partie se fixe dans la pièce 2 du support. La position peut être fixée grâce aux vis qui peuvent être insérées au niveau des flèches rouges (pièce 2). La pièce numéro 2 accueille également la barre de dents (zone mise en évidence en rouge) qui sert à la fois à la contention de l'animal mais aussi au transport du gaz anesthésique (barre de dents qui peut également être fixée). La pièce numéro 2 vient se poser sur la troisième pièce qui constitue le berceau de l'animal.

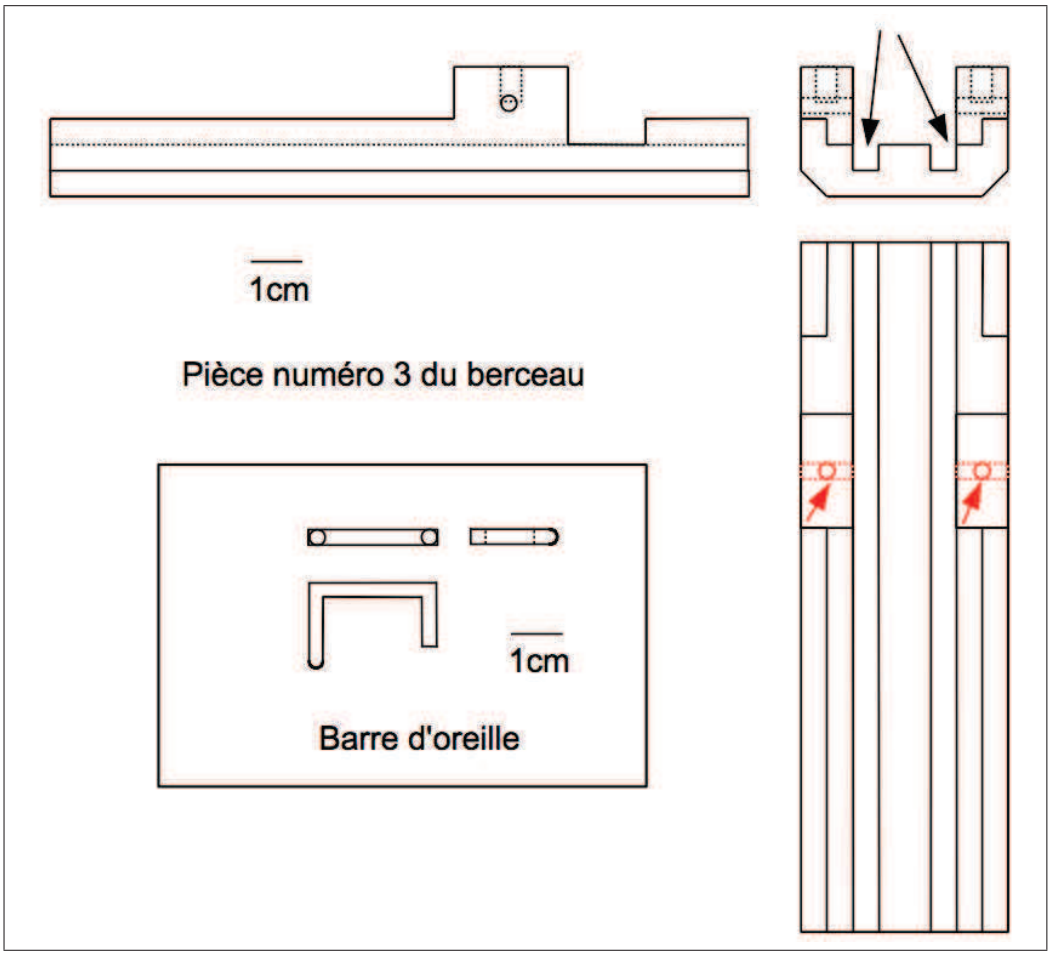


FIGURE 2.2 – Schémas de la troisième partie constituant le berceau de l'animal ainsi qu'une barre d'oreille. J'ai représenté trois vues pour les deux éléments. La pièce numéro 3 est la pièce sur laquelle est posée la souris. On dispose d'une largeur de 3 cm pour disposer la souris, des petits rebords de 0,5 *cm* permettent de s'assurer que la souris anesthésiée ne bouge pas de façon latérale. Sur le support de la souris j'ai prévu des rainures pour accueillir le circuit dans lequel passe l'eau chaude pour réchauffer l'animal (flèches noires qui montrent les sillons). Cette pièce est assez longue, ainsi elle permet de faire reposer, en plus de la souris, le capteur de respiration et la sonde de température. Sur la pièce numéro 3 on peut voir l'endroit où se fixe les barres d'oreilles (en rouge). Les barres d'oreilles se fixent grâce à des vis.

2.1.2.3 Evolution des bobines de mesures

Comme je vais le présenter ici, plusieurs géométries de bobines, ou configuration de circuit d'adaptation ont été testés. L'idéal aurait été de présenter les performances de chacun dans un tableau comparatif. Malheureusement, pour des questins de coût, j'ai dû démonter certains montages pour récupérer les

capacités qui étaient dessus, il n'est donc pas possible de les re-tester dans les mêmes conditions.

Comme je l'ai présenté plus haut il existe différentes configurations couramment utilisées pour les acquisitions de types $^{1}H -^{13} C$. Mon choix s'est porté sur deux bobines de surfaces mais différentes bobines ont été testées. D'une part deux types de matériaux ont été utilisés pour la réalisation des bobines, des plaques de circuits imprimés en epoxy et des fils de cuivre argenté.

Je me suis d'abord tourné vers la solution du circuit imprimé car celle-ci représente l'avantage de pouvoir réaliser des bobines centrées entre elles avec une bonne précision. Deux géométries ont été testées, l'une étant la combinaison de deux bobines de surfaces carrées, et l'autre étant la combinaison d'une bobine dite « butterfly » pour la voie proton et une bobine carrée pour la voie carbone. Dans ces deux cas les bobines ont été réalisées à l'aide d'une circuit imprimé en cuivre d'une épaisseur de 100 μm.

J'ai choisi de tester la bobine butterfly dans un premier temps car cette bobine est connue pour limiter le champ électrique local, et ainsi limiter le dépôt d'énergie [28], dans le cas de la butterfly, j'ai testé plusieurs montages (cf. Fig. 2.3) Nous avons par contre observé des pics parasites importants, et en particulier une interaction non négligeable entre les deux bobines dans le cas de l'utilisation de la bobine butterfly pour la voie proton. Ainsi le choix de cette configuration n'a pas été retenu. Nous avons observé le même type de problème avec l'utilisation de bobines carrées réalisées en circuits imprimés.

Dans le cas de la bobine de type butterfly les problèmes peuvent s'expliquer par la façon dont la bobine était conçue. En effet la conception de cette bobine exige de fabriquer un pont pour relier les deux « ailes » de la bobine. Ces problèmes peuvent également provenir de la connexion qui existe entre les circuits d'adaptation et les bobines. En effet en choisissant de faire des bobines en circuit imprimé il est nécessaire de relier les bobines aux circuits d'adaptation à l'aide de fils supplémentaires. Ainsi cela rajoute des raccords, des soudures et donc possiblement des pertes et des sources de parasites.

Au niveau des bobines, le choix final s'est porté sur la même solution que dans le cas du montage réalisé pour le rat par l'équipe précédente [17]. Pour cela nous avons choisi d'utiliser un fil de cuivre argenté d'un diamètre de 1,5 mm pour la bobine proton et d'un diamètre de 2,5 mm pour la bobine carbone.

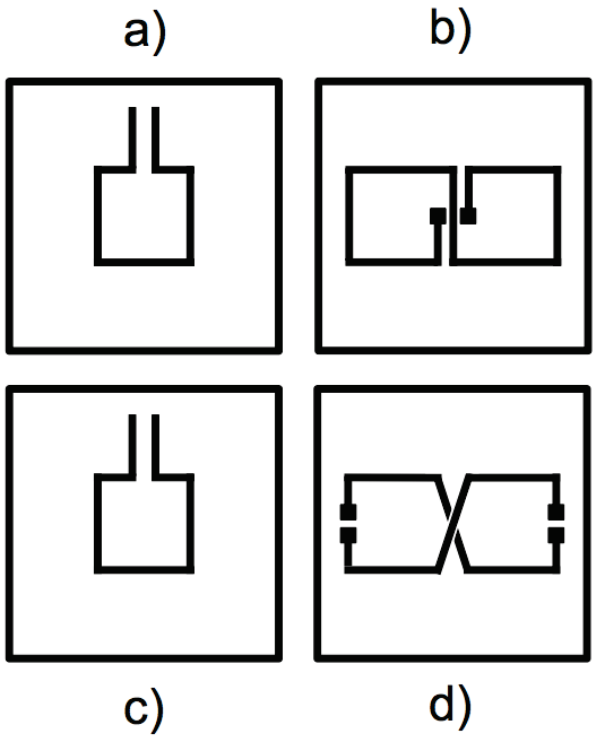


FIGURE 2.3 – Schéma des typons utilisés pour réaliser les bobines en circuits imprimés. On a représenté ici deux associations de bobines proton/carbone (a/b et c/d). En a et c : typons utilisés pour les bobines protons, les deux sont identiques. En b et d sont représentés les typons utilisés pour la voie carbone. En b on a l'exemple d'une bobine butterfly où l'on a la connexion au circuit d'adaptation qui se fait au centre. En d on a un exemple de bobine qui est segmentée à trois endroits. L'un permet de réaliser la connexion au circuit d'adaptation, l'autre, symétrique comporte une capacité, le troisième (central) est un pont réalisé à l'aide d'un fil de cuivre argenté, la segmentation au centre n'a donc lieu que pour des raisons pratique.

2.1.2.4 Evolution des circuits d'adaptation

La structure des circuits d'adaptation est la même dans les deux cas. Le circuit utilisé est décrit sur la figure 2.4 [45]. Il correspond au circuit décrit dans la partie 1.5.4. Il y a 3 configurations différentes qui ont été testées pour les circuits d'adaptation. La première solution envisagée a été de mettre les deux circuits imprimés face à face des deux côtés d'une même plaque d'epoxy (cf.Fig 2.5.A). Lors des tests il a été observé un très fort couplage entres les deux voies ainsi que de nombreux pics parasites. Dans un premier temps j'ai décidé de changer l'implantation des bobines. Au début les parties reliant les bobines aux circuits d'adaptations étaient très proches les une des autres. J'ai donc décidé de les éloigner en les mettant de façon diamétralement opposées (cf.Fig 2.5.B) mais les effets de couplages ont subsisté.

Il a donc été choisi d'éloigner au maximum les circuits d'adaptation en les plaçant têtes bêches, des deux côtés de la plaque d'époxy comme représenté sur la figure 2.5.C. Avec cette configuration il a été possible d'observer un signal sans pics parasites.

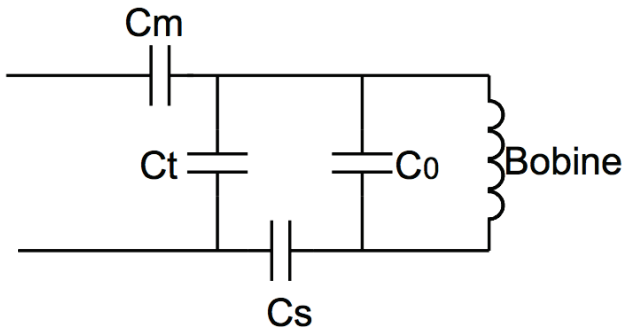


FIGURE 2.4 – Schéma du circuit d'adaptation utilisé pour les deux bobines. C_S : capacité de symétrisation, C_0 : capacité de pré-accord, C_M : capacité de matching, C_T : capacité de tunning. Les valeurs de capacités sont différentes en fonctions des circuits d'adaptation. Ces valeurs sont calculées de façon à adapter le circuit à la fréquence désirée.

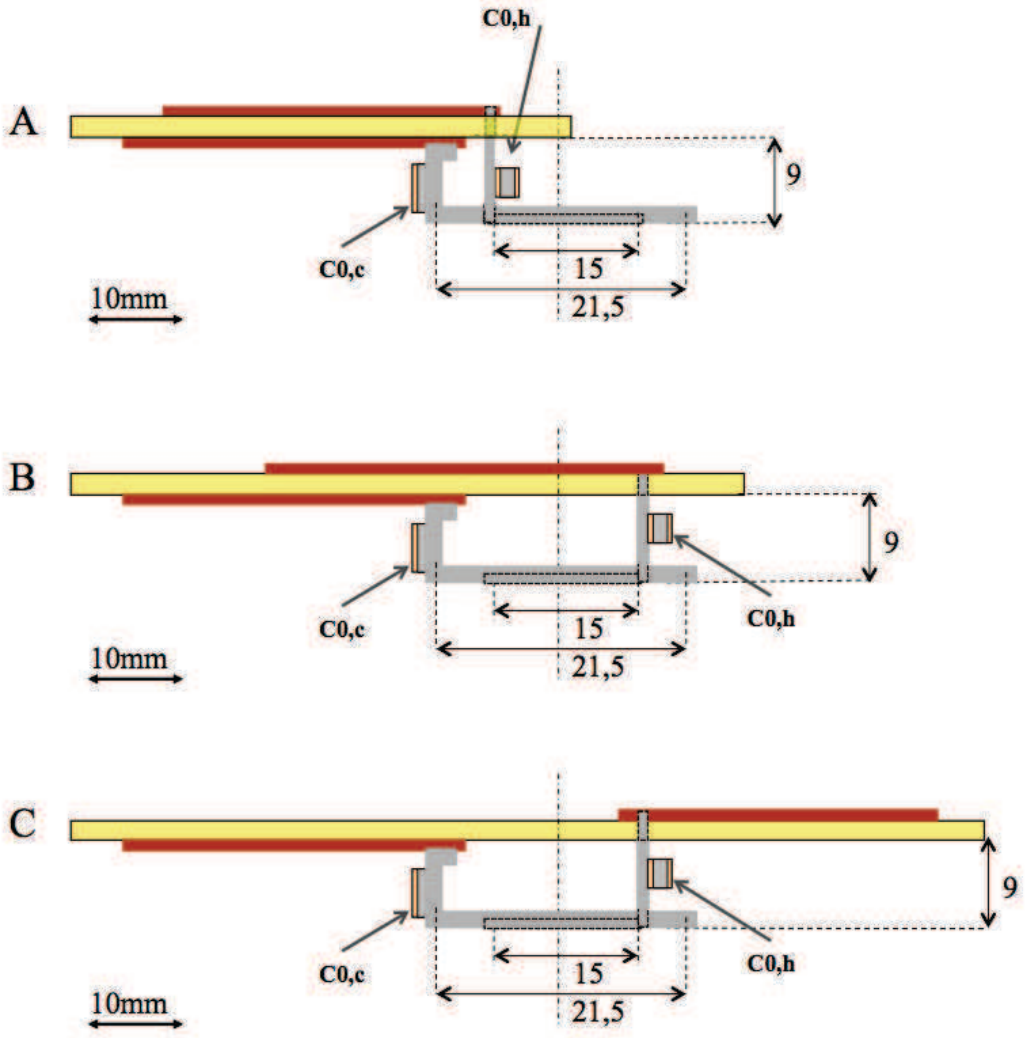


FIGURE 2.5 – Schéma indiquant 3 configurations testées pour la disposition des circuits d'adaptation les uns par rapport aux autres. Sur ces figures les zones en jaune pâle, représentent la plaque d' epoxy, les parties grises représentent les bobines avec leur parties verticales qui servent à relier les bobines au circuit d'adaptation. Les parties en bordeau représentent les zones où l'on retrouve le cuivre qui compose les circuits d'adaptation.

La configuration finale du détecteur est donnée sur la figure 2.6. On y retrouve les deux bobines circulaires concentriques ainsi que la disposition têtes bêches des circuits d'adaptations.

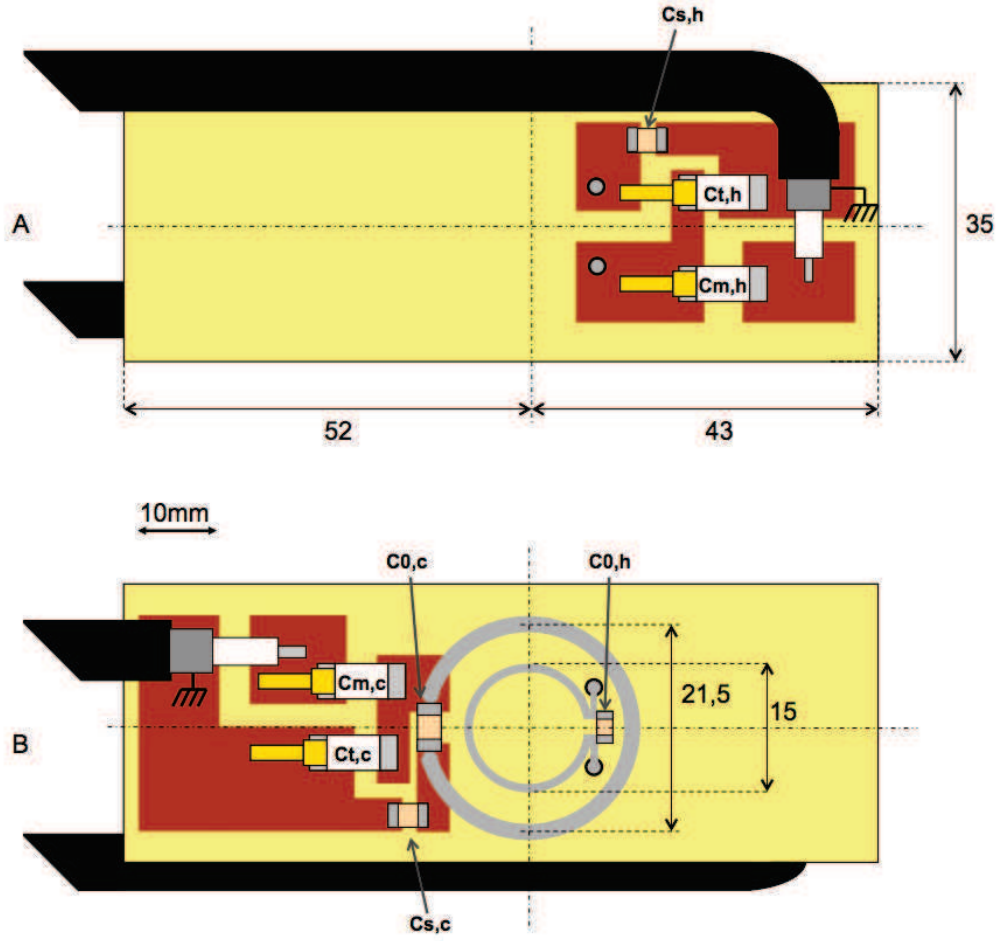


FIGURE 2.6 – Schéma de la sonde réalisée. La configuration finale correspond à une deux bobines de surfaces circulaires concentriques. Les circuits d'adaptations sont disposé des deux cotés d'une plaque de circuit imprimés et sont disposées « tête bêche » de chaque côté de la plaque de support.

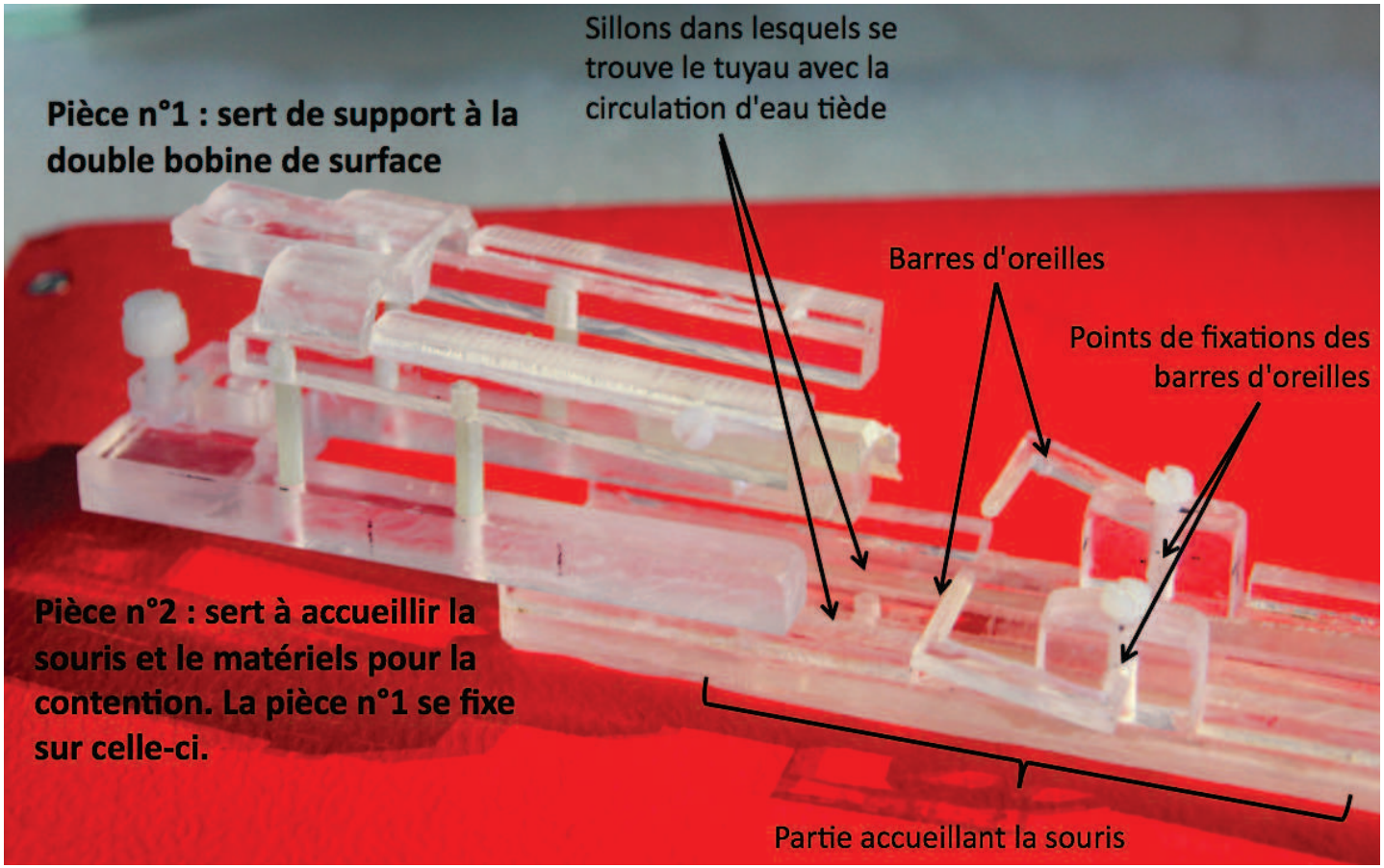


FIGURE 2.7 – Photo du support construit pour accueillir le détecteur. Plusieurs éléments figurent sur cette photo. La pièce n°2 qui accueille la souris sur laquelle se fixent la barre de dents, les barres d'oreilles et la pièce n°1. Cette dernière figure également sur la photo. Elle se fixe sur la pièce n°2 à l'aide de 4 tiges.

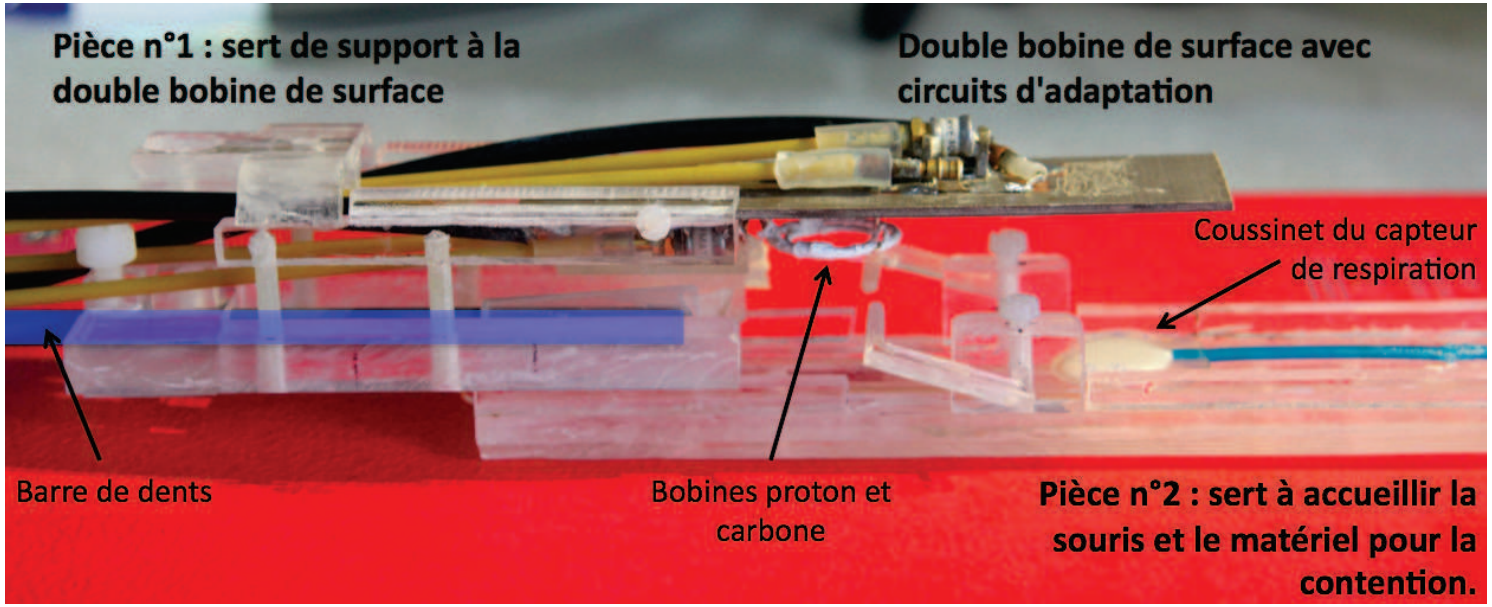


FIGURE 2.8 – Photo sur laquelle on peut voir les éléments figurants sur la figure 2.7 ainsi que la barre de dents (mise en évidence en bleu), le coussinet qui sert de capteur de respiration et le détecteur (double bobine de surface avec les circuits d'adaptation.

2.1.3 Efficacité *in vitro* de la sonde développée

2.1.3.1 Dispositif expérimental pour les acquisitions *in vitro*

Pour les acquisitions *in vitro* nous avons utilisé le dispositif suivant :
- Un amplificateur $BLAH1000$ bruker pour la voie proton, cet amplificateur est utilisé en émission, il possède une bande de fréquence de travail restreinte autour de la fréquence de résonance du proton à 9,4 T.
- Un filtre passe haut sur la voie proton, ce filtre est disposé à l'arrière de l'aimant. Il a pour but de supprimer un éventuel signal capté par la bobine proton qui proviendrait de la bobine carbone.
- Un amplificateur $BLAX1000$ bruker pour la voie carbone, cet amplificateur est utilisé en émission. Il possède une large bande de travail car il peut être utilisé pour travailler sur d'autres noyaux que le carbone.
- Un filtre passe bande sur la voie carbone situé à l'extérieur de la cage de Faraday, ce filtre sert à supprimer un éventuel signal capté par la bobine carbone provenant de la bobine proton.

2.1.3.2 Validation de la bobine pour les acquisitions $^1H -^{13} C$

Sur la figure 2.9 je donne 3 spectres, proton, proton filtré carbone ^{13}C non découplé, et proton filtré carbone ^{13}C découplé, obtenus dans un même voxel avec la bobine dédiée aux acquisitions sur la souris. Pour ces acquisitions j'ai utilisé un fantôme de gel fait à partir de solution de $NaCl$ à 0,9% en masse, contenant :
- 2,5% en masse d'agarose,
- 10 mM de créatine,
- 10 mM d'acétate marqué au carbone ^{13}C,
- de l'azidure de sodium 0,5% en masse, afin d'éviter le développement de moisissure dans le gel.

Les 3 spectres présentés sur la figure permettent de valider la bobine pour deux raisons. Entre le spectre proton et les deux autres on peut voir qu'il y a une parfaite suppression du signal de la créatine qui n'est pas marquée au carbone ^{13}C. Entre les spectres rouge et bleu le ratio entre les amplitudes des pics d'acétate est de 2, ce qui rend compte d'un bon découplage du signal.

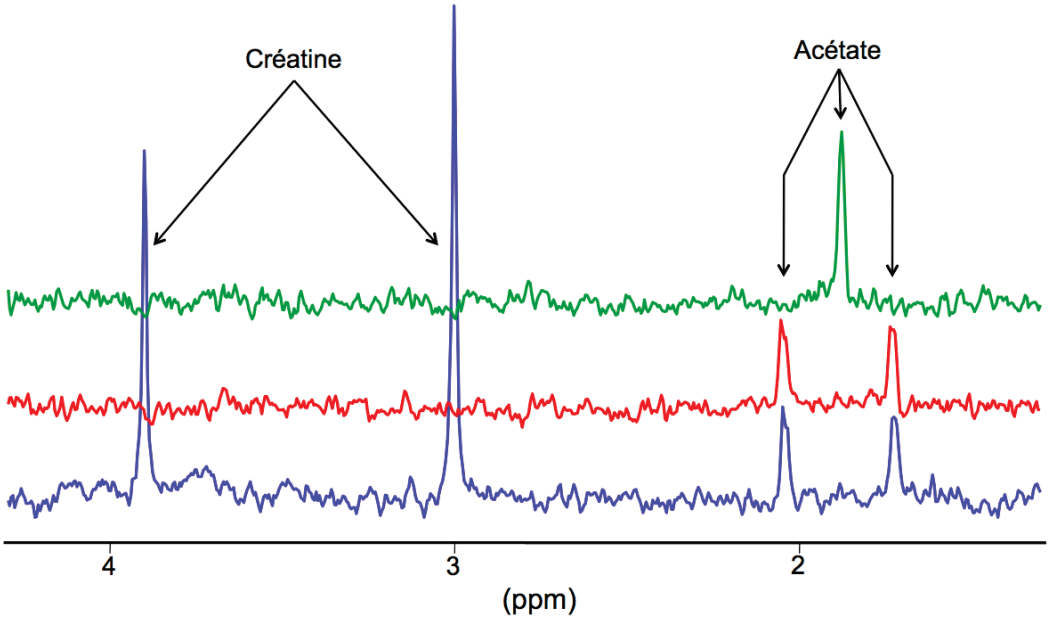


FIGURE 2.9 – Spectres obtenus sur un fantôme de gel contenant de l'acétate marqué au carbone ^{13}C, et de la créatine non marquée. Les 3 spectres sont obtenus sur un voxel cubique de 2,5 mm de côté. Le spectre bleu est obtenu avec une séquence PRESS. En rouge est représenté le spectre obtenu en spectroscopie POCE-PRESS sans découplage carbone ^{13}C. En vert est représenté le spectre obtenu en spectroscopie POCE-PRESS avec découplage.

Les expériences menées sur fantôme de gel ont permis d'optimiser les intensités des impulsions, en particulier pour celles utilisées sur la voie carbone.

2.1.3.3 Comparaison avec le montage rat

Le travail réalisé sur la souris a été effectué suite aux travaux sur le rat de B.T. Doan *et al* [17] au sein de notre équipe. Je pense qu'il est intéressant de comparer les deux dispositifs, rat et souris, dédiés aux études de spectroscopie ^{1}H filtrée ^{13}C.

Pour cette comparaison j'ai utilisé le même type de fantôme que décrit ci-dessus (créatine ^{12}C et acétate ^{13}C) par contre une unique solution a été réalisée pour être répartie dans deux tubes différents, un pour réaliser le fantôme rat, et un pour le fantôme souris. Ainsi on est sûr d'observer les mêmes concentrations, et donc de pouvoir comparer les données entres elles.

Les acquisitions utilisées ont étés identiques dans les deux cas en terme de temps d'écho et de temps de répétition, j'ai réalisé les acquisitions suivantes :

- imagerie axiale pour le placement des voxels de spectroscopie. Taille de voxel de 0,133 × 0,133 × 1 mm^3, RARE 8, $TR = 4\ s$, $TE = 46\ ms$, $NR = 2$;

– séquence PRESS ^1H localisée dans un voxel de $(2{,}5\ mm)^3$ située à 2,5 mm en dessous de la bobine ^1H ; dans le cas de la souris et un voxel de $(4\ mm)^3$ située à 4 mm en dessous de la bobine ^1H ;
– séquence POCE-PRESS sans découplage ^{13}C sur le même voxel ;
– séquence POCE-PRESS avec découplage ^{13}C sur le même voxel.

Les valeurs des impulsions sont optimisées pour les acquisitions dans les deux cas. Les valeurs de SNR obtenues ont été reportées dans le tableau 2.1. Le SNR est calculé en prenant comme signal l'amplitude des pics d'acétate et comme bruit l'écart type du signal dans la zone de 5 à 7 ppm.

Dans le cadre des acquisitions j'ai choisi de prendre des tailles de voxels de $(2{,}5\ mm)^3$ et de $(4\ mm)^3$. Ces tailles sont en faites des tailles équivalentes si l'on travaille sur un cerveau de souris ou un cerveau de rat. La relation entre volume et rapport signal sur bruit étant proportionnelle j'ai donné le SNR équivalent à un voxel de $(2{,}5\ mm)^3$ que l'on obtiendrait avec la bobine rat (ratio des volumes étant proche de 4).

Séquence	PRESS ^1H	POCE-PRESS sans découplage	POCE-PRESS avec découplage
Bobine souris (voxel de $(2{,}5\ mm)^3$)	6,2	7,6	13,1
Bobine rat (voxel de $(4\ mm)^3$)	21,3	29,7	44,2
Bobine rat (voxel de $(2{,}5\ mm)^3$)	5,2	7,4	10,8

Table 2.1 – Tableau comparatif entre les deux bobines rat et souris dédiées à la spectroscopie ^1H filtrée ^{13}C. Le SNR des spectres est calculé en prenant comme signal le pic d'acétate et comme bruit la déviation standard dans la zone de 5 à 6 ppm.

Les valeurs reportées dans le tableau 2.1 indiquent que les résultats obtenus avec la bobine souris sont légérement meilleurs que ceux obtenus avec la bobine rat (on s'en rend compte avec les données rapportées à un voxel de 15,6 μL pour la bobine rat). Une différence entre les SNR de 2,3 peut sembler faible mais cela représente une amélioration du SNR de 21%. Si l'on souhaite récupérer un tel facteur il faudrait augmenter le nombre d'accumulation quasiment de moitié (facteur 1,46).

Les mesures montrent que la bobine souris est un meilleur détecteur dans le cadre d'une acquisition similaire (taille de voxel et distance à la bobine équivalente).

2.2 Mesure de température

Les impulsions de découplage sont connues pour déposer beaucoup d'énergie []. Avant de procéder à toute expérience *in vivo* j'ai donc souhaité nous assurer que les impulsions utilisées avec la séquence POCE-PRESS ne provoquaient pas d'échauffement de l'échantillon. Pour cela nous avons réalisé des mesures de thermométrie sur les échantillons utilisés pour les expériences de réglages des impulsions de la séquence.

2.2.1 Utilisation d'un complexe de lanthanide pour la mesure de la température

Le caractère température dépendant de la fréquence de résonance des protons de l'eau est connu [36], malheureusement, la variation de la position du pic est de l'ordre du centième de *ppm* par °C. Une estimation de la température se basant sur la mesure de la fréquence de résonance de ce pic nécessite une grande précision et est soumise à une grande incertitude. Cela rend impossible l'utilisation de cette méthode pour une étude sur une petite plage de température. Dans [80] Zuo *et al.* décrivent le caractère température-dépendant du spectre proton du $TmDOTP^{5-}$. En effet les positions, en *ppm*, des différents pics de ce produit varient en fonction de la température avec des facteurs de l'ordre de 1 à 2 $ppm/°C$.[1] De plus, cette variation, linéaire en fonction de la température, se retrouve sur une plage de température allant au moins de 15 à 50°C. Un tel produit offre ainsi une bonne résolution en température, sur une plage suffisante, permettant aisément la mesure de température *in vitro* à température ambiante ou *in vivo* de l'ordre du dixième de degré Celsius.

	H_1	H_2	H_3	H_4	H_5	H_6
Déplacement chimique (en *ppm*) à 25°C	−193,7	+92,8	+72,7	+513,6	−398,9	−155,7

Table 2.2 – Valeurs des déplacements chimiques pour les différentes résonances des protons du $TmDOTP^{5-}$. Données extraites depuis [80]

1. le pH de la solution ainsi que les concentrations des autres produits en solution influent également sur ce facteur.

Les mesures de déplacement chimique en fonction de la température ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 500 MHz fonctionnant sous TopSpin 2.1, sur une console AVANCE III équipé d'une station de traitement.

2.2.2 Calibration du système de chauffage du spectromètre RMN

Le spectromètre utilisé pour les mesures de calibration du complexe de lanthanide est équipé d'un système de régulation de température. Ce système nécessite une calibration afin de savoir quelle est la température de sortie pour une température de consigne donnée. Afin de réaliser cette calibration nous nous sommes appuyé sur les résultats présenté dans le livre de [8] dans lequel est rapporté le caractère température dépendant du spectre du méthanol. En effet l'écart entre les deux pics principaux du méthanol varie de façon linéaire en fonction de la température.

Afin de mesurer la température réelle de la sonde en fonction de la consigne nous avons donc utilisé un échantillon de méthanol dilué à 4% dans du méthanol deutéré.

La démarche d'utiliser le méhanol pour calibrer le système de chauffe de la machine, puis de caractériser le produit se justifie pour de part les propriétés propres à ces deux produits. La dépendance du spectre du méthanol à la température est constante mais les variations sont faibles. Le spectre du complexe de lanthanide utilisé admet de grandes variations par rapport à la température mais également une très forte dépendance à la composition de la solution (concentration, pH...). Ainsi j'ai choisi d'utiliser les avantages des deux produits afin de m'affranchir des inconvénients de chacun.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2.3

Température de consigne ($°K/°C$)	Position du pic OH (ppm)	Position du pic CH_3 (ppm)	Ecart entre les pics (ppm)	Température réelle ($°K/°C$)
288,2/15,05	4,19	2,57	1,61	286,5/13,35
292,4/19,25	4,14	2,57	1,56	292,3/19,15
296,5/23,35	4,09	2,57	1,52	297,2/24,05
300,6/27,45	4,05	2,57	1,47	302,6/29,45
304,7/31,55	4,00	2,57	1,43	308,0/34,85
308,85/35,70	3,96	2,58	1,39	312,7/39,55

Table 2.3 – Tableau donnant les valeurs de déplacements chimiques pour les 2 pics principaux du méthanol, ainsi que les températures associées aux différents écarts entre ces pics pour différentes température de consigne de la sonde 5 mm. Les valeurs se trouvant dans ce tableau sont représentées sur la figure 2.10

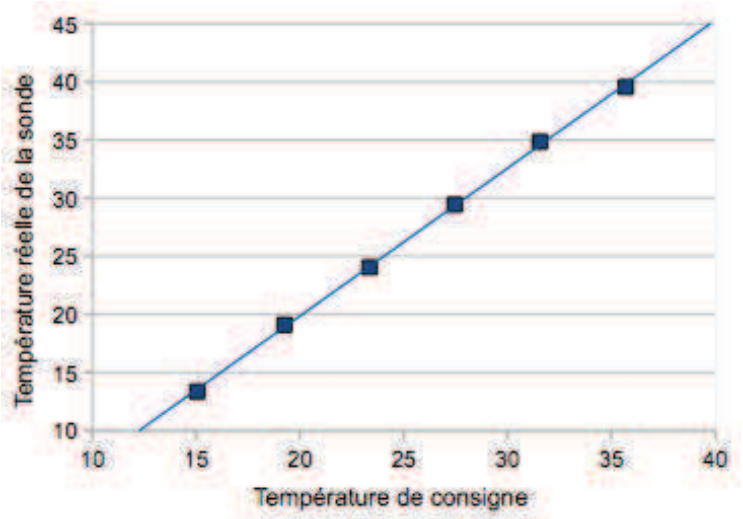


FIGURE 2.10 – Courbe d'étalonnage en température de la sonde 5 mm du spectromètre $500MHz$ obtenue à partir des mesures effectuées sur le méthanol. On obtient une droite d'équation $T_{réelle} = 1{,}27T_{consigne} - 5{,}57$ avec un coefficient de corrélation de 0,9995

Nous avons choisi d'étudier une plage de température allant d'environ 15°C à 40°C afin de pouvoir couvrir des mesures dans le domaine des températures ambiantes (18 à 24°C) ainsi que pour des températures dans le domaine du vivant.

2.2.3 Étalonnage en température de l'échantillon

Le complexe de lanthanide utilisé possède 6 fréquences de résonances pour les protons, les valeurs des déplacements chimiques associés à ces 6 résonances sont données dans le tableau 2.2

Pour réaliser les acquisitions j'ai utilisé un échantillon composé de :

- 20 mM de $TmDOTP^{5-}$
- 9 g/L de $NaCl$
- 90% de D_2O
- 10% de H_2O
- 1,5% d'agar
- de d'azidure de sodium pour la conservation de l'échantillon

Lors de la fabrication de l'échantillon pour les expériences de mesure sur le spectromètre 500 MHz j'ai également préparé un fantôme souris pour les mesures sur le spectromètre imageur 9,4 T. Ainsi les deux échantillons possèdent exactement la même composition.

Nous nous sommes intéressés aux valeurs de résonances des protons H_1 et H_6 . Les résultats sont donnés dans le tableau 2.4. On peut voir sur les figures 2.11 et 2.12 que l'on obtient bien une évolution linéaire du déplacement chimique des pics en fonction de la température de l'échantillon.

Température ($°C$)	Position du pic H_1 (ppm)	Position du pic H_6 (ppm)	Ecart entre les pics H_1 et H_6
13,35	−207,40	−167,93	39,47
19,15	−200,50	−162,50	38
24,05	−193,00	−157,4	36,6
29,45	−183,43	−148,05	35,66
34,85	−177,34	−143,28	34,06
39,55	−171,42	−138,67	32,75

TABLE 2.4 – Résultats obtenus à partir du gel contenant du $TmDOTP^{5-}$. Variation en ppm de la position des pics identifiés H_1 et H_6 en fonction de la température de l'échantillon.

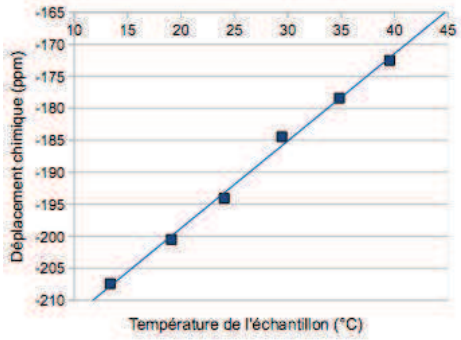


FIGURE 2.11 – Courbe d'évolution de la position du pic H_1 du $TmDOTP^{5-}$ en fonction de la température

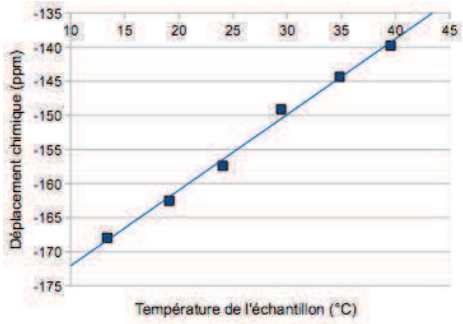


FIGURE 2.12 – Courbe d'évolution de la position du pic H_6 du $TmDOTP^{5-}$ en fonction de la température

Nous avons réalisés des approximations linéaires par la méthode des moindres carrés. Les coefficients de corrélation obtenus sont respectivement de 0,9940 et 0,9963 pour les courbes relatives aux pics H_6 et H_1. Si l'on s'intéresse à l'écart de position entre ces deux pics (Fig.2.13), on obtient également une courbe pouvant être approchée par une équation linéaire qui offre quand à elle un coefficient de corrélation de 0,9996 qui est encore meilleur. Pour la suite du travail nous avons choisi de nous intéresser à l'écart de position entre les pics car ces résultats nous offrent une meilleure estimation de la température. En mesurant la distance entre les deux pics on s'affranchit d'une éventuelle fluctuation de la référence en fréquence.

Afin de s'assurer de la reproductibilité des mesures nous les avons reproduites à 2 jours d'intervalle. Nous avons pu constater une bonne reproductibilité des mesures [2]. De plus afin de s'assurer de la stabilité du produit dans le temps nous avons également reproduit les mesures 3 mois après les premières mesures. Cela a permis de valider la stabilité du produit et ainsi de s'assurer de la possibilité d'utilisation du fantôme pour des études ultérieures.

2. Résultats non présentés ici

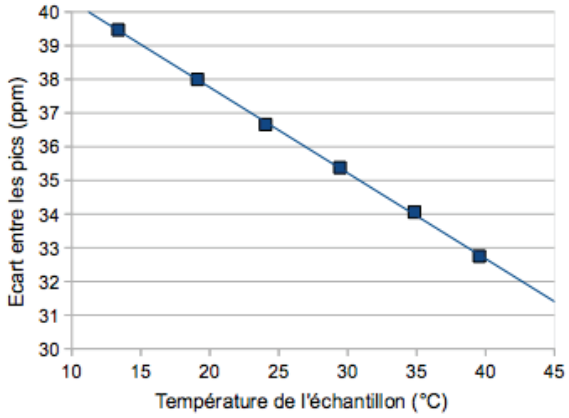


FIGURE 2.13 – Courbe d'évolution, en fonction de la température de l'échantillon, de l'écart entre les deux pics H_1 et H_6 du complexe de lanthanide $TmDOTP^{5-}$

2.2.4 Protocole de mesure de l'élévation de la température de l'échantillon

Nous avons fait subir à l'échantillon contenant la solution décrite plus haut un protocole incluant 5 séquences POCE-PRESS consécutives entrecoupées de séquences de spectroscopie ^1H centrées sur -150 ppm et/ou -190 ppm. En parallèle, la température de la pièce était monitorée. Ainsi il est possible d'évaluer l'élévation de température dû à l'énergie déposée par la séquence POCE-PRESS. Les mesures effectuées ont permis de relever une élévation de température supérieure de 0,2°C sur l'échantillon de gel.

2.3 Conclusion sur la conception de la bobine

Dans cette partie j'ai présenté 3 choses importantes. La partie concernant le développement du support, prévue pour accueillir, entre autre, l'animal et le détecteur ; la partie concernant le développement de la sonde de détection et enfin la mise en place d'un protocole de suivi de la température d'un échantillon par spectroscopie.

La partie concernant la fabrication du berceau de l'animal a nécessité beaucoup de travail, notamment du fait des contraintes d'encombrements (espace disponible qui est un cylindre de 60 mm de diamètre) et de l'ensemble des choses à intégrer (contention et monitoring de l'animal, sonde de mesure). Certaines des choses mises en œuvre ont été de simples transpositions de ce que l'on peut trouver dans les travaux précédents [17], mais d'autres ont fait l'objet d'améliorations très nettes. C'est le cas notamment du système de barres d'oreilles mis en place, qui permet une bonne contention de l'animal, tout en garantissant un accès dégagé de la tête de l'animal pour des acquisitions avec une bobine de surface.

Au niveau de la sonde de mesure, comme pour le support, l'encombrement a été une contrainte importante mais le travail le plus important a bien évidemment été autour des bobines. Comme je l'ai présenté ici plusieurs géométries ont été testées et le choix a été soumis à plusieurs critères. En effet la sonde construite se doit d'offrir un bon rapport signal sur bruit et un faible couplage entre les voies. Elle ne doit pas capter de signaux parasites (ce qui est à mettre en lien avec un bon SNR) et ne pas déposer trop d'énergie. Au final, comme nous avons pu le voir, la bobine développée permet d'obtenir, depuis un voxel de 15,6μL, un rapport signal sur bruit qui est meilleur que celui qui peut être obtenu avec la bobine adaptée au rat, de plus les résultats ont montré que la bobine permet d'obtenir un signal qui est très bien sélectionné ainsi qu'un bon découplage.

L'étude énergétique de la bobine a été le sujet d'un travail de mise en place du protocole de suivi de la température. cette étude a permis de mettre en évidence une légère élévation de la température dans l'échantillon, qui reste minime et négligeable.

Chapitre 3

Etude du métabolisme tumoral

Dans cette partie nous nous intéressons à l'étude d'un modèle de gliome humain implanté chez la souris, ainsi que l'effet d'un traitement anti-vasculaire sur celui-ci. C'est en particulier le métabolisme qui nous intéresse, ainsi nous utilisons la méthode de spectroscopie ^{1}H filtrée ^{13}C présentée plus haut.

Dans un premier temps je vais donner des éléments d'information sur le cerveau et son métabolisme. Ensuite j'en viendrai plus précisément à l'étude réalisée sur les effets de l'antivasculaire sur les gliomes.

3.1 Contexte biologique

3.1.1 Métabolisme cérébral de la souris

3.1.1.1 Réseau vasculaire cérébral [74]

Quelque soit l'organe étudié le réseau vasculaire a bien évidemment un rôle primordial. Il est structuré de façon bien précise, on retrouve d'ailleurs des réseaux présentant la même architecture d'une souris à l'autre. C'est grâce à ce réseau qu'est réalisé une grande partie des échanges dans le corps, dans le cerveau il sert à apporter une grande partie du substrat énergétique nécessaire au bon fonctionnement du métabolisme.

Dans certains cas pathologiques le réseau vasculaire peut être perturbé, comme c'est le cas dans certaines tumeurs où il peut y avoir un développement anarchique de vaisseaux. Ce réseau peut également être endommagé, voire détruit.

Si l'on s'intéresse à la thérapie des tumeurs cérébrales le réseau vasculaire va de nouveau jouer un rôle central. En effet c'est à la fois lui qui va amener une partie du substrat qui va permettre le développement des cellules tumorales mais c'est aussi lui qui va pouvoir véhiculer certaines drogues servant au traitement.

3.1.1.2 Cellules cérébrales (Fig. 3.1)

Le cerveau est principalement constitué de deux types de cellules, les neurones qui sont les cellules nerveuses permettant le transport de l'information, et les cellules gliales qui agissent comme des cellules nourricières, qui regroupent la microglie, les oligodendrocytes et les astrocytes. Le nom de cellules gliales vient du mot glue car le premier rôle accordé à ces cellules était surtout un rôle de soutien mécanique de la structure du cerveau.

Neurone

Les neurones constituent la plus grande population cellulaires du système nerveux central. Un neurone est une cellule électriquement excitable. Elle est composée de 3 parties, le soma, l'axone et l'arbre dendritique. Le soma est la partie centrale du neurone. L'axone est la partie qui conduit le potentiel d'action, c'est à dire le signal nerveux, l'axone est unique par neurone mais se

finit en arbre ce qui lui permet d'être connecté à plusieurs neurones. L'arbre dendritique est la partie qui permet à un neurone d'être connecté avec d'autres neurones, c'est sur cette structure ramifiée que les axones des autres neurones se connectent au niveau des synapses. Les synapses ont un rôle très important dans la transmission de l'information car c'est à la fois le lieux d'échanges inter-neurones mais aussi le lieu d'échange entre les neurones et les astrocytes qui sont en contact direct avec les synapses.

Cellules gliales

Dans le cerveau les cellules gliales regroupent 3 types de cellules qui sont :

- les astrocytes ;
- les oligendendrocytes ;
- la microglie.

La microglie est en fait constituée de macrophages. C'est principalement la microglie qui assure la défense immunitaire dans le système nerveux central.

Les oligodendrocytes assurent la myélinisation des axones, nécessaire pour une bonne transmission du signal nerveux. Un olygodendrocyte va ainsi recouvrir en partie plusieurs axones avec des petits tronçons de myéline. Ces différents tronçons sont délimités par des nœuds de ranviers.

Les astrocytes sont les cellules gliales qui vont le plus nous intéresser. Les différents rôles des astrocytes sont :

- rôle nourricier ;
- rôle dans la transmission synaptique ;
- rôle structurel.

Les astrocytes sont à la fois en contact avec les neurones et les vaisseaux sanguins. Ils sont ainsi utilisés pour capter différents nutriments dans le sang et servir d'intermédiaire pour transporter les nutriments aux neurones, parfois après transformation du produit capté.

Le contact avec les neurones se fait au niveau des synapses. A ce niveau les astrocytes jouent un rôle dans la transmission synaptique. En effet les astrocytes sont capables de capter différents neurotransmetteurs, dont le glutamate. En plus de pouvoir capturer certains produits au niveau des synapses, les astrocytes sont capables de produire différentes molécules qui vont elles aussi réguler l'activité neuronale.

On accorde également aux astrocytes un rôle structurel du fait de leurs structure 3D. Cette structure permet un maintien de l'ensemble de la structure cérébrale.

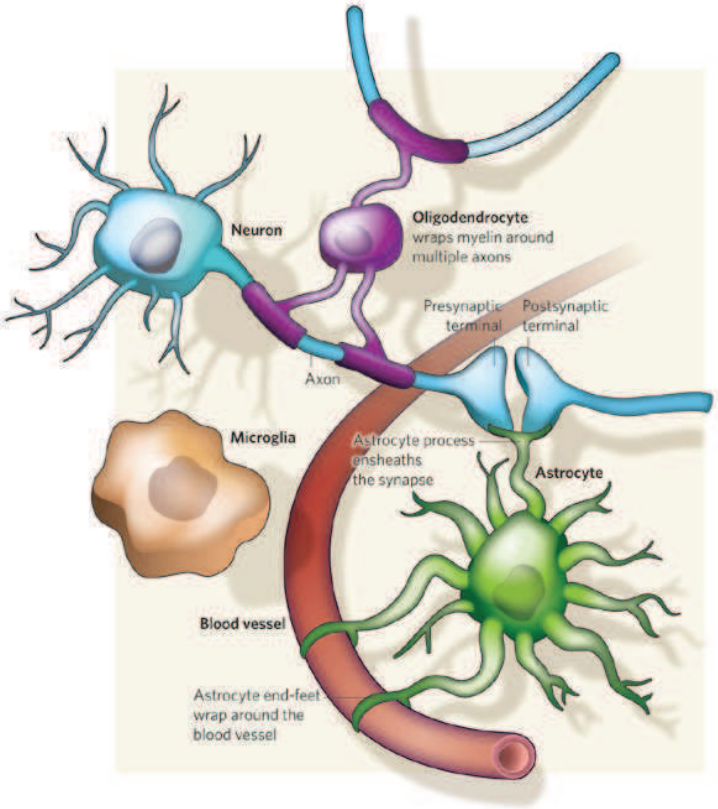


FIGURE 3.1 – Schéma représentant la façon dont sont agencées les cellules cérébrales les unes par rapport aux autres. Schéma extrait de [2]

3.1.1.3 Les métabolites cérébraux observables en SRM du proton

Sur la figure 3.2 est représenté un spectre proton obtenu à 9,4 T dans le cerveau de souris dans un volume de 15,6 μL avec une acquisition de 17 min. Sur ce spectre il est possible d'identifier 11 métabolites différents sur 35 potentiels [25]. Nous allons présenter ici les différents métabolites qui sont susceptibles de nous intéresser dans le cadre du travail réalisé.

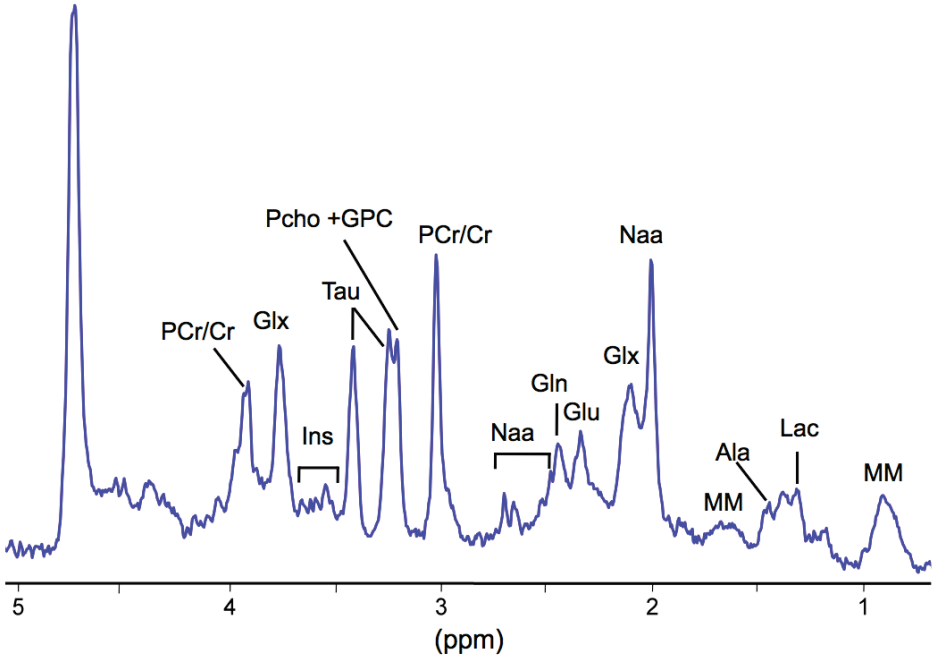


FIGURE 3.2 – Spectre ^1H obtenu sur un cerveau de souris dans un volume de 15,6 μL à l'aide d'une séquence PRESS avec suppression d'eau (VAPOR) ($T_R = 4s$, $T_{E1} = T_{E2} = 8\ ms$, $N_{acc} = 256$. Il a été utilisé un filtre lorentzien de 3 Hz sur le spectre. A gauche, aux environs de 4,75 ppm se trouve le pic résiduel de l'eau qui n'est pas complètement supprimé.

- Le **glutamate** est un des principaux neurotransmetteur excitateur du système nerveux central. Le glutamate est considéré comme jouant un rôle dans les mécanismes d'apprentissage et de mémorisation. Le glutamate est produit au sein des neurones via le cycle de Krebs (ou cycle TCA pour TriCarboxylic Acid cycle), ensuite, étant utilisé comme neurotransmetteur il va diffuser depuis les neurones vers le milieu extracellulaire pour être ensuite capté par les astrocytes ou les autres neurones au niveau des synapses.

- La **glutamine** est issue de la transformation du glutamate par la glutamine synthétase, qui agit dans les astrocytes. La glutamine est ensuite transportée depuis les astrocytes vers les neurones pour être transformée en glutamate. Ainsi cette échange de glutamate et glutamine, entre les neurones et les astrocytes, est cyclique.

- Le **lactate** est un métabolite qui a longtemps été exclusivement associé à l'hypoxie cérébrale. A ce jour on peut toujours affirmer qu'une forte accumulation est en effet marqueur de situations pathologiques, mais le lactate est aussi un métabolite qui est naturellement présent dans l'organisme en situation non pathologique [24]. Sa production est en fait privi-

légié lorsque la glycolyse anaérobique est favorisée par rapport à la voie aérobique. Depuis quelque années plusieurs thèses sont débattues autour du lactate, en particulier son rôle dans le métabolisme énergétique des neurones. On peut penser en particulier aux théories du Neurones Astrocytes Lactate Shuttle (NALS) et Astrocytes Neurones Lactate Shuttle (ANLS) défendues respectivement par Simpson *et al.* [43, 44, 63] et Pellerin *et al.* [51, 52, 34]. De façon générale, dans le cadre d'un état non pathologique, tout le monde s'accorde à dire que le lactate est présent en faible concentration dans le système nerveux central et qu'il joue un rôle dans le métabolisme énergétique.

- L'**inositol** désigne 9 isomères différents. Le plus présent dans l'organisme est le myo-inositol [21]. Par défaut lorsque l'isomère n'est pas précisé, inositol désigne le myo-inositol, et inositols désigne l'ensemble des isomères. Un deuxième isomère, le scyllo-inositol se retrouve en proportion non négligeable dans l'organisme (environ $5-10\%$ de la concentration du myo-inositol). Le cerveau est l'un des organes qui présente la plus grande concentration d'inositol. Cette concentration d'inositol est relativement importante chez les nouveaux nés et diminue avec l'age pour se stabiliser rapidement. L'inositol et ses formes phosphorylées jouent un rôle important dans la régulation des voies de transmission intracellulaires [23]. Il apparaît également que les formes phosphorylées interagissent avec les neurotransmetteurs [41, 48].

- La **taurine** se retrouve dans l'ensemble de l'organisme, en particulier dans le foie car elle est un des principaux constituant de la bile. Au niveau cérébral la taurine possède différents rôles. La taurine est d'une part un neurotransmetteur [76] mais elle joue également un rôle dans la régulation du calcium intracellulaire et dans la régulation du mécanisme d'apoptose des neurones [12].

- La **Créatine** et la **phosphocréatine** sont souvent associées car considérées comme représentant un cycle dont la concentration totale reste constante. Ce cycle créatine $\leftrightarrow$ phosphocréatine est considéré comme jouant un rôle de tampon énergétique via la créatine kinase en régulant le taux d'ATP, et de navette énergétique, entres les sites producteurs d'énergie vers les sites consommateurs. Dans le spectre RMN ^1H de la créatine et de la phosphocréatine les pics principaux des deux métabolites résonnent à des fréquences très proches qui ne sont pas séparables en acquisition *in vivo*. On s'intéressent souvent à la créatine totale qui désigne l'ensemble et qui est notée t-Cr (de l'anglais « total creatine »).

- Le **N-acétyl-aspartate (NAA)** est un métabolite qui a été déjà très étudié mais dont le rôle n'est pas encore très bien identifié. Il est impli-

qué dans beaucoup de mécanismes et se retrouve dans différents types de cellules cérébrales [46]. Une propriété bien définie et connue du NAA est qu'il est produit dans les neurones (puis transporté dans les autres cellules). Ainsi une forte chute du NAA cérébral est bien souvent associé à une dégénérescence neuronale [54].

– L'**acide Gamma Amino Butyrique (Gaba)** est un des neurotransmetteurs inhibiteurs les plus présents dans l'organisme. Son rôle inhibiteur sert beaucoup à contrebalancer le rôle excitateur du glutamate.

– l'**alanine** est impliquée dans différents mécanismes. Tout d'abord elle joue un rôle dans la création du glutamate en réagissant avec l'α-cétoglutarate (réaction réversible catalysée par l'alanine transferase, ALAT) [53]. De plus l'alanine est impliquée dans la libération du glutamate et du GABA respectivement au niveau des neurones glutamatergiques et gabaergiques [72] [61]

En annexe D j'ai indiqué les formules chimiques des différents métabolites détectés ainsi que les positions en *ppm* des différents pics dans les spectres proton. Les métabolites représentés ne correspondent qu'à une partie des métabolites potentiellement détectables. Il faut par contre noter que ce sont les métabolites qui sont présents dans des quantités les plus importantes [1] (d'où le fait qu'il soit possible de les détecter par SRM *in vivo*). De plus ces métabolites permettent de décrire beaucoup de mécanismes liés au fonctionnement cérébral. Tout cela est par contre très complexe du fait des nombreuses interactions qui existent entres toutes ces molécules.

3.1.1.4 Métabolisation du glucose

Le cerveau est l'organe le plus gourmand en glucose, à lui seul il consomme pas moins d'un quart de la quantité totale utilisée par l'organisme de la souris [81].

Une des principales utilisations du glucose cérébral est la production de pyruvate via la glycolyse, 2 moles de pyruvate étant formées pour 1 mole de glucose métabolisée. Le pyruvate est un des éléments à l'origine du cycle de Krebs. C'est par ces voies, la glycolyse et le cycle de Krebs, que le glucose est métabolisé entre autre en glutamate et glutamine.

Sur la figure 3.3 j'ai d'ailleurs représenté, de façon simplifiée, à la fois comment le glucose peut être assimilé par les neurones et les astrocytes, ainsi qu'une partie des métabolites décrits plus haut et la façon dont ils s'intègrent dans différents mécanismes. On retrouve certains métabolites qui sont échangés entre les neurones et les astrocytes, La présence du cycle de Krebs dans les astrocytes et les neurones, et le fait qu'une partie de l'énergie nécessaire est

1. le seuil de détection étant de l'ordre de 0,5 mM

apportée grace au réaction avec le groupe phosphoryl (groupe qui est libéré et recapturé au cours du cycle Cratine ↔ Phospho-Créatine).

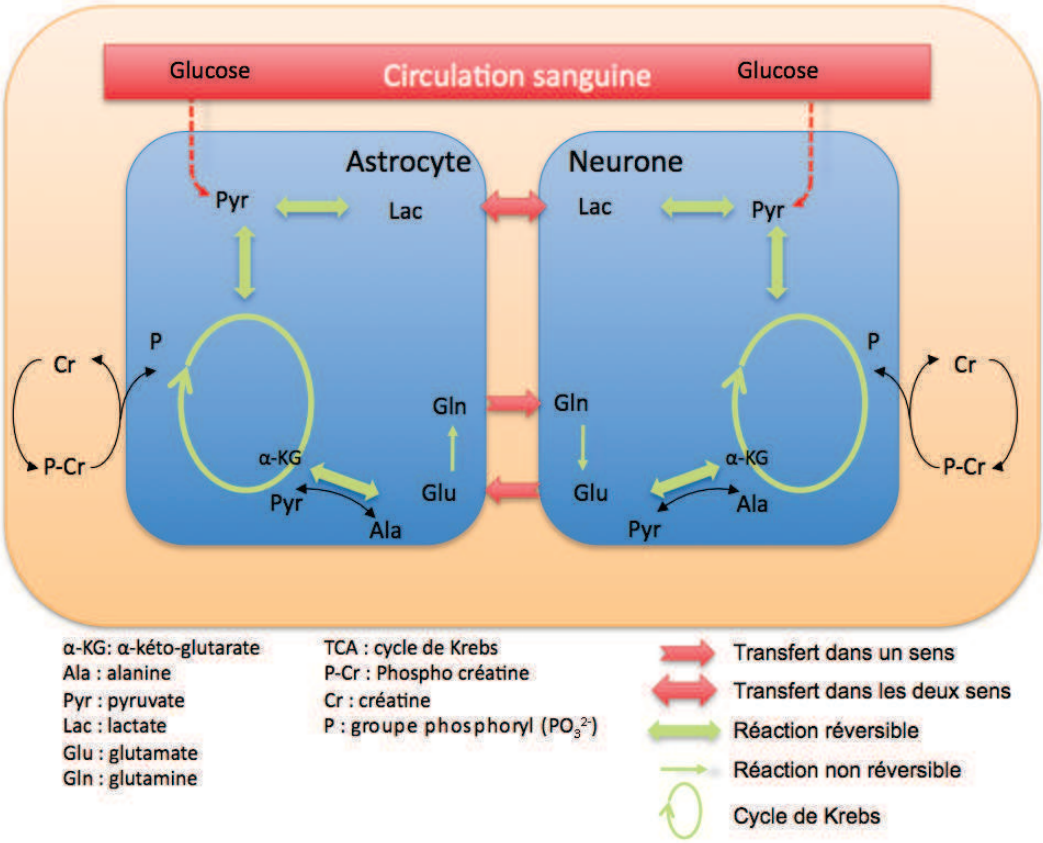


FIGURE 3.3 – Schéma indiquant une partie des transferts qui se produisent entre les neurones et les astrocytes ainsi que certains mécanismes se produisant dans ces cellules. J'ai représenté ici le cas de neurones glutamatergiques. On peut en particulier noter les transferts de glutamate, glutamine et de lactate ainsi que la présence du cycle de Krebs (figure adaptée depuis [50])

3.1.2 Nature des tumeurs étudiées

Dans ce travail je m'intéresse à l'étude d'un traitement anti-vasculaire sur des tumeurs cérébrales, de la ligné U87 MG, de type glioblastome. Ce type de tumeur est aussi connu sous le nom d'astrocytome du fait qu'il est en partie caractérisé par une prolifération excessive d'astrocytes. Les glioblastomes sont également connus pour avoir une région centrale nécrotique en stade avancée et des parties en hypoxie autour de cette région centrale. Autour de la tumeur il est également possible d'observer une zone d'œdème [55].

3.1.3 Traitement des tumeurs par un composé antivasculaire

L'anti-vasculaire utilisé dans cette étude est le DMXAA (5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid). La particularité d'un agent anti-vasculaire comparé à un anti-angionénique est qu'il prend pour cible uniquement le réseau vasculaire tumoral [67]. Malgré le fait que l'action de ce produit ne soit pas encore totalement caractérisée, plusieurs études ont montrés que le DMXAA prend pour cible certains marqueurs tumoraux [57, 35]. Différents mécanismes associés au DMXAA ont été identifiés par Ching *et al* [13]. J'ai indiqué sur la figure 3.4 une partie des événements déclenchés, au niveau des tumeurs, par l'administration du DMXAA. Une des spécificités de ce produit est qu'il induit le relargage de plusieurs molécules possédant des propriétés anti-vasculaires et anti-angiogéniques ce qui le rend d'autant plus efficace [5]. Certains effets de cette molécule ont déjà été caractérisés par IRM [62] mais jamais par SRM et encore moins par une étude dynamique en spectroscopie ^{1}H filtrée ^{13}C.

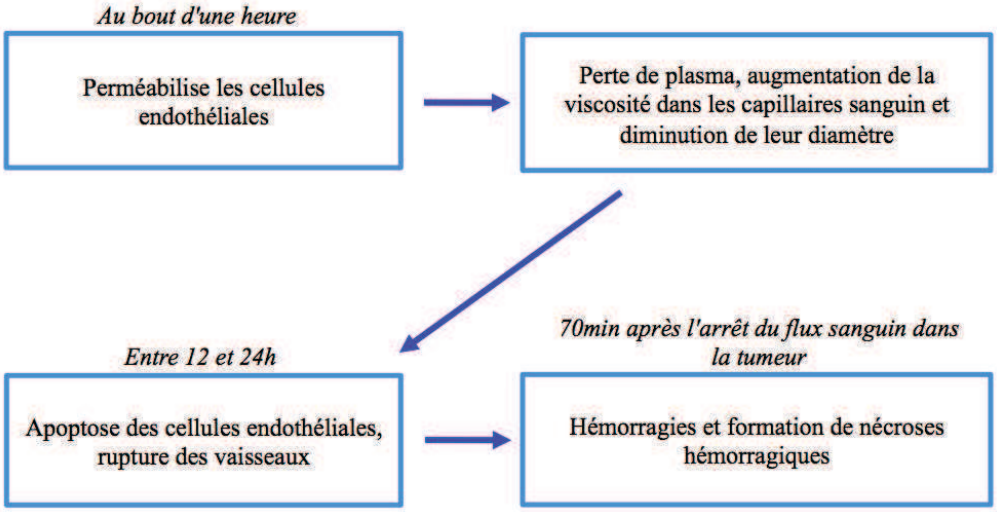


FIGURE 3.4 – Description d'une partie des événements déclenchés par l'administration du DMXAA avec leur chronologie. Cette figure reprend ce qui est décrit dans les travaux de Ching *et al.* [13]

3.1.4 Métabolisme du glucose par un tissu sain

Je n'ai pas d'étude témoin à présenter dans le cadre de ce travail, néanmoins je souhaite présenter ici des données qui ont été obtenues sur une souris ne présentant pas de tumeur cérébrale. Les résultats présentés ici le sont à titre indicatifs. Les conditions d'acquisitions ont été légèrement différentes de celles utilisées dans le cadre de l'étude mais la séquence utilisée pour la spectroscopie $^{1}H -^{13} C$ est identique et la structure dans laquelle sont réalisées les acquisitions est la même. Les spectres présentés ici sont représentatifs de plusieurs

expériences menées dans le cadre de la mise au point de la méthode (travail réalisé sur des souris C57Bl6).

Sur la figure 3.5 j'ai identifié les pics visibles en spectroscopie $^1H-^{13}C$ dans nos conditions d'expérimentation. Sur la figure 3.6 j'ai indiqué l'évolution observée en spectroscopie $^1H-^{13}C$ dans un voxel de $(2{,}5\ mm)^3$ centré sur le striatum. Les quatre premiers spectres sont réalisés en parallèle d'une injection constante de glucose marqué au carbone ^{13}C, le dernier est réalisé après interruption de l'injection de glucose marqué.

Les pics observables sont ceux du lactate, de l'alanine, du glutamate, de la glutamine et du glucose (α et β). Sur la figure 3.6 on peut voir que l'on a le signal du lactate et celui de l'alanine qui augmentent plus rapidement que les autres signaux sur les quatre premiers spectres, enfin ceux-ci diminuent fortement sur le dernier spectre (lors de l'interruption de l'injection du glucose marqué). Le signal du glutamate et celui de la glutamine augmentent après celui du lactate pour atteindre des niveaux supérieurs à celui du lactate. On peut également remarquer une baisse de la quantité de glutamate et de glutamine mais celle-ci semble être proportionnellement plus faible que dans le cas du lactate. En parallèle le signal du glucose augmente tout au long des acquisitions, avec toujours une baisse sur le dernier spectre.

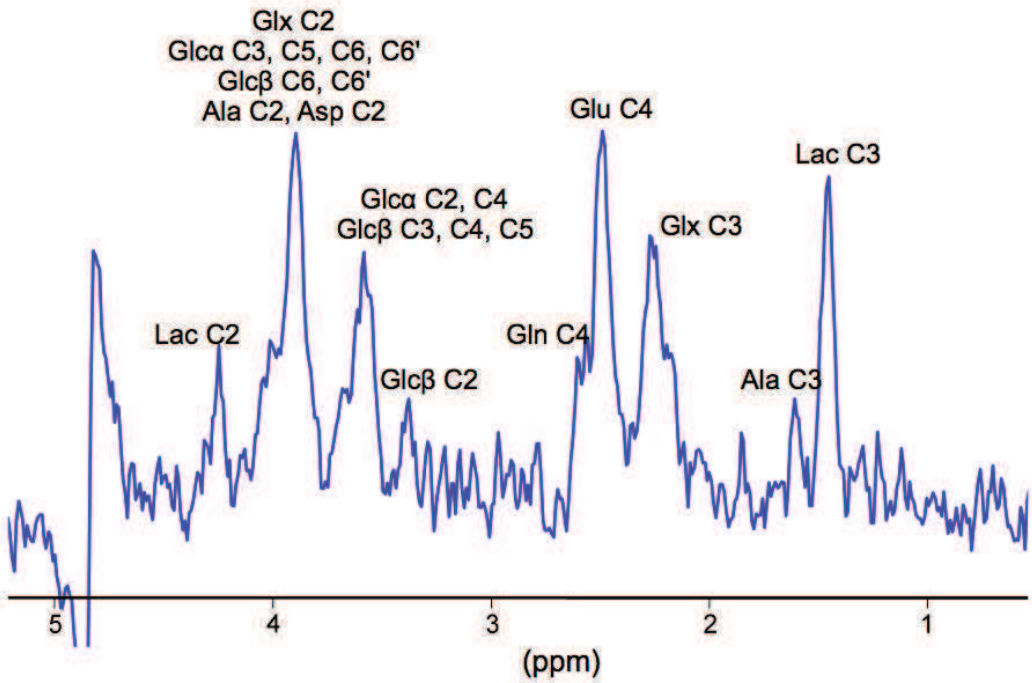


FIGURE 3.5 – Spectre obtenu sur le striatum sur une souris C57Bl6 ne présentant pas de tumeur.Voxel de 15,6 μL à l'aide d'une séquence POCE-PRESS ($T_{E1} = T_{E2} = 7{,}9\ ms$, $T_R = 4\ s$, $N_{acc} = 512$). Il a été utilisé un filtre lorentzien de 5 Hz. Pour les abbréviations se réporter au glossaire.

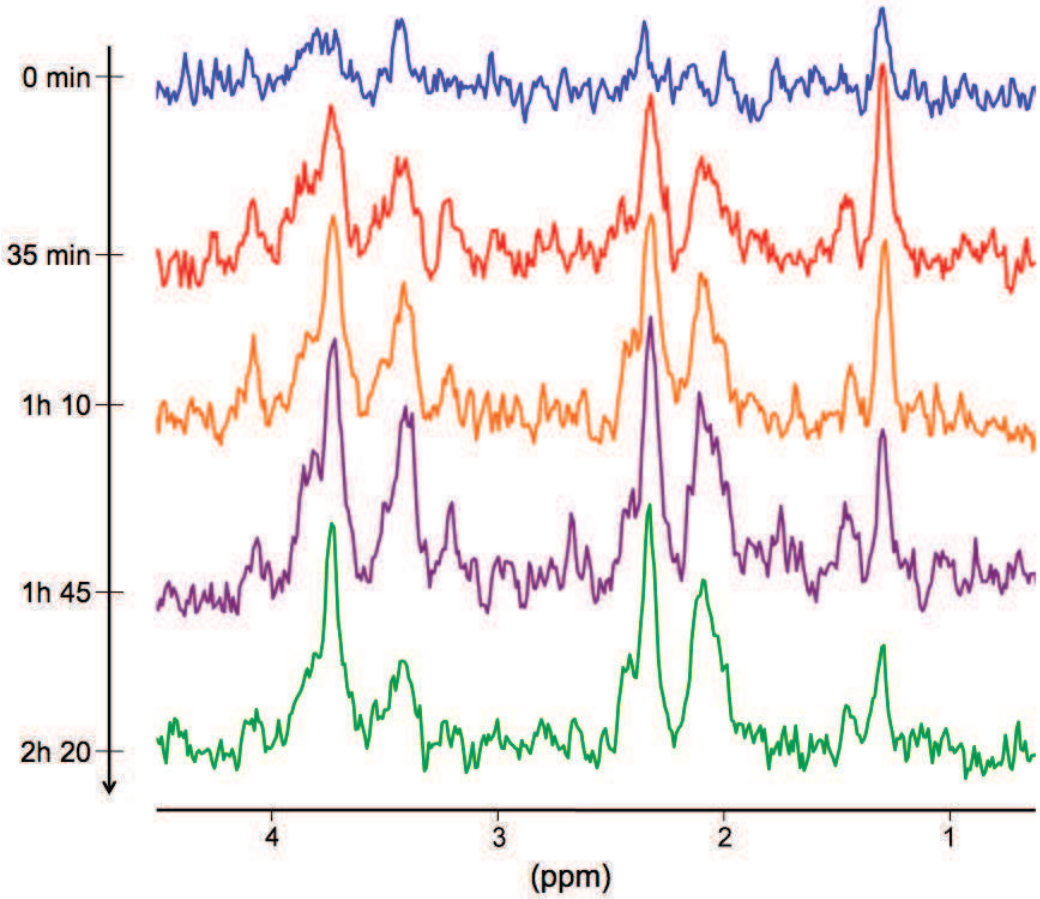


FIGURE 3.6 – Spectres obtenus en spectroscopie $^1H -^{13} C$ sur tissu sain. J'ai représenté 5 spectres, qui correspondent à 5 acquisitions POCE-PRESS consécutives ($T_{E1} = T_{E2} = 7{,}9\ ms$, $T_R = 4\ s$, $N_{acc} = 512$). Spectres obtenus sur le striatum depuis un voxel de 15,6 μL. A gauche j'ai indiqué le début de l'acquisiition par rapport à la fin de l'injection du bolus. Chaque spectre est acquis sur une durée de 34min. Il a été utilisé un filtre lorentzien de 5 Hz sur l'ensemble des spectres.

3.2 Matériels et méthodes

3.2.1 Protocole d'injection des cellules tumorales

Les cellules tumorales sont des cellules U87MG entretenues par l'INSERM U1066 - Angers. L'étape d'injection des cellules est réalisée sous anesthésie générale utilisant 1 mL/kg d'un mélange 2/3 Clorketam (100 mg/mL) - 1/3 Rompun (20 mg/mL) (mélange kétamine/xylazine). Dans un premier temps, l'animal (Souris nude femelle, 7 semaines, $22-24$ g) est placé sur un cadre stéréotaxique et une craniotomie est réalisée. Les 50 000 cellules dispersées dans 5 μL de EMEN sans FCS ou antibiotiques sont injectées au niveau striatal (latéral $-2{,}5$ mm, Antéro-postérieur $+0{,}5$ mm et hauteur $-0{,}3$ mm par rapport à bregma) à l'aide d'une seringue Hamilton équipée d'une aiguille 32 G. La suspension cellulaire est inoculée par bolus successif de 1 $\mu L/min$. L'ensemble du protocole est réalisé en normothermie en 30 minutes.

3.2.2 Suivi de l'évolution des tumeurs et traitements des souris

A partir du dixième jour après l'implantation des tumeurs j'ai réalisé une acquisition d'imagerie de type écho de spin avec pondération T_2 tous les deux jours afin de suivre l'évolution des tumeurs (séquence RARE8 en coupe axiale, $T_R = 4$ s, $T_E = 46$ ms, FOV de $1{,}7 \times 1{,}7$ cm^2, 1 mm d'épaisseur de coupe). Le choix d'une pondération T_2 nous permet de bien distinguer sur l'image la zone tumorale de la zone d'inflammation périphérique si elle existe. Le traitement des tumeurs par le DMXAA est réalisé via une unique injection en intrapéritonéal. L'injection se fait 48 h avant l'acquisition de spectroscopie à la dose de 27.5 $mg.kg^{-1}$ en accord avec les travaux de Seshadry *et al* [62]. Les deux groupes de souris comportant les tumeurs (traitées ou non traitées) ont été choisis de façon à avoir des groupes les plus homogènes possibles en terme de taille de tumeurs 2 jours avant l'acquisition.

3.2.3 SRM des tumeurs

Avant les acquisitions de spectres il est nécessaire de mettre en place une perfusion en intra-veineuse dans la veine caudale de la souris afin de pouvoir

réaliser les injections de glucose marqué au carbone ^{13}C (glucose uniformément marqué).

Les différentes séquences d'IRM et de SRM réalisées sont les suivantes :

- un tripilot (terme bruker) qui est une séquence d'imagerie rapide de faible qualité qui sert de référence pour le placement des séquences d'imagerie suivantes ;
- Une séquences RARE en coupe coronale. FOV : 1,7×1,7 cm^2, résolution : 133×133 μm^2, $N_{acc} = 4$, épaisseur de coupe de 1 mm. En utilisant cette séquence comme référence il va être possible de placer de façon précise les voxels d'acquisition en spectroscopie. Dans le cadre de notre étude cette séquence permet de bien mettre en évidence les différentes zones de la tumeur et permet en particulier de distinguer la zone tumorale d'un éventuel œdème ;
- Une séquence de spectroscopie ^1H sur la structure ciblée. Voxel 2,5×2,5× 2,5 mm^3. Séquence PRESS avec suppression d'eau. $T_{E1} = T_{E2} = 8$ ms, $T_R = 4$ s ;
- Une série de 6 séquences POCE-PRESS successives. Le T_E est choisi de façon à avoir $\frac{T_E}{2} = \frac{1}{J_{CH}}$. Dans le cadre de l'étude j'ai pris $J_{CH} = 127$ Hz qui est la valeur correspondant le mieux à l'ensemble des métabolites étudiés [38]. Nous avons donc $T_{E1} = T_{E2} = 7{,}9$ ms, $T_R = 4$ s, $N_{acc} = 512$). Les 6 séquences sont lancées à la suite, elles permettent d'effectuer un suivi dynamique de la métabolisation du glucose cérébral. La première des 6 acquisitions est précédée de l'injection d'un bolus de glucose marqué uniformément au carbone ^{13}C (14 μL sur 2 minutes d'une solution de glucose à 3 M), ensuite durant les 5 premières acquisitions il y a injection constante de glucose (2,5 $\mu L.min^{-1}$). Avant le début de la sixième et dernière acquisition on stoppe l'injection de glucose. La durée de l'étude dynamique est de 3h30.

Le premier spectre acquis en spectroscopie $^1H -^{13} C$ ne présente que très peu de signal et n'est donc pas exploité dans les résultats. Ce spectre par contre permet de voir si l'on détecte un signal, et donc sert de contrôle pour le bon déroulement de l'expérience (en particulier si la pose du cathéter et l'injection de glucose sont bien réalisées)

Durant toute la durée de l'expérience la fréquence respiratoire de la souris est maintenue entre 80 et 110 inspiration par minute, cela est nécessaire pour que la souris ne tombe pas en hypoxie.

3.2.3.1 Traitements des spectres avec le logiciel JMRUI [64]

J'ai traité l'ensemble des spectres obtenus à l'aide du logiciel JMRUI. L'utilisation de ce logiciel est présentée dans l'annexe C. Pour réaliser l'analyse des résultats j'ai choisi de normaliser les données en utilisant le pic de créatine/Phospho-Créatine comme référence. La normalisation par le pic Cr/P-Cr est courante. Etant donné que l'on considère le cycle Cr/P-Cr comme étant un cycle fermé [56] on peut donc considérer que la concentration totale est

constante dans le temps pour un même animal. Enfin pour un même tissu chez des animaux issus de la même lignée il est possible de considérer que la [t-Cr] est équivalente.

Ainsi lorsque l'on travaille sur des souris qui présentent toutes des tumeurs cérébrales, de même type et au même stade, il est possible d'utiliser cette normalisation. Une comparaison des données normalisées par cette méthode sera pertinente. Si par contre on se réfère à l'article de Urenjak [68] on se rend compte que la concentration de Cr/P-Cr n'est pas équivalente en fonction du type cellulaire [2]. Lorsque l'on travaille sur le métabolisme non tumoral les populations cellulaires en présence sont différentes, il est impossible de comparer les données provenant de tissus pathologiques avec un tissu présumé « sain » qui comporte a priori des populations différentes de cellules et donc une [t-Cr] différente. Le fait de ne pas pouvoir comparer des tissus différents est un réel problème, c'est sans doute le plus gros inconvénient de cette méthode. Dans l'étude réalisée, qui ne comporte pas de témoins, la comparaison entre les deux groupes semble pertinente car on s'intéresse à des tissus tumoraux dans les deux cas.

2. Il faut bien faire attention au fait que dans [68] on parle de culture mono cellulaire, le métabolisme de chaque cellule est donc différent du métabolisme de cellules en présence de toutes les cellules du système nerveux central.

3.3 Résultats

Les acquisitions ont été réalisées sur 2 groupes de souris. Les deux groupes ont subit une injection de cellules tumorales de la lignée U87, un seul de ces groupes à été traité par le DMXAA.

3.3.1 Résultats obtenus en imagerie par résonance magnétique

Dans notre étude, l'imagerie nous a principalement permis de réaliser le suivi de l'évolution des tumeurs ainsi que la localisation pour les acquisitions en spectroscopie. Néanmoins des observations ont été faites à partir des données d'imagerie.

Sur la figure 3.7 j'ai représenté 2 images, l'une obtenue à l'aide de la séquence de tripilot et l'autre qui est une coupe axiale qui permet le placement du voxel pour les acquisitions. Sur le tripilot les deux bandes sombres visibles se croisent au centre de l'aimant. Avec cette image on valide le positionnement de la souris dans l'aimant car l'on a bien le cerveau de l'animal qui se trouve au centre de l'aimant. La séquence d'imagerie RARE8 a une qualité suffisante pour l'évaluation de la taille de la tumeur.

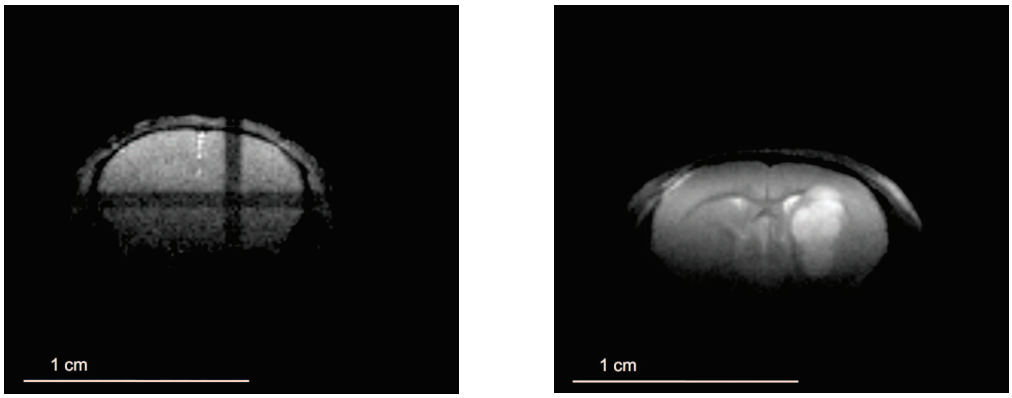


FIGURE 3.7 – A gauche coupe axiale obtenue à l'aide de l'acquisition du tripilot. A droite coupe axiale obtenue à l'aide de la séquence RARE8 utilisée dans le cadre du protocole de spectroscopie des gliome. C'est avec ces séquences d'imagerie que l'on place les voxels pour les acquisitions de spectroscopie. On distingue bien le gliome visible en hypersignal dans l'hémisphère droit de l'animal.

Taille des gliomes à $J-2$ et J

Comme indiqué dans la partie 3.2 j'ai réalisé un suivi de l'évolution des tumeurs avant les acquisitions de spectroscopie. Le but de ce suivi a été de déterminer deux groupes les plus homogènes possible à $J-2$ avant les acquisitions. Dans le tableau 3.1 j'ai indiqué, pour les deux groupes, les valeurs moyennes et les écarts types de la taille des tumeurs 2 jours avant et au jour de l'acquisition en spectroscopie.

Volume tumoral (μL)	$J-2$	J
Groupe non traité	4,35 $\pm$ 1,44	12,47 $\pm$ 4,28
Groupe traité	11,11 $\pm$ 6,14	22,93 $\pm$ 8,67

TABLE 3.1 – Volume des tumeurs à $J-2$ et au moment de l'acquisition de spectroscopie. Les volumes sont données en μL. Ils ont été calculés en prenant en compte le nombre de voxels sur lesquels apparait la tumeur, cela sur l'ensemble des tranches (chaque voxel ayant un volume de $0{,}133 \times 0{,}133$ μL).

3.3.2 Résultats obtenus en SRM ^1H

Sur la figure 3.8 j'ai représenté les résultats obtenus en spectroscopie ^1H sur une tumeur non traitée. Ce spectre est très différent de celui présenté, à titre d'exemple sur la figure 3.2. Les quantités relatives des métabolites sont très différentes. On a en effet une très faible quantité de NAA et de t-Cr alors que le pic associé à la G-Phospho-Choline et la Phospho-Choline est relativement plus grand que dans le cas non pathologique. Le spectre présente également un pic associé au lactate qui est plus important.

Les acquisitions protons ont été réalisées sur 2 lots de 4 souris. L'analyse des résultats n'a pas fait ressortir de différences significatives entre les deux groupes, traité ou non par l'antivasculaire (test de Mann-Whitney, pas de p-value inférieure à 0,5).

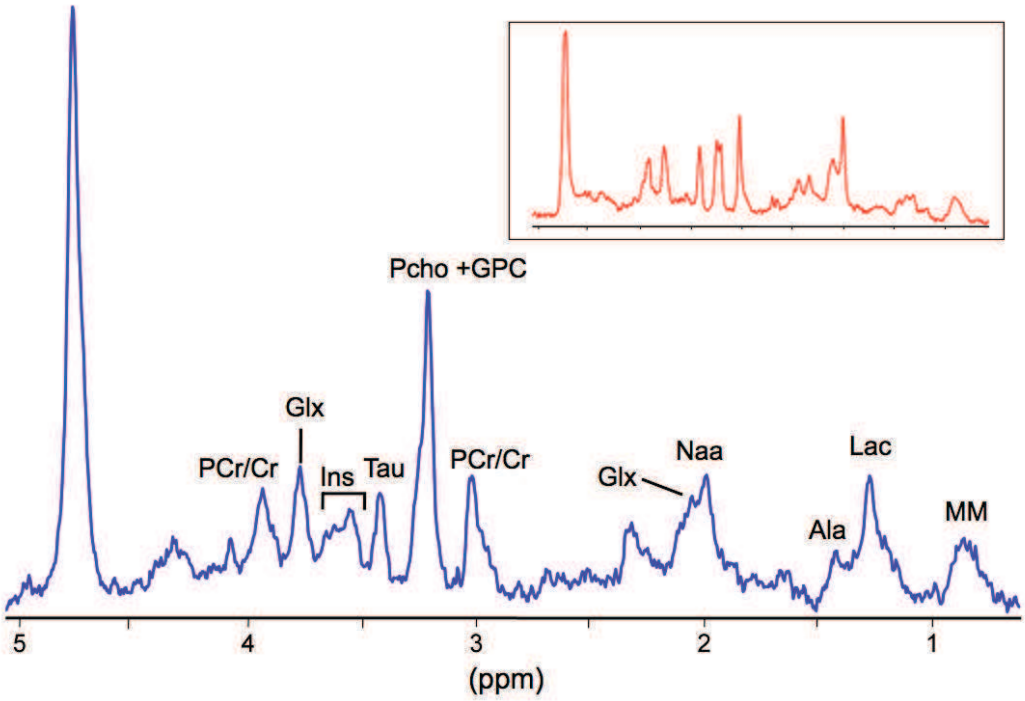


FIGURE 3.8 – Spectre obtenu en spectroscopie proton sur une tumeur non traitée par l'antivasculaire (en bleu). Le spectre représenté ici se veut représentatif des spectres obtenus sur l'ensemble des souris incluses dans l'étude (traitées ou non). Spectre obtenu sur la zone tumorale depuis un voxel de 15,6 μL à l'aide d'une séquence PRESS avec suppression du signal de l'eau ($T_{E1} = T_{E2} = 8\ ms$, $T_R = 4\ s$, $N_{acc} = 256$). Il a été utilisé un filtre lorentzien de 3 Hz sur le spectre. A gauche, aux environs de 4,75 ppm se trouve le pic résiduel de l'eau qui n'est pas complètement supprimé. Le spectre représenté en rouge dans l'encadré est le spectre de la figure 3.2, il est redonné ici à titre d'exemple d'un spectre non pathologique.

3.3.3 Résultats obtenus en SRM $^1H -^{13} C$

L'identification des différents pics obtenus en acquisition $^1H -^{13} C$ sur une tumeur est donnée sur la figure 3.9. Ce spectre a été acquis dans les conditions décrites dans la partie 3.2.

Sur la figure 3.10 j'ai représenté les résultats obtenus en spectroscopie $^1H -^{13} C$ sur une tumeur non traitée. Cette figure comporte 5 spectres sur les 6 acquis en spectroscopie $^1H -^{13} C$. Cette série de spectres est représentative de l'ensemble des acquisitions en spectroscopie ^1H filtrée carbone ^{13}C, que

ce soit sur les tumeurs traitées ou les tumeurs non traitées. Sur ces spectres on observe une croissance importante du signal du lactate et de l'alanine sur les premières acquisitions. Le signal provenant du glutamate et de la glutamine semble arriver plus tardivement. On a d'ailleurs le signal du lactate qui semble être stabilisé alors même que le signal des autres composés continuent d'augmenter. Les données obtenues ont été quantifié à l'aide de JMRUI.

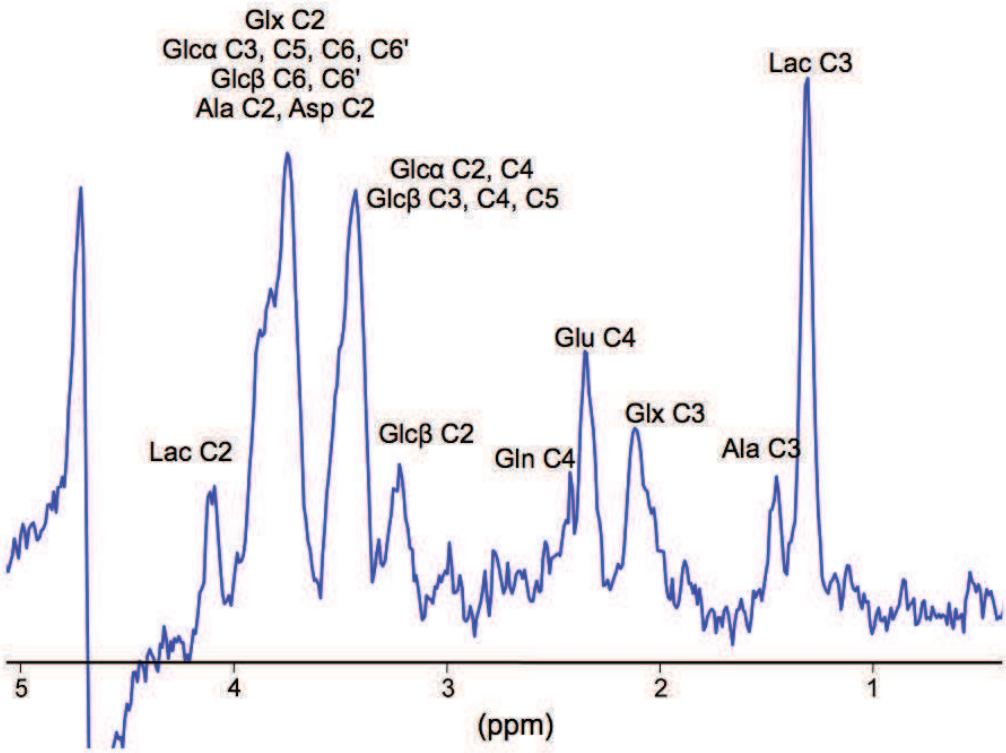


FIGURE 3.9 – Spectre obtenu dans la tumeur sur une souris n'ayant pas été traitée par l'antivasculaire. Voxel de 15,6 μL à l'aide d'une séquence POCE-PRESS ($T_{E1} = T_{E2} = 7{,}9\ ms$, $T_R = 4\ s$, $N_{acc} = 512$). Il a été utilisé un filtre lorentzien de 5 Hz

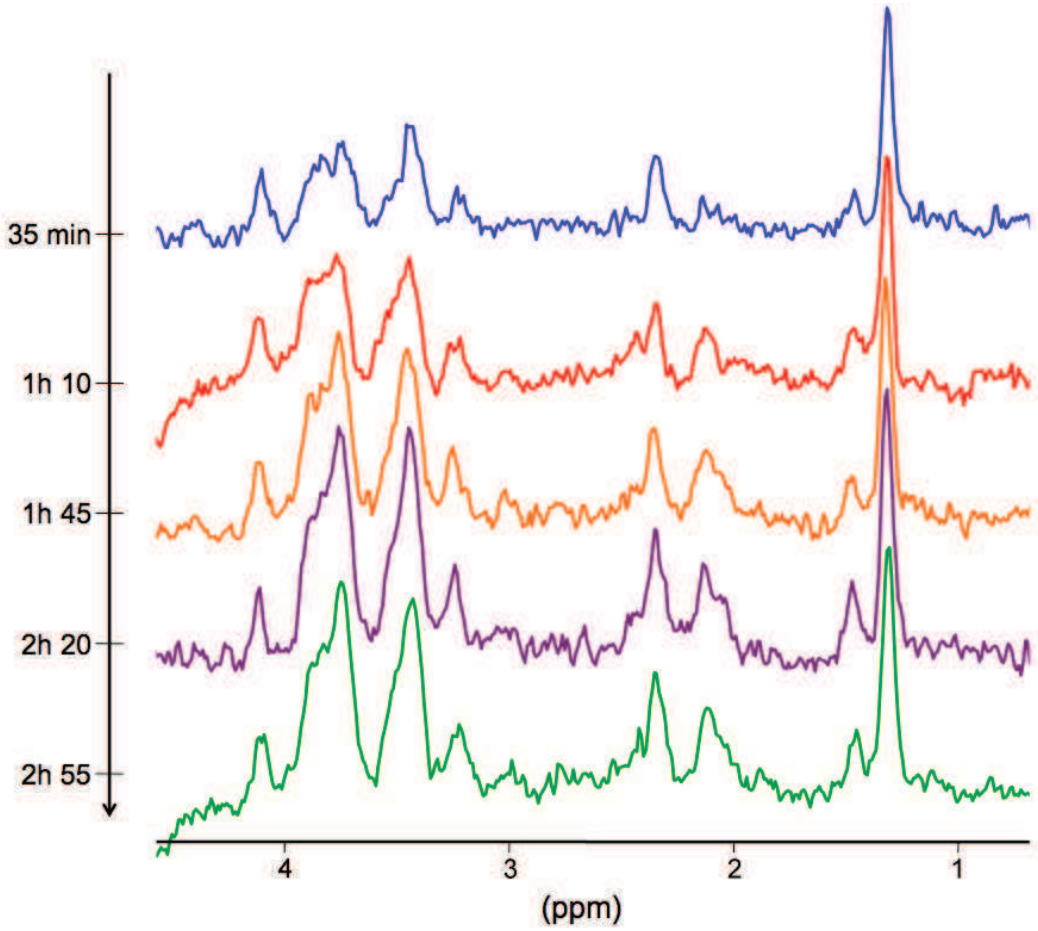


FIGURE 3.10 – Spectres obtenus en spectroscopie $^1H -^{13} C$ sur une tumeur non traitée par l'antivasculaire. J'ai représenté 5 spectres, qui correspondent aux acquisitions 2 à 6 réalisées avec l'acquisition POCE-PRESS. A gauche j'ai indiqué le début de l'acquisiition par rapport à l'injection du bolus. La première acquisition n'est pas représentée car elle contient trop peu de signal et ne comporte pas d'intérêt. Les spectres représentés ici se veulent représentatifs des spectres obtenus sur l'ensemble des souris incluses dans l'étude (traitées ou non). Paramètres de la séquence POCE-PRESS : $T_{E1} = T_{E2} = 7{,}9\ ms$, $T_R = 4\ s$, $N_{acc} = 512$. Il a été utilisé un filtre lorentzien de 5 Hz sur l'ensemble des spectres.

3.3.3.1 Normalisation par le pic de Créatine/Phosphocréatine

J'ai comparé les résultats obtenus entre les groupes présentant des gliomes traités, ou non, par le composé antivasculaire. Sur les figures 3.11 à 3.15 j'ai représenté les évolutions des ratios des différents métabolites marqués, normalisés par le pic Cr/P-Cr, au cours du temps, en fonction des acquisitions en $^1H -^{13} C$. On peut noter que, globalement, la quantité de glucose marqué ob-

servée dans le voxel[3] augmente au cours du temps. On remarque tout de même une diminution de la quantité de glucose marqué dans le cas des tumeurs traitées avec le DMXAA sur la dernière acquisition (Fig. 3.11). Cela est cohérent avec le fait que l'on injecte du glucose marqué en continu dans l'animal, avec un arrêt de l'injection au début de la dernière acquisition. Pour les différents métabolites marqués quantifiés, figure 3.12 à 3.15 nous pouvons observer que l'on a principalement un signal plus élevé dans le cas des tumeurs non traitées que dans le cas des tumeurs traitées. Cela n'est par contre pas le cas pour le lactate marqué où l'on a des ratios et une dynamique identique dans les deux cas.

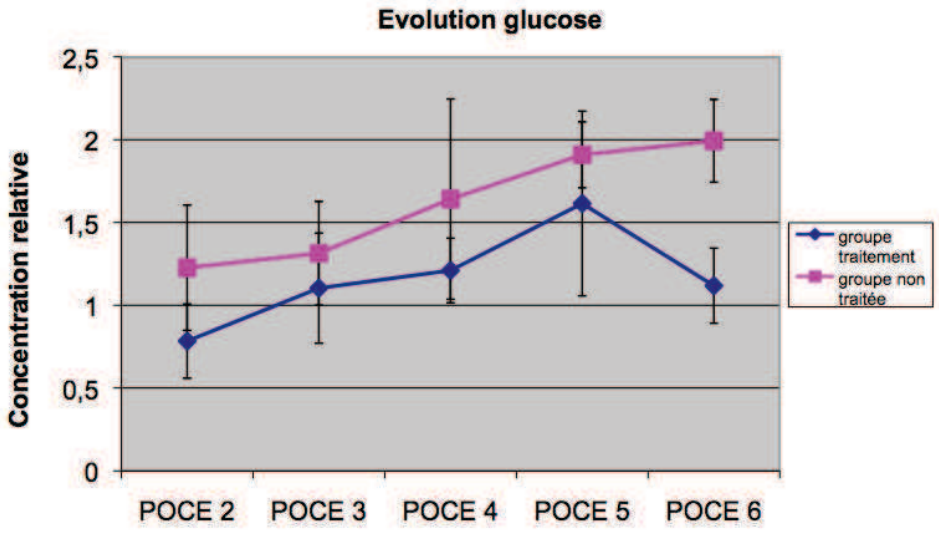


FIGURE 3.11 – Evolution de la quantité de glucose marqué au carbone ^{13}C (carbone $C3$ et $C6$) au cours des différentes acquisitions $^{1}H-^{13}C$. La quantité représentée ici est normalisée par rapport au signal provenant du pic de la créatine/phospho-créatine issu du spectre ^{1}H. Les points représentent 34 min d'acquisition.

3. on parle ici du glucose intra-cellulaire et du glucose circulant

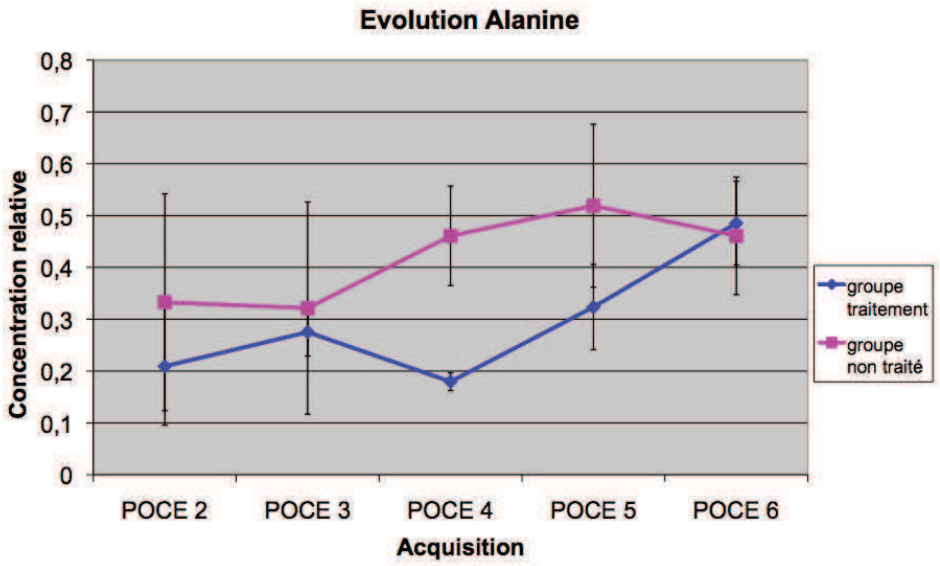


FIGURE 3.12 – Evolution de la quantité d'alanine marquée au carbone ^{13}C (carbone $C3$) au cours des différentes acquisitions $^{1}H -^{13} C$. La quantité représentée ici est normalisée par rapport au signal provenant du pic de la créatine/phospho-créatine issu du spectre ^{1}H. Les points représentent 34 min d'acquisition.

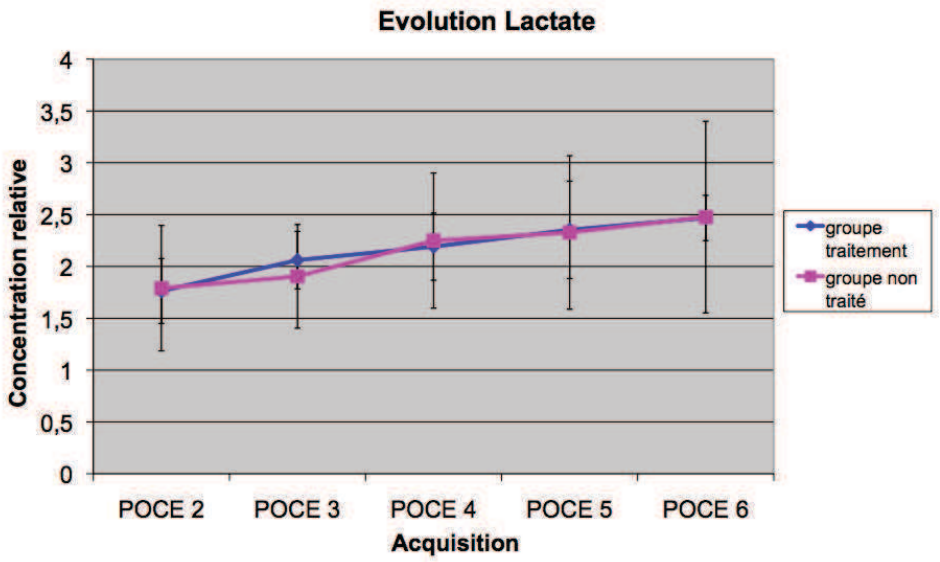


FIGURE 3.13 – Evolution de la quantité de lactate marqué au carbone ^{13}C (carbone $C3$) au cours des différentes acquisitions $^{1}H -^{13} C$. La quantité représentée ici est normalisée par rapport au signal provenant du pic de la créatine/phospho-créatine issu du spectre ^{1}H. Les points représentent 34 min d'acquisition.

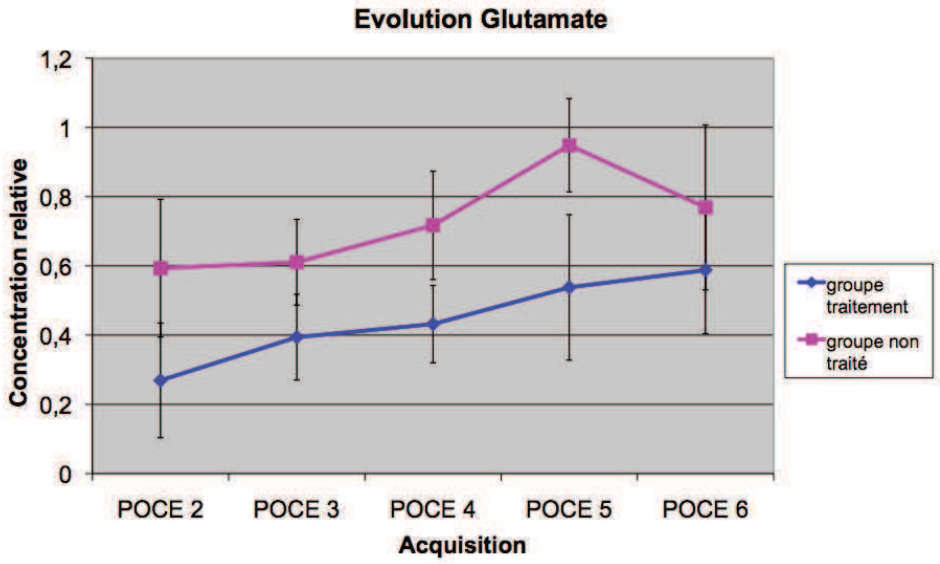


FIGURE 3.14 – Evolution de la quantité de glutamate marqué au carbone ^{13}C (carbone $C3$) au cours des différentes acquisitions $^{1}H -^{13} C$. La quantité représentée ici est normalisée par rapport au signal provenant du pic de la créatine/phospho-créatine issu du spectre ^{1}H. Les points représentent 34 min d'acquisition.

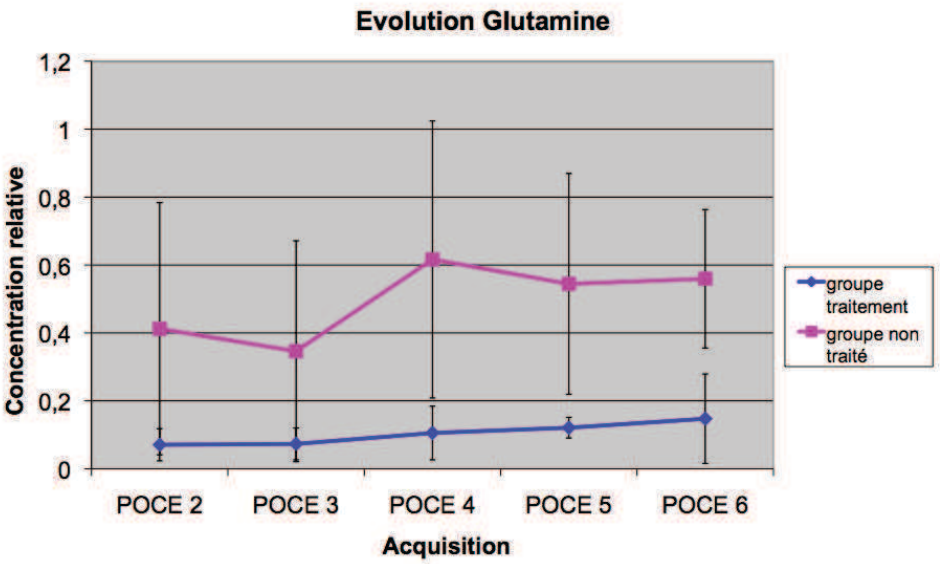


FIGURE 3.15 – Evolution de la quantité de glutamine marquée au carbone ^{13}C (carbone $C3$) au cours des différentes acquisitions $^{1}H -^{13} C$. La quantité représentée ici est normalisée par rapport au signal provenant du pic de la créatine/phospho-créatine issu du spectre ^{1}H. Les points représentent 34 min d'acquisition.

3.4 Discussion et conclusion

3.4.1 Evolution des volumes tumoraux

L'imagerie nous a permis de mesurer le volume tumoral 2 jours avant les acquisitions ainsi que le jour des acquisitions en spectroscopie. Le but qui était de former des groupes homogènes en terme de taille, au moins à $J-2$ n'est pas totalement réalisé. Nous nous sommes heurté au fait que les tumeurs grossissent de façon quasi exponentielle et qu'il n'était pas possible de passer plus de deux animaux par jour. Dans le groupe des souris traitées on se retrouve ainsi avec des tumeurs nettement plus grosses que dans le groupe non traité (en particulier sur une tumeur, ce qui se retrouve sur la valeur de l'écart type). Cette différence de volume tumoral entre les deux groupes se retrouve également au moment des acquisitions en spectroscopie. On peut néanmoins remarquer que les deux volumes tumoraux ont grossi de façon importantes dans les deux cas.

3.4.2 Observations faites en spectroscopie ^1H

Les résultats obtenus en spectroscopie proton nous permettent évidemment d'identifier une situation pathologique. Si l'on compare le spectre obtenu sur une tumeur au spectre de référence donné sur la figure 3.2 on se rend compte que les amplitudes relatives des pics sont très différentes. On observe une concentration très faible du NAA, ce qui est un signe de la dégénérescence neuronale et également un signal plus important de lactate, synonyme d'hypoxie cérébrale. L'augmentation de la choline s'interprète comme étant due à un remaniement cellulaire lors de la croissance tumorale.

Par contres les résultats ne permettent pas de discerner les deux groupes, traités ou non traités (pas de différences statistiques au test de Mann-Whitney).

3.4.3 Observations faites en spectroscopie $^1H-^{13}C$

Les résultats obtenus en spectroscopie $^1H-^{13}C$ montrent un métabolisme qui favorise fortement la production de lactate par rapport au autres métabolites. En effet si l'on se réfère à la figure 3.6 qui est donné à titre de comparaison,

on se rend compte que dans le cas non pathologique le pic de lactate atteint rapidement son amplitude maximale, et que le signal du lactate est ensuite du même ordre de grandeur que ceux du glutamate et de la glutamine. Dans le contexte tumoral il semblerait que l'alanine soit également produit en plus grande quantité. Le glutamate et la glutamine semblent produit de façon plus tardive dans le cas tumoral comparativement au cas non pathologique.

Il ressort plusieurs points importants de cette étude. Tout d'abord les résultats obtenus en spectroscopie proton ne permettent pas de distinguer les deux groupes. Il est vrai que les deux groupes étudiés sont de petites tailles (4 animaux dans chaque groupes), pour autant rien ne laisse penser à une tendance qui viendrait se confirmer en augmentant la taille des groupes (aucune p value inférieure à 0,5 au test de Mann-Whitney).

3.4.4 Conclusion sur l'étude de l'antivasculaire

Les résultats obtenus en spectroscopie $^1H-^{13}C$ permettent de distinguer les deux groupes sur plusieurs métabolites à différents moments (p value inférieure à 0,05 pour plusieurs valeurs sur le glucose, le glutamate et la glutamine au test de Mann-Whitney [4]). Il ressort des résultats normalisés par rapport au pic de Cr/P-Cr que l'on a une quantité totale de métabolites marqués qui est moins importante dans le cas des tumeurs traitées que des tumeurs non traitées. Plusieurs hypothèses sont alors possible pour interpréter ces résultats.

Etant donné que l'on travaille dans les deux cas sur des tissus pathologiques on peut considérer que les populations cellulaires sont équivalentes. Ainsi on peut utiliser les données normalisées par le pic de Cr/P-Cr pour effectuer une comparaison. Si l'on considère la Cr/P-Cr comme étant un indicateur de densité cellulaire alors il semble que la quantité totale de produit marqué soit plus faible vis-à-vis de la quantité de cellule dans le voxel. On remarque surtout qu'il y a moins de glucose marqué qui est présent dans le voxel. Ainsi on aurait moins de glucose marqué pour une même quantité de cellules. La baisse de glucose peut s'expliquer du fait d'un moins bon apport par le réseau vasculaire, causé par une dégradation de celui-ci dans la tumeur par l'antivasculaire. Cette dégradation du réseau vasculaire a déjà pu être montrée par différentes études (comme des études par diffusion [62]) mais dans le cadre des travaux menés nous avons en plus une information sur le métabolisme. Le manque de glucose peut facilement expliquer la moindre quantité de produit marqué pour les autres métabolites quantifiés (lactate exclu). **Le fait de retrouver une même quantité de lactate marqué, relativement à la Cr/P-Cr, va dans le sens ou l'on se trouve en situation d'anaérobie, et qu'ainsi la production de lactate est privilégiée, les autres produits marqués étant produits dans un second temps.**

4. il y a également plusieurs valeurs qui sont inférieure à $p = 0{,}1$, en augmentant la taille des groupes il serait envisageable de trouver d'autres points significativement différents.

Cette étude mériterait d'être complétée par des expériences sur un lot témoin. Cela a été prévu mais malheureusement plusieurs pannes sur le spectromètre imageur ont amenées à des retards importants. Au cours de mes 3 dernières années de thèse il y a eu un cumul de pannes sur le spectromètre imageur de plus de 8 mois (pannes sur les amplificateurs des voies proton et X, panne du pré-amplificateur). De plus, certaines de ces pannes sont intervenues alors même que nous avions à disposition des lots complets d'animaux sur lesquels devait être menée l'étude. Ces pannes expliquent en partie le nombre peu élevé d'animaux par lots étudiés et le manque d'un lot contrôle dans notre étude. Pour autant on peut considérer que le travail le plus dur a été accompli, et que l'étude d'un lot témoin ne représente, a priori, pas de difficulté par rapport à l'étude d'un lot comportant des tumeurs.

Il est intéressant de voir que cette étude a pu montrer une différence entre les deux groupes avec la spectroscopie ^{1}H filtré carbone ^{13}C alors que la méthode classique de spectroscopie en proton n'a pas pu mettre en évidence de différence. Cela peut s'expliquer par le fait que l'étude est menée seulement 2 jours après le traitement. On sait pourtant que les effets de cet antivasculaire apparaissent de façon précoce au niveau cellulaire, cela à partir d'une heure après injection du produit (3.1.3). Je pense que **la raison pour laquelle il est possible d'observer une différence en spectroscopie $^{1}H -^{13} C$ et pas en spectroscopie ^{1}H vient de l'aspect dynamique de la spectroscopie $^{1}H -^{13} C$ vis-à-vis de l'aspect statique de la spectroscopie proton.** En effet la spectroscopie proton rend compte d'un état qui est le résultat d'un long processus, un changement faible sur une durée courte pourrait ne pas être observable si ce changement n'est pas très important. Dans le cas de la spectroscopie $^{1}H -^{13} C$ couplé à l'administration d'un produit marqué il est possible d'observer un changement bref si celui-ci intervient durant la durée de l'expérience.

3.5 Conclusion sur la méthode de spectroscopie ^1H filtrée ^{13}C utilisée pour létude du métabolisme cérébral de la souris

Le travail présenté ici conclut l'ensemble du travail présenté dans les deux derniers chapitres. En effet le développement de la sonde à deux canaux a été réalisée dans le but de réaliser l'étude du métabolisme cérébral de la souris.

Dans le chapitre précédent j'ai présenté et comparé les résultats et les performances obtenus entre les dispositifs rat et souris. Cette comparaison a abouti à la conclusion que la sonde développée est légèrement plus performantes dans le cadre d'acquisition sur des volumes de l'ordre de (2,5 $mm)^3$. Ces résultats obtenus sur un fantôme de gel ne rendent pas du tout compte des performances de la bobine *in vivo* puisque si l'on compare les données obtenus sur rat (dans un volume de 64 μL et celle obtenues sur la souris (volume de 15,6μL) on se rend compte que l'on passe d'un SNR de l'ordre de 11 dans le cas du rat à un SNR de l'ordre de 10 dans le cas de la souris. Cette baisse de SNR de l'ordre de 10% indique que la bobine souris a des performances bien meilleures que celle indiquées par les résultats sur fantôme. Il est important de noter que les acquisitions réalisées dans le cadre de la comparaison ont été réalisées plusieurs mois après les acquisitions *in vivo*[5].

Il est possible d'interpréter cette différence de résultats comme provenant d'un vieillissement des composants utilisés pour la construction de la sonde de mesure. En effet il est possible que les circuits d'adaptation se dégradent au cours du temps, en particulier les capacités variables.

Le travail présenté dans ce chapitre a pu montrer 2 points essentiels, d'une part la possibilité d'utiliser la méthode de spectroscopie proton filtrée carbone ^{13}C pour l'étude du métabolisme cérébral de la souris et d'autre part l'utilité de celle-ci. En effet au vu des SNR obtenus et de la durée des expériences il est possible d'utiliser la méthode mise au point pour l'étude du métabolisme dans de nombreuses pathologies, des variations du métabolisme étant liés à énormément d'entres elles. D'autre part l'étude de l'effet de l'antivasculaire sur le métabolisme a pu mettre en évidence l'apport de la spectroscopie $^1H -^{13}$

5. Des acquisitions sur fantôme avaient bien évidemment été réalisées avec la sonde pour la souris mais je souhaitais réaliser des acquisitions pour la comparaison sur un gel de composition strictement identique, ce qui a été réalisée en fin de thèse

C par rapport à la spectroscopie ^1H puisque des différences ont été observable avec la méthode $^1H -^{13} C$ et aucune différence significative ne l'a été avec la méthode en spectroscopie proton.

Chapitre 4

SRM de la drosophile

4.1 Contexte

La drosophile est l'insecte le plus utilisé dans le domaine de la recherche de par son intérêt génétique avec les nombreux mutants qui existent [39]. En effet comme il a été dit plus tôt en introduction générale 70% des gênes humains impliqués dans des maladies génétiques possèdent leurs équivalents dans le génome de la drosophile [22]. C'est cet avantage majeur que possède la drosophile qui en fait un sujet d'étude intéressant. De plus cet insecte possède d'autres avantages pour la recherche, dont, entre autres un temps très court entre deux générations, une facilité d'entretien... Par contre, si l'on souhaite s'y intéresser par une étude de spectroscopie par résonance magnétique il se pose le problème de la taille de l'animal qui n'excède pas les 2,5 mm de long et 1 mm de diamètre. Ce volume très faible peut être compensé par différentes méthodes. La plus simple est de travailler *ex vivo* sur extrait comme l'ont fait Sarup *et al* [60]. Cette méthode donne de bons résultats dans des temps relativement raisonnables, par contre elle nécessite beaucoup d'animaux (utilisation de 40 drosophiles pour la préparation de certains extraits). L'utilisation d'autant d'animaux peut parfois s'avérer compliquée si l'on travaille sur des souches qualifiées de « fragiles ». Righi *et al.* [59] ont été les seuls, à notre connaissance, à proposer la méthode de spectroscopie HRMAS *in vivo* chez la drosophile. Cette méthode possède de multiples avantages, elle permet d'obtenir un spectre de façon relativement rapide par rapport à la taille de l'échantillon (il est possible d'obtenir un spectre global sur un animal en l'espace de 20 min) et surtout elle permet d'obtenir des informations individu par individu. Cela peut être d'un grand intérêt pour détecter des phénomènes pouvant toucher seulement une partie d'une population étudiée. Dans le cas d'une étude sur extraits obtenue à partir de nombreux insectes comme c'est le cas dans [60] un tel phénomène pourrait ne pas ressortir de l'étude. Le plus gros inconvénient de ce type d'étude est bien évidement le fait que beaucoup de phénomènes *in vivo* ne vont pas être observables en travaillant sur extraits.

Initialement le but de ce travail a été d'obtenir un signal localisé sur la drosophile. Dans cette partie nous allons voir que la localisation a été mise en place et validée aux travers de 2 exemples. Nous allons également voir le travail qui a été réalisé en complément de l'objectif principal.

La travail présenté ici a bénéficié d'un net avantage de par l'accès aux matériels présent au CEMHTI [1]. Le spectromètre sur lequel ont été réalisées les expériences de spectroscopie est en effet équipé d'un canon de gradients et d'une sonde HRMAS 2 voies compatible avec celui-ci. Cette équipement est à l'heure actuelle unique en France.

1. Conditions Extrêmes et Matériaux : Haute température et Irradiation, UPR3079, CNRS, Orléans, France

4.2 Matériels et méthodes

Pour les acquisitions de spectroscopie sur la drosophile nous avons utilisé la méthode de HRMAS (partie 1.3.5) ainsi comme présenté plus tôt il est important de noter que les acquisitions sont synchronisées avec la période de rotation de l'échantillon (temps d'écho, applications des gradients...).

Application de la méthode de HRMAS à du matériel vivant

L'utilisation de la méthode HRMAS permet de s'affranchir de certaines interactions et phénomènes ce qui permet l'obtention de spectres résolus. Cette méthode apporte également des inconvénients qui sont l'apparition de bandes de rotation. Ces bandes apparaissent à une distance égale à la fréquence de rotation, en travaillant à une vitesse supérieure à la largeur du spectre observé il est possible de faire « disparaître » ces bandes de rotation, mais cela n'est pas nécessairement possible lorsque l'on travaille sur du matériel vivant.

Dans le cadre de notre étude il faut prendre deux paramètres en compte lorsque l'on s'intéresse aux bandes de rotation : la largeur du spectre de l'échantillon, la survie de l'animal.

4.2.1 Matériel utilisé pour l'étude

Pour les acquisitions de spectroscopie HRMAS le matériel utilisé a été le suivant :

- un spectromètre Bruker (17,6 Teslas, 750 MHz pour le proton) équipé d'une console AVANCE III ;
- un canon de gradient (x, y et z) de 2,5 $G/cm/A$ connecté à une alimentation 40 ampères ;
- une sonde de mesure HRMAS 2 canaux, ^1H et ^{13}C, équipée d'un stator 3,2 mm (Bruker Mic 2.5) ;
- une unité de contrôle HRMAS pour le contrôle de la vitesse de rotation du rotor ;
- un dispositif de contrôle de la température comprenant une unité de froid et un système de chauffage ;
- un ensemble rotor, insert (conçu par nos soins) et bouchon décrit sur la figure 4.1 ;

– un logiciel d'interface TOPSPIN 3.05

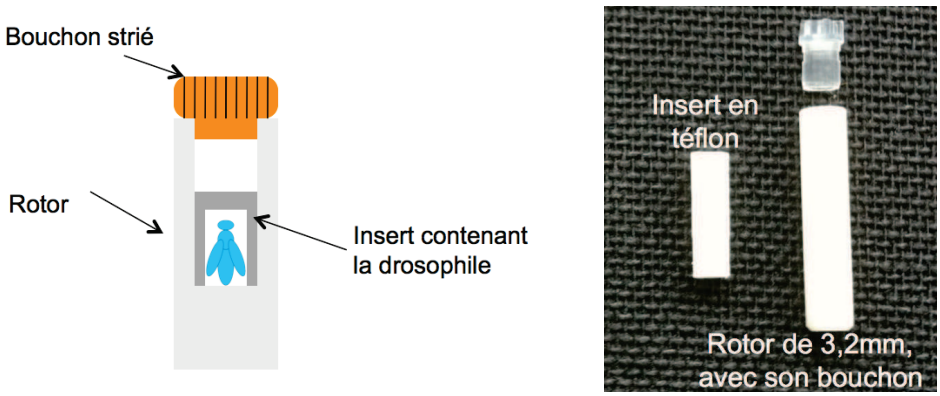


FIGURE 4.1 – A gauche schéma du rotor utilisé pour les acquisitions HRMAS sur la drosophile. On a représenté ici le rotor muni du bouchon strié (les stries permettent d'assurer la rotation du rotor lorsque l'on envoie un jet d'azote sur le bouchon), avec à l'intérieur l'insert qui sert à accueillir la drosophile. A droite photo du rotor avec le bouchon et l'insert en téflon.

4.2.2 Elevage des drosophiles

L'élevage des drosophiles a été réalisé sur un milieu standard (382 g farine de maïs / 213 g levure de bière / 68 g agar / 135 g nipagine / 3,8 mL HCl / H_2O qsp 4,25 L) dans des étuves thermostatées à 22°C. Les souches utilisées : *Oregon R* et up^{101} proviennent du Bloomington Drosophila Stock Center (USA).

4.2.3 Drosophiles utilisées

Pour les acquisitions nous avons utilisé 2 modèles de drosophile différents. Un modèle témoin (*Oregon R*) et un modèle de dégénérescence musculaire Up^{101}. Pour les deux souches nous avons utilisé des mâles et des femelles pour les acquisitions (5 mâles et 5 femelles). Les drosophiles utilisées étaient âgées de 10 jours. Le modèle Up^{101} est un modèle de myopathie, le phénotype qui y est associé est une dégénérescence musculaire au niveau du thorax de l'animal. Les ailes prenant leur bases au niveau du thorax la dégénérescence musculaire fait que les ailes se retrouvent redressées, d'où le nom de la souche, Up^{101}, cette position relevée des ailes empêche d'ailleurs les mouches de voler.

4.2.4 Protocole pour les acquisitions de spectroscopie HR-MAS sur drosophiles

Anesthésie des drosophiles

Les acquisitions sont réalisées *in vivo*, il est donc nécessaire d'anesthésier les drosophiles. Il est possible d'avoir recours à plusieurs méthodes. On peut

utiliser de l'éther mais cette méthode n'est possible que pour une anesthésie de quelques minutes. Deux méthodes qui permettent d'anesthésier les drosophiles pour de plus longues durées (jusqu'à plusieurs heures) sont l'utilisation du froid (température inférieure à $5°C$) ou du CO_2 (atmosphère 100% CO_2). Dans les deux cas la drosophile peut être anesthésiée pendant plusieurs heures mais l'anesthésie peut être plus longue sans dommage lorsque l'on utilise le froid.

Dans le cadre des acquisitions de spectroscopie HRMAS c'est la solution de l'anesthésie pas le froid qui a été choisie, car pouvant être plus longue. De plus cette solution est facile à mettre en œuvre car le spectromètre utilisé est équipé d'un dispositif de refroidissement de l'échantillon.

Préparation de l'échantillon

Afin de mettre la drosophile dans le rotor pour les acquisitions on utilise également l'anesthésie par le froid. Pour cela on utilise un bac rempli de glace dans lequel on dispose le tube contenant la drosophile, une fois celle-ci endormie il est possible de la déposer sur une feuille de papier d'aluminium au contact de glace. Il est alors possible de prendre la drosophile endormie pour la mettre en place dans l'insert.

Afin de s'assurer de la qualité des spectres acquis sur les drosophiles en spectroscopie HRMAS nous avons établi un protocole de préparation des échantillons permettant de s'affranchir d'un maximum de signaux parasites lors des acquisitions. En effet nous avons remarqué qu'en cas de non-application du protocole, il pouvait subsister du signal provenant du rotor seul. L'origine de ces signaux parasites peut être diverse. Ils peuvent venir d'une drosophile antérieure en cas de problème lors de l'acquisition, d'un solvant utilisé pour nettoyer l'échantillon ou d'un signal extérieur (poussière, graisse déposée par les mains de l'expérimentateur...).

Le protocole de préparation de l'échantillon comprend les étapes suivantes :

- décapage de l'ensemble rotor, insert et bouchon aux ultrasons dans un bain d'éthanol (durée de 5 min environ) ;
- séchage de l'ensemble dans une étuve équipée d'une pompe à vide (durée de 5 min environ à $50°C$) ;
- nettoyage des différents éléments à l'aide de papier, puis par un flux d'air issu d'un circuit d'air comprimé « sec » ;
- pesée de l'ensemble avec une balance de précision (précision à 0,1 mg dans la gamme de poids) ;
- insertion de la drosophile dans l'insert qui est ensuite mis en place dans le rotor avant que celui-ci ne soit refermé par le bouchon ;
- après les acquisitions on effectue une nouvelle pesée pour calculer le poids de la drosophile.

4.2.5 Séquences utilisées

Le but du travail est de réaliser des acquisitions de spectroscopie localisée sur la drosophile. Les séquences à utiliser sont connues, ce sont les même séquences utilisées pour la spectroscopie globale, avec des impulsions sélectives accompagnées de gradient de sélection de coupe. Ainsi on va réaliser des acquisitions de spectroscopie sur des tranches de drosophiles. La difficulté du travail va résider dans la localisation, cette localisation va nécessiter un travail de mise en place, et aussi une validation.

Notation utilisée

Afin de simplifier les schémas de séquences présentées ensuite dans cette partie je vais utiliser la notation *mas* pour désigner l'axe selon lequel se fait la rotation de l'échantillon, et G_{mas} le gradient selon cet axe. Cet axe étant défini comme étant la grande diagonale du cube formée par la base orthonormée $\vec{x}$, $\vec{y}$ et $\vec{z}$, il faudra voir G_{mas} comme étant la combinaison égale des trois gradients de G_x, G_y et G_z (avec un rapport $\sqrt{3}$ pour les amplitudes).

On notera f_{rot} la fréquence de rotation de l'échantillon.

4.2.5.1 Spectroscopie globale

Les séquences utilisées présentées ici sont les séquences qui correspondent au travail de Righi *et al.* [59] (Fig.4.2 et 4.3). La première correspond à une séquence d'écho de spin précédée d'une impulsion de saturation de l'eau. L'utilisatio d'une séquence d'écho de spin a été choisi dans le but de supprimer les signaux dus aux macromolécules. Les paramètres utilisés sont les suivants :

- saturation de 1 s
- $\frac{T_E}{2} = \frac{1}{f_{rot}}$

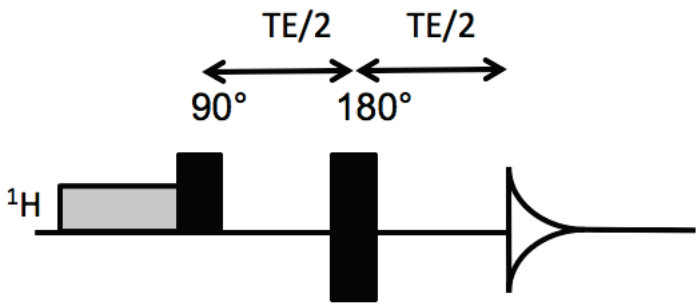


FIGURE 4.2 – Séquences utilisé pour les acquisitions de spectroscopie sur toute la drosophile. Cette séquence est une séquence d'écho de spin. La suppression d'eau est réalisée par une impulsion de saturation d'une durée de 1 s.

Sur la figure 4.3 j'ai représenté la séquence TOBSY utilisée (TOtal throught Bond Correlation Spectroscopy) . Cette séquence est tirée de [3] et a été utilisée par Righy *et al.* dans son étude sur la drosophile. C'est une séquence de

spectroscopie 2D homonucléaire adaptée de la séquence TOCSY, elle permet donc de voir les couplages scalaires. Cette séquence a l'avantage de renvoyer un rapport signal sur bruit qui est de 20 à 30% plus important que dans le cas de l'utilisation de la séquence TOCSY, dans le cas de la spectroscopie MAS.

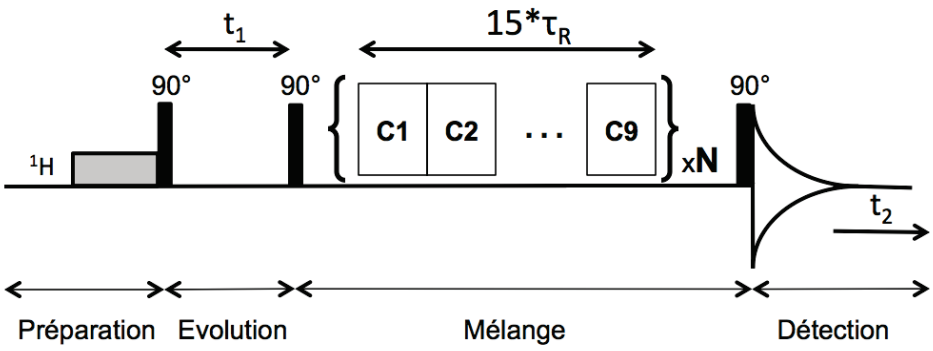


FIGURE 4.3 – Séquence 2D homonucléraire de type TOBSY. Dans cette séquence on retrouve les 4 parties qui composent une séquence de spectroscopie $2D$ (préparation, évolution, mélange et détection).La séquence de préparation comprend la suppression du signal de l'eau, la période d'évolution est de durée incrémentable t_1, la période de mélange est constitué de **N** modules eux même composé de 9 doublets d'impulsions adiabatiques de type Wurst Chacun de ces modules dure 15 périodes de rotation de l'échantillon. La période de détection est de durée fixe t_2. Schéma de la séquence adapté depuis [3]

4.2.5.2 Spectroscopie localisée

Le but de cette étude est de réaliser de la spectroscopie localisée. Dans un premier temps la séquence qui a été utilisée est une séquence d'écho de spin avec l'utilisation d'impulsion spatialement sélectives ainsi que de gradients. La séqunce choisie est représentée sur la figure 4.4. Le temps d'écho correspond à 2 périodes de rotation de l'échantillon. Le choix a été fait de travailler localement sur des tranches, et non pas sur des voxels (avec une acquisition de type PRESS) pour des raisons de durée d'acquisition. En effet en travaillant sur des voxels le volume observé aurait été beaucoup plus petit. Une augmentation de la durée des acquisitions aurait alors été nécessaire pour obtenir un rapport signal sur bruit suffisant. Le choix a donc été fait de travailler sur des tranches perpendiculaires à l'axe tête-abdomen de la drosophile.

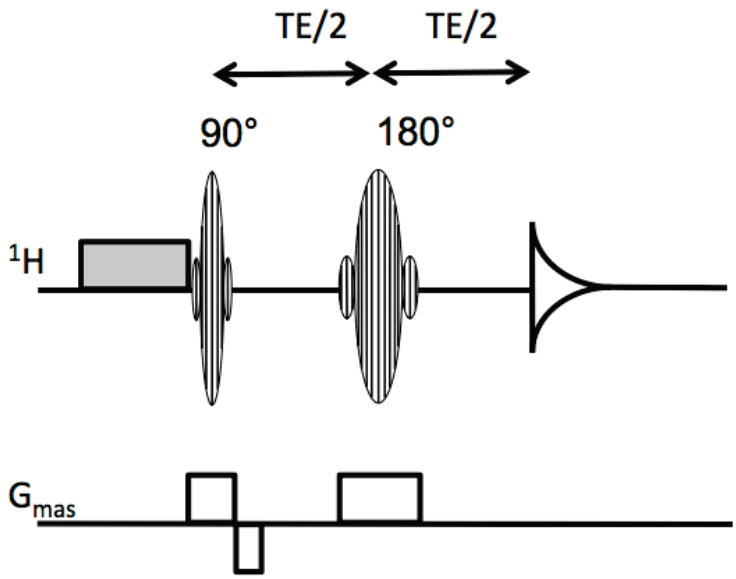


FIGURE 4.4 – Séquence utilisée pour les acquisitions de spectroscopie localisée sur la drosophile. Cette séquence est une séquence d'écho de spin dont les impulsions sont sélectives. En parallèle des impulsions sélectives on retrouve les gradients selon l'axe G_{mas}. La suppression d'eau est réalisée par une impulsion de saturation d'une durée de 1 s.

4.2.6 Problème de la normalisation des données

Comme pour toute les acquisitions de SRM réalisées *in vivo* le problème de la normalisation se pose également dans le cadre des acquisitions sur la drosophile. Pour réaliser la normalisation trois méthodes courantes s'offrent à nous, l'utilisation d'une référence interne physique (capsule contenant un produit dont la quantité est connu), le recours à une référence électronique rajouté durant l'acquisition [1] (méthode ERETIC) ou bien un signal digital rajouté en post-acquisition [75] (méthode PULCON).

La première méthode nécessite la fabrication d'une capsule, contenant idéalement une quantité de produit connue, à défaut constante. La deuxième solution a été proposée il y a quelques années par Barantin *et al.* et consiste à envoyer un signal électronique, à une certaine fréquence, qui va suivre la chaine de mesure et va être présent dans le spectre. Cette méthode nécessite d'être implémentée et d'avoir du matériel supplémentaire (pour l'envoi du signal). La dernière méthode a été proposée par Wider *et al.* et consiste à rajouter un pic dans le spectre après acquisition. Ce pic sert ensuite de référence pour quantifier les différentes composantes des spectres et les comparer d'un spectre à l'autre.

Dans tout les cas ces méthodes permettent d'obtenir des données quantitatives selon comment le travail est réalisé. L'emploi de ces méthodes nécessite par contre beaucoup de soin. En effet lors de l'utilisation de ces méthodes plu-

sieurs points sont à contrôler. Bien évidemment les réglages (gain, valeurs des impulsions...) doivent toujours êtres identiques (cela est surtout critique pour les 2 dernières méthodes), et l'échantillon, ainsi que la capsule de référence, doivent êtres aux mêmes endroits (la position en hauteur est critique dans le cas du HRMAS). Dans le cadre des expériences réalisées, nous avons eu recourt à la méthode PULCON, car c'est celle qui était la plus facile à mettre en place.

4.3 Résultats

4.3.1 Vitesse de rotation

Afin de fixer une vitesse de rotation qui nous permette à la fois une bonne survie de l'animal et qui ne nous gêne pas avec les bandes de rotations nous avons procédé à une série de tests en rotation pour différentes valeurs.

Nous avons tout d'abord fait l'acquisition d'un spectre avec une vitesse de rotation élevée (vitesse de rotation supérieure à la largeur du spectre d'intérêt, c'est à dire à 4000Hz) sur une mouche morte (souche *Oregon R*). Ce spectre nous a permis de repérer l'ensemble des pics d'intérêt ainsi que les zones où il n'y a pas de pics dans le spectre. Nous avons également pu identifier les pics de forte intensité, susceptibles de faire apparaître des bandes de rotation suffisamment importantes pour venir perturber le spectre. Le pic de plus forte intensité identifié dans le spectre de la drosophile est le pic associé aux CH_2 (lipides). En faisant tourner un échantillon d'une drosophile morte (souche *Oregon R*) à différentes vitesses nous avons pu constater que plusieurs pics donnent des bandes de rotation pouvant être d'intensités suffisantes pour perturber le signal provenant d'autre pics (cf. Fig.4.8)

Il est important de noter qu'une zone ne contenant pas de pic dans nos conditions de mesure a été identifiée entre 4,5 et 5,2 *ppm*. Cette zone est distante d'environ 2630 Hz du pic des CH_2. Il est donc possible de faire en sorte « d'envoyer » la bande de rotation du pics des CH_2 dans cette zone car elle ne perturbera pas le signal d'autre pics. Les autres bandes de rotation étant de moindre amplitude, si elles existent, perturberont peu le spectre, et pourront facilement être identifiées.

Nous avons donc réalisé des tests de survie sur les drosophiles en les faisant tourner à 2630 et 4000 Hz (5 mâles et 5 femelles à chaque fois). En faisant tourner les drosophiles à 2630 Hz nous avons eu un taux de survie de 100%, dans le cas de la rotation à 4000 Hz la survie n'a été que de 50%. Pour la suite des expériences nous avons donc choisi de fixer la valeur de rotation à 2630 Hz. L'utilisation de cette valeur nécessite de prendre une précaution. En effet cette valeur permet de renvoyer la bande de rotation du pic de plus forte intensité dans la zone où il n'y a pas de pic d'intérêt dans le cas de drosophile de référence. Il faut bien prendre en compte que cette zone n'est pas nécessairement vierge de signal dans le cadre d'un travail sur d'autre souche

de drosophile. Ainsi lorsque l'on commence des expériences sur des souches différentes il est plus prudent de réaliser des spectres avec 2 valeurs de rotation afin de vérifier si la bande de rotation du pic des CH_2 à 2630 Hz ne masque pas un pic dans le spectre.

4.3.2 Mise en place de la localisation

Afin de mettre en place la localisation nous avons décidé d'acquérir le profil en densité de proton le long de l'axe de rotation (IRM à une dimension). C'est à partir de ces profils que nous avons déterminé les 3 zones d'intérêts. Pour cela on utilise une séquence de type écho de spin sans suppression d'eau. Ensuite, après avoir déterminé les zones d'intérêts à partir du profil de densité de proton, on réalise le même type d'acquisition mais en utilisant des impulsions spatialement sélectives. Un exemple des profils obtenus avec cette séquence est représenté sur le figure 4.7.

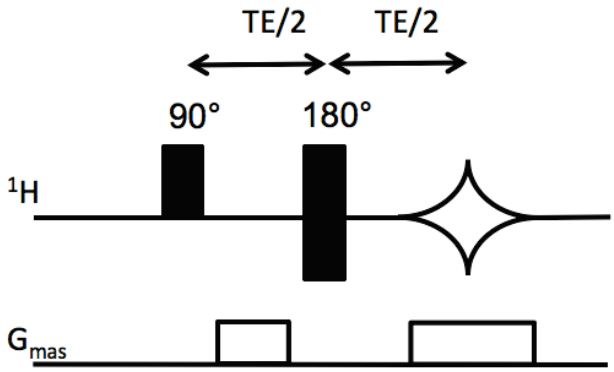


FIGURE 4.5 – Séquence utilisée pour l'acquisition du profil en densité de proton de l'ensemble de la drosophile le long de l'axe G_{mas}. Le gradient G_{mas} est activé entre les deux impulsions ainsi que pendant la réception du signal.

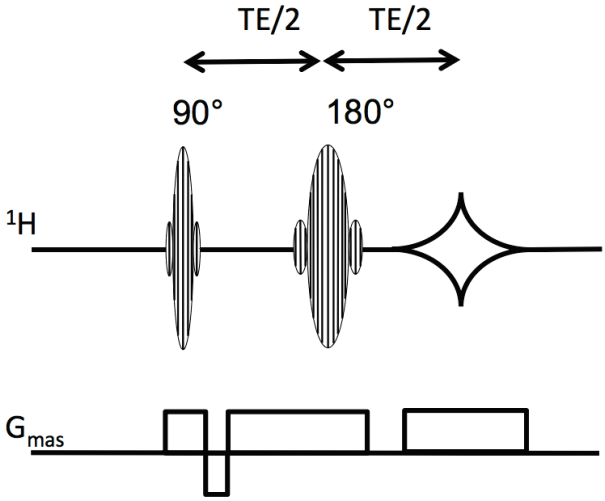


FIGURE 4.6 – Séquence utilisée pour l'acquisition d'un profil localisé. Les impulsions sont sélectives et sont appliquées en parallèle de gradients selon l'axe G_{mas}. Un gradient de lecture est également appliqué durant la réception du signal.

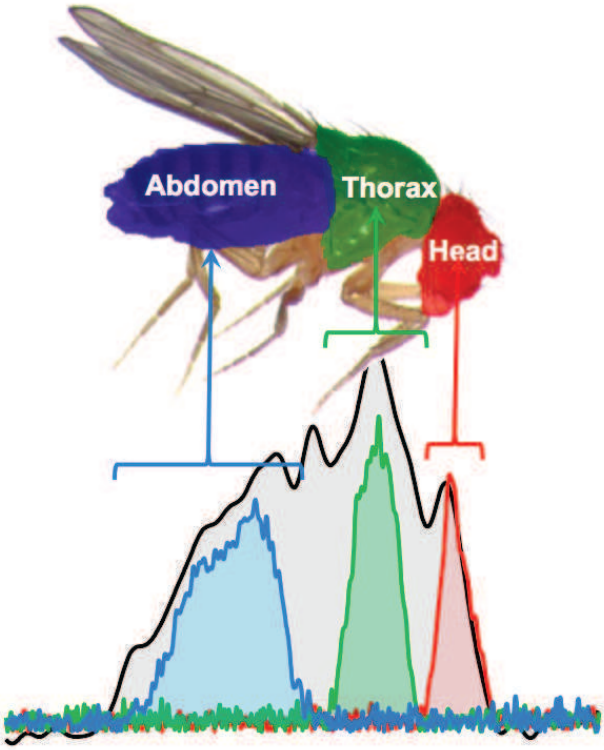


FIGURE 4.7 – Schéma explicatif présentant le principe de la sélection des coupes pour les acquisitions de spectroscopie localisée. On a représenté la mouche avec les 3 parties, tête, thorax et abdomen, mises en évidence en rouge, vert et bleu. En dessous 4 profils de densité de protons sont représentés. En noir le profil obtenu utilisant des impulsions non sélectives, en rouge, vert et bleu, les 3 profils obtenus en utilisant des impulsions sélectives ajustées afin de correspondre aux structures, tête, thorax et abdomen.

4.3.3 Résultats obtenus sur les deux souches étudiées

Les drosophiles de la souche *Oregon R* sont considérées dans l'étude comme les drosophiles de références. Nous avons donc choisis de travailler plus spécifiquement sur celles-ci pour l'identification des différents métabolites.

4.3.3.1 Spectres obtenus sur la souche *Oregon R*

Sur la figure 4.8 j'ai représenté un spectre 1D obtenu à l'aide d'une séquence écho de spin correspondant à la drosophile entière. On peut distinguer deux parties sur cette figure. La partie de droite qui comporte des pics de fortes amplitudes (en particulier le pic des CH_2 correspondant aux lipides) et la partie entre 2,5 et 5 *ppm* qui comportent plus de pics mais de moindre amplitude. Cette figure permet de mettre en évidence la présence des bandes de rotation qui sont principalement présentes dans la zone de 4,3 à 5,6 *ppm*. L'amplitude de ces bandes de rotation dépendant de l'homogénéité du champ (cf. 1.3.5) il

est possible qu'elles soient de moindre amplitude et qu'elle ne soit pas visibles sur tout les spectres.

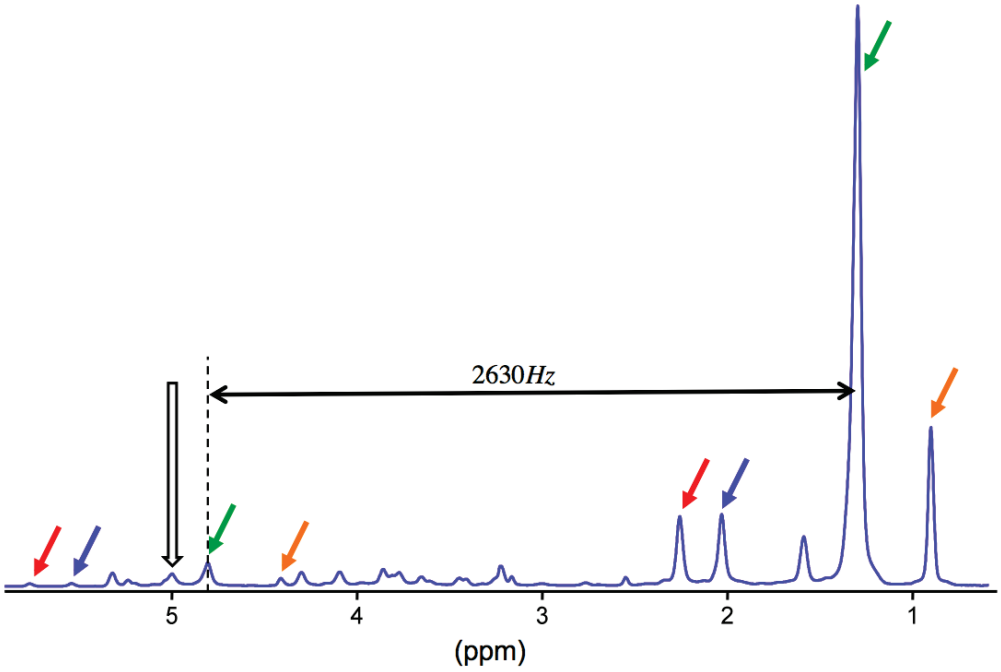


FIGURE 4.8 – Spectre proton 1D obtenu *in vivo* sur la totalité de la drosophile. Sur ce spectre on peut observer à droite des pics d'amplitude plus importante qui possèdent des bandes de rotation visible dans le spectre. J'ai identifié les pics et leurs bandes de rotation associée par paires de flèches de même couleur. On peut remarquer que la distance entre les pics et leurs bandes de rotation est bien de 2630 Hz. Le pic désigné par la flèche blanche est le résidu du pic de l'eau après suppression .

Identification des pics à l'aide de la séquence TOBSY

Sur les figures 4.9 et 4.10 j'ai identifié une partie des pics sur le spectre $2D$. Les valeurs des déplacements chimiques utilisées pour l'identification sont issues de la publication de Govindaraju *et al.* [25]. Cette étape a permit l'identification de nombreux métabolites, en particulier dans le massif très dense entre 3 et 4,5 *ppm*.

Une plus grande parties des pics identifiés sont reportés sur le spectre 1D donné sur les fiigures 4.11 et 4.12.

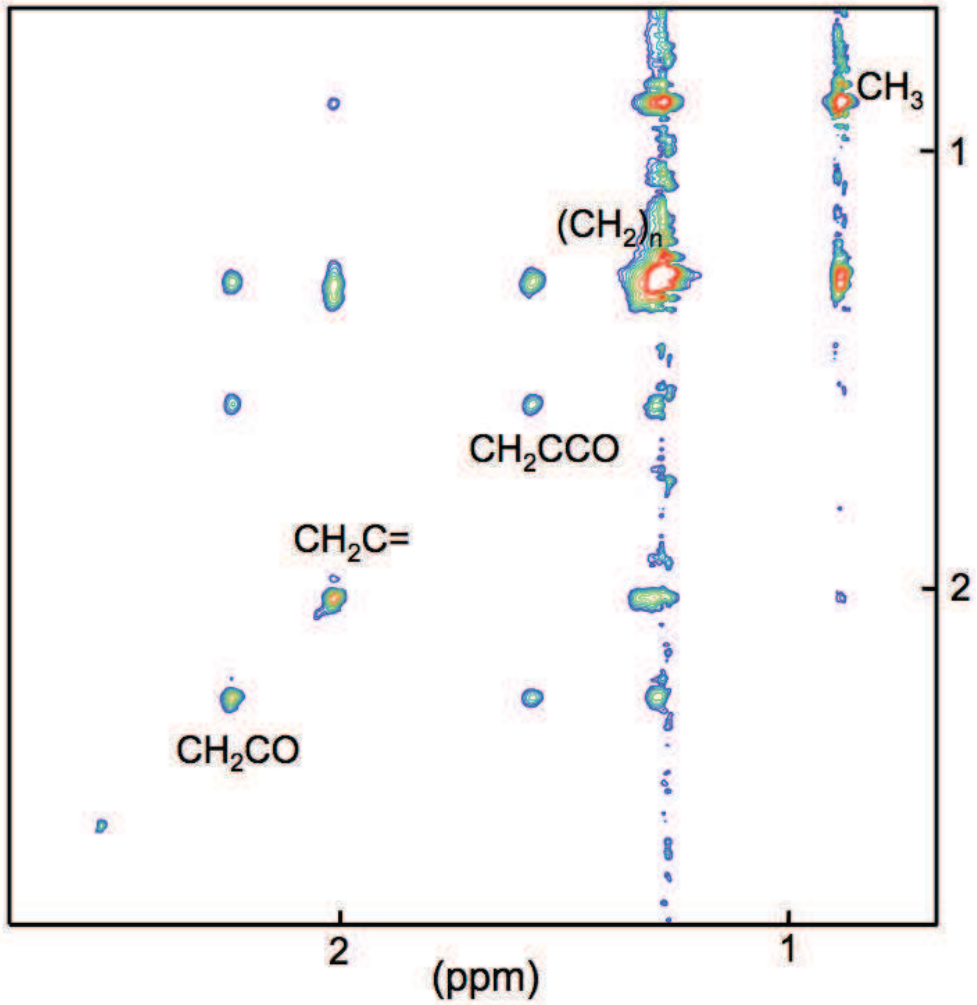


FIGURE 4.9 – Spectre 2D obtenu sur une drosophile (*Oregon R* femelle) à l'aide d'une séquence TOBSY. Sur la figure on a identifié différents pics.

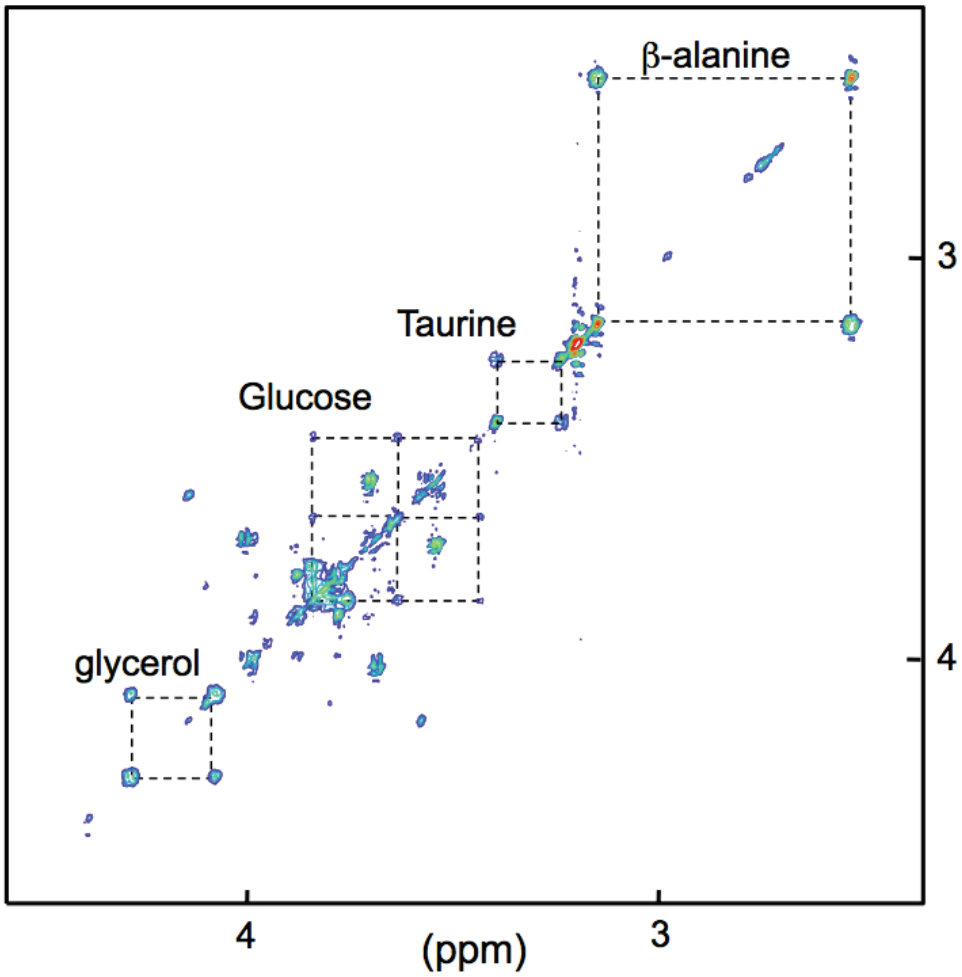


FIGURE 4.10 – Spectre 2D obtenu sur une drosophile (*Oregon R* femelle) à l'aide d'une séquence TOBSY. Sur la figure on a identifié différents pics.

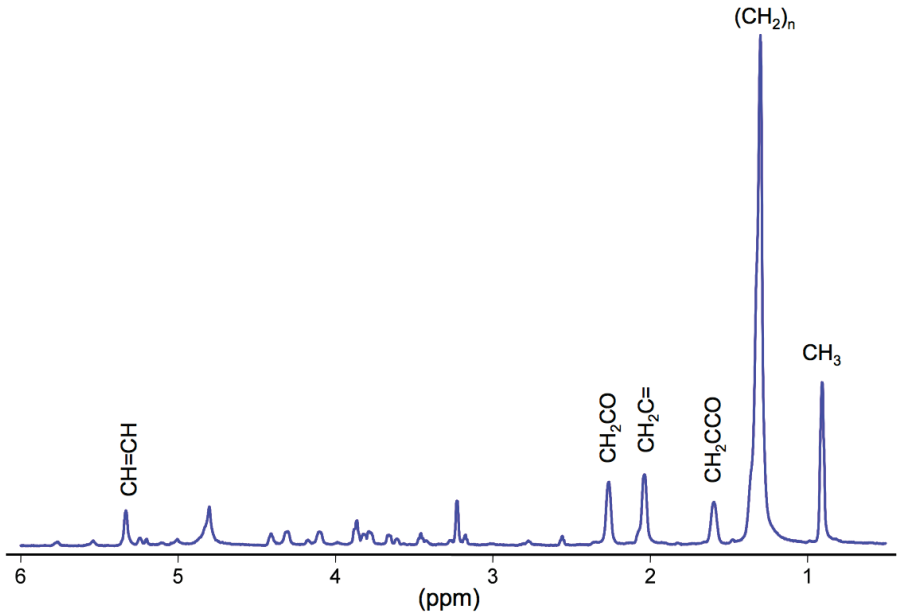


FIGURE 4.11 – Spectre 1D obtenu sur une drosophile *Oregon R* femelle à l'aide d'une séquence écho de spin en rotation à l'angle magique. ($TR = 2\ s$, $T_E = 0{,}76\ ms$ 512 répétitions). Sur cette figure j'ai indiqué le nom des pics de plus grande amplitude. Le reste des pics identifiés mais de plus faibles amplitudes sont en partie indiqué sur la figure suivante (Fig.4.12)

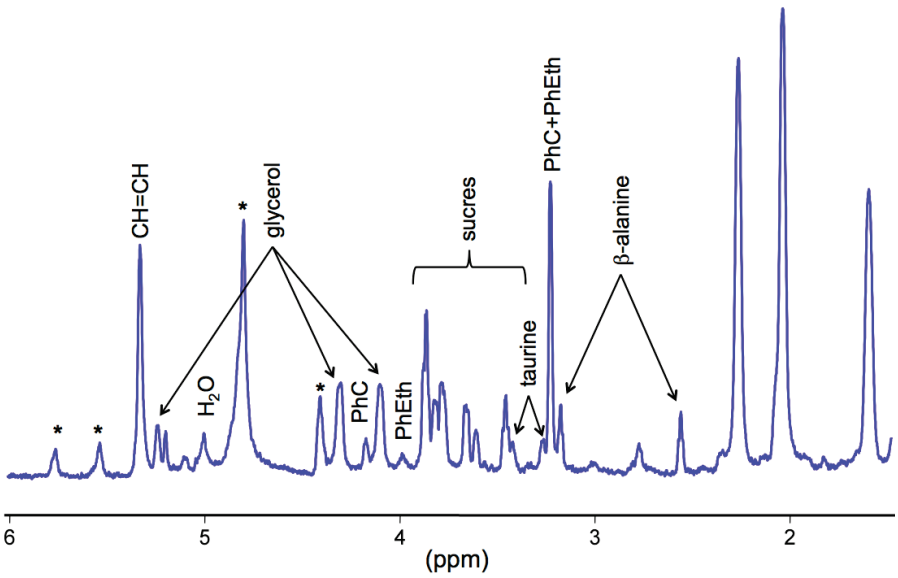


FIGURE 4.12 – Zoom sur la partie entre 2,5 et 6 *ppm* du spectre représenté sur la figure 4.11. Sur ce spectre j'ai reporté une partie des pics identifié à l'aide des données obtenues avec la séquence TOBSY. Les bandes de rotation qui sont visibles sont indiquées à l'aide d'une $*$

Différence entre mâle et femelle

Sur la figure 4.13 j'ai représenté deux spectres, l'un ayant été acquis sur une drosophile *Oregon R*, mâle et l'autre sur une femelle. Nous avons pu identifier plusieurs différences entre les spectres issus des mâles et ceux issus des femelles, en particulier plusieurs pics dont un signal très bien défini à 1.93 *ppm* et un groupement à 4,5 *ppm*. Ces deux signaux ont la particularité d'être exclusifs aux mâles, d'autre signaux, non spécifiques, sont tout de même d'amplitudes différentes entre mâles et femelles (zone entre 3 et 4,5 *ppm*).

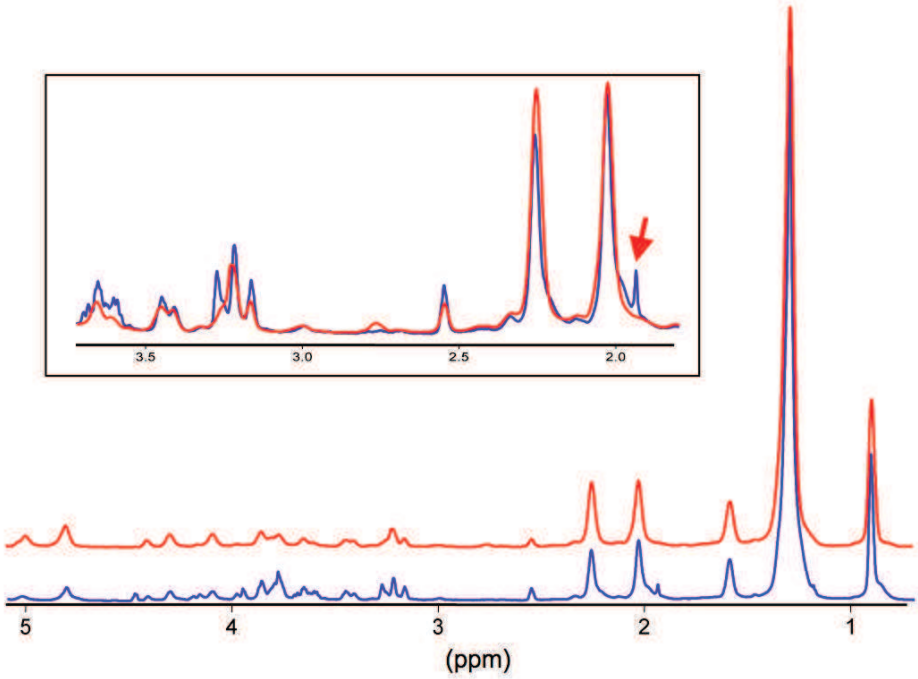


FIGURE 4.13 – Spectres 1D proton obtenus sur la souche *Oregon R*. Le spectre rouge correspond à la femelle, le spectre bleu correspond au mâle. Dans l'encadré j'ai représenté un zoom de la zone allant 2,8 à 3,7 *ppm*. Sur cette zone on peut facilement voir un pic qui est spécifique au mâle. D'autres pics semblent avoir des amplitudes différentes entre les mâles et les femelles. Spectres obtenus sur toute la drosophile en 17 min ($T_R = 2\ s$, $N_{acc} = 512$)

4.3.3.2 Spectres obtenus sur la souche *Up*^{101}

Sur la figure 4.14 j'ai représenté deux spectres obtenus sur des drosophiles mâles Oregon et *Up*^{101}. Ces deux spectres sont les résultats de la somme de 5 spectres obtenus dans chacun des cas sur 5 mâles. Les spectres diffèrent principalement aux niveaux de deux pics qui sont les pics correspondant à la β-alanine (différence statistique à + de 99% avec un test de Mahn-Whitney).

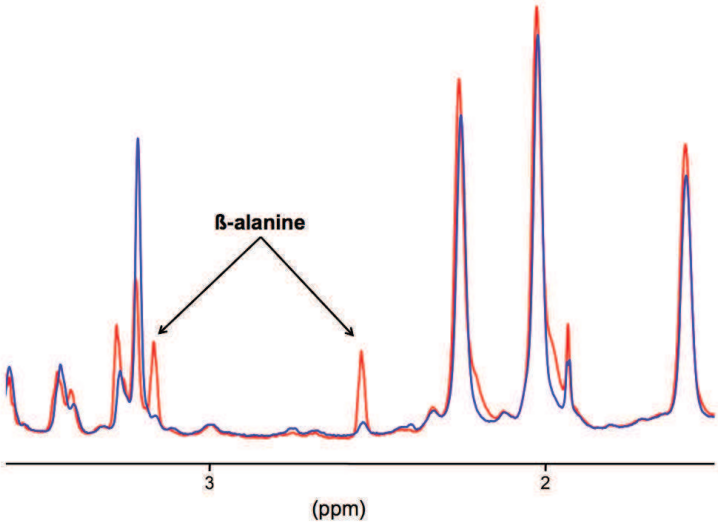


FIGURE 4.14 – Spectres 1D proton obtenus sur les souches *Oregon R* et Up^{101} . Le spectre rouge correspond aux mâles *Oregon R* et le spectre bleu correspond aux mâles Up^{101}. Spectres obtenus sur toute la drosophile en 17 min ($T_R = 2\ s$, $N_{acc} = 512$)

4.3.4 Observation d'un signal parasite

A plusieurs reprises, au cours de la mise au point des expériences nous avons repéré un signal particulier dans différents spectres (plusieurs pics répartis dans le spectre qui semblaient évoluer de la même façon). Ce signal nous a paru suspect car il pouvait présenter une très forte intensité par rapport aux autres pics, et qu'il n'apparaissait pas à chaque fois. Ce signal a été identifié comme provenant du milieu de culture utilisé pour l'élevage des drosophiles (de son nom commercial le Sordalab®). Sur la figure 4.15 j'ai représenté un spectre du produit et de deux une drosophiles, femelle *Oregon R* pour lesquelles les spectres était anormaux, obtenus dans les même conditions (hormis le nombre de répétitions qui a été réduit dans le cas du produit).

La provenance de ce signal peut alors provenir de deux sources. La première est tout simplement la présence de l'aliment dans le système digéstif de la la drosophile, ce signal ne va pouvoir être supprimé qu'en changeant le milieu de culture des drosophiles et en passant par exemple à de l'eau sucré (glucose alimentaire). Cette solution n'est pas toujours applicable car l'expérience peut imposer tel, ou tel milieu de culture. De plus nous avons identifié ce problème avec le sordalab® mais il est possible de rencontrer d'autres milieux de culture pour lesquelles le signal n'est pas connu (l'acquisition du spectre du milieu de culture est alors recommandé en cas d'utilisation d'un autre produit que le Sordalab®).

L'autre source possible, dans ce cas on a observé un important signal provenant du sordalab, est la nourriture qui était collée aux drosophiles (typiquement sur les ailes), et qui avait pu se coller lors de la phase d'anesthésie des

drosophiles. Afin de limiter cette source de contamination du signal il suffit alors tout simplement de placer les drosophiles dans un tube vide avant de les anesthésier.

Il est important d'essayer de s'affranchir de ce signal parasite. L'apparition de certains pics, s'il apparaissent à des endroits du spectres où il n'y a pas de signal n'est pas trop grave mais dans le cas où le signal du produit vient se superposer à un signal existant cela s'avère plus gênant pour l'étude.

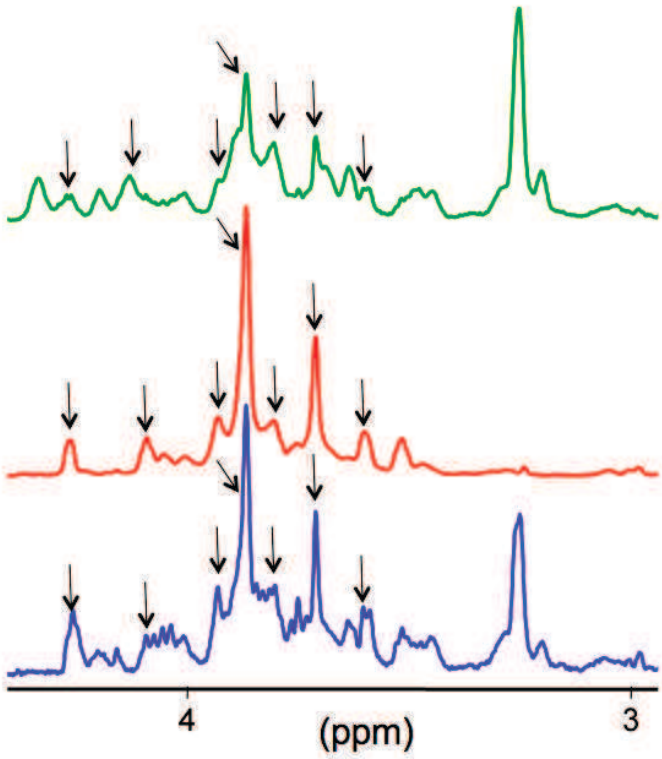


FIGURE 4.15 – Spectres 1D proton obtenus sur deux drosophiles *Oregon R* et sur le milieu de culture (Sordalab®) . Le spectre rouge correspond au spectre du sordalab. Les spectres vert et bleu sont deux spectres obtenu à partir de deux drosophiles différentes. On a ici l'exemple d'un spectre qui est fortement pollué par le signal du Sordalab (en bleu) et d'un spectre qui l'est un peu moins (en vert). Avec les flèches noires j'ai indiqué certains pics du produit que l'on retrouve dans les spectres des drosophiles. L'acquisition sur la drosophile a été réalisée en 17 min, celle sur le produit a été de 2 minutes.

.

4.3.5 Résultats obtenus en spectroscopie localisée

Les séquences de spectroscopie localisées ont été réalisées sur les drosophiles Oregon et Up^{101}, sur les trois structures, tête, thorax et abdomen. Sur la figure 4.16 sont représentés des exemples de spectres localisées obtenus sur

des modèles Oregon et Up^{101}. Sur ces spectres ont peut voir plusieurs points importants. D'une part le signal provenant des chaines longues (les pics de plus fortes intensités) est principalement présent dans l'abdomen et la tête. Dans l'abdomen on retrouve de nouveau le signal provenant du milieu de culture des drosophiles (Sordalab®). On peut également remarquer la présence des pics spécifiques aux mâles exclusivement dans le spectre acquis sur l'abdomen (pic à 1,93 *ppm* et groupement à 4,5 *ppm*). Relativement à l'abdomen, la tête et le thorax, contiennent beaucoup de métabolites.

Le signal provenant de la β-alanine provient en quasi totalité du thorax, un peu de signal se retrouve dans le spectre provenant de la tête. Sur cette figure on remarque de nouveau qu'il n'y a pas, ou peu, de signal provenant de la β-alanine dans le spectre obtenu sur le mutant Up^{101} (spectre localisé sur le thorax).

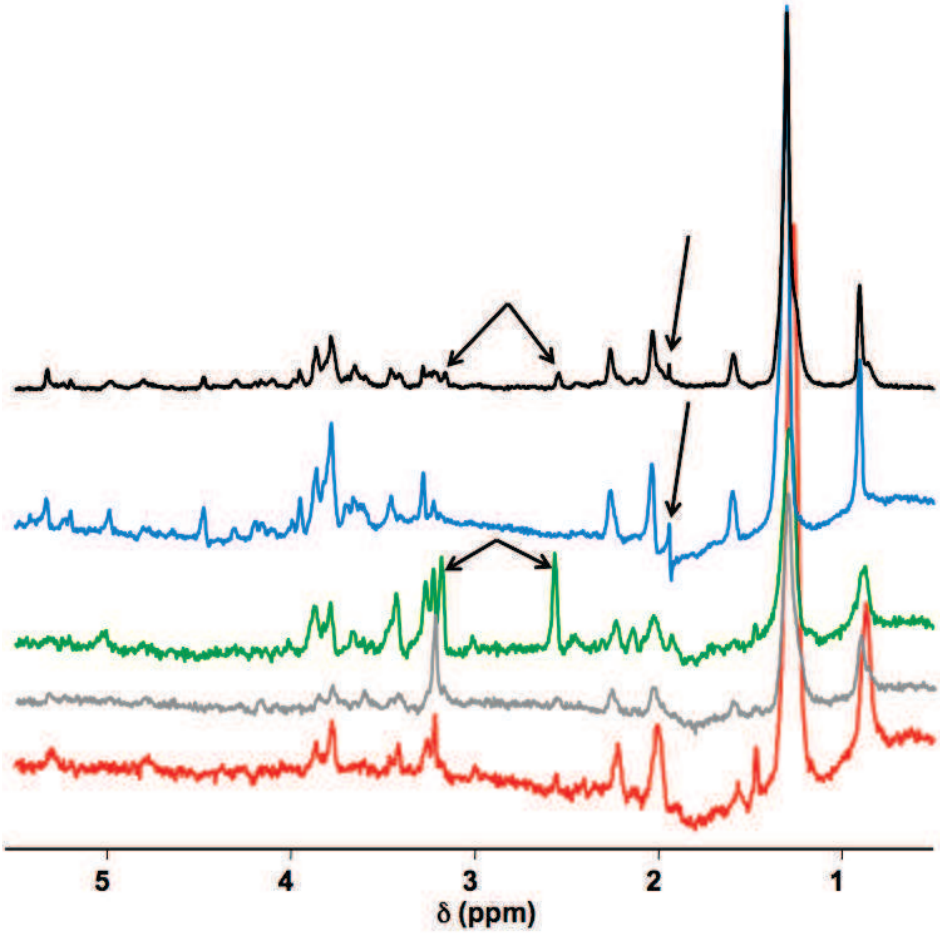


FIGURE 4.16 – Exemples de spectres obtenus en spectroscopie localisée sur une drosophile mâle. De bas en haut on retrouve, en rouge, un spectre obtenu sur la tête d'une drosophile *Oregon R*, épaisseur de la tranche de 400 μm, $N_{acc} = 6144$. En gris, spectre obtenu sur le thorax d'une drosophile Up^{101} , épaisseur de la tranche de 400 μm, $N_{acc} = 4096$. En vert, spectre obtenu sur le thorax d'une drosophile *Oregon R* , épaisseur de la tranche de 400 μm, $N_{acc} = 4096$. En bleu, spectre obtenu sur l'abdomen d'une drosophile *Oregon R* , épaisseur de la tranche de 800 μm, $N_{acc} = 2560$. Le spectre représenté en noir est le spectre obtenu sur la drosophile entière en 17 min ($N_{acc} = 256$).

4.3.6 CSI de la drosophile

Après avoir réalisé la spectroscopie localisée sur les différentes zones nous nous sommes posés la problématique de réaliser de la spectroscopie localisée sur plusieurs zones en un minimum de temps. Les séquences de spectroscopie utilisées pour le moment, en fonction de la structure étudiée, ont une durée respective de 1h34, 2h30 et 3h45 pour l'abdomen, le thorax et la tête. Si l'on souhaite acquérir le signal sur ces 3 zones pour chaque drosophile cela prend

un temps total de 7h50. Afin de limiter la durée d'acquisition, tout en réalisant au minimum 3 coupes, nous avons envisagé 3 solutions.

- La première idée a été de mettre à contribution le temps mort présent dans la séquence. En effet le TR de la séquence de spectroscopie localisée est de 2 s, qui inclue une suppression d'eau de 1 s et un temps d'écho de l'ordre de la ms, l'acquisition se faisant sur 100 ms il y a quasiment 900 ms de temps mort durant chaque acquisition. Nous avons eu pour idée de réaliser la séquence présentée sur la figure 4.17. La mise en place de cette méthode aurait sans doute nécessitée un travail sur la suppression d'eau afin de la rendre la plus efficace possible et ainsi diminuer les temps de saturation de l'eau (éventuellement en passant par des méthodes de type CHESS ou VAPOR). Avec une telle méthode il est envisageable d'obtenir le signal des 3 zones d'intérêt en utilisant le même T_R ou une valeur un peu plus grande (en fonction de l'efficacité de la suppression de l'eau).
- La deuxième solution envisagée a été d'utiliser une séquence se basant sur le codage de Hadamard [9]. Avec une telle méthode il est nécessaire de faire un cyclage sur 4 acquisitions ($2^{\text{Nbr de coupe}-1}$). Avec une telle méthode il va être possible d'obtenir le signal provenant des 3 zones le temps d'un même T_R.
- La troisième et dernière solution envisagée a été de réaliser une séquence CSI à une dimension spatiale. En utilisant cette méthode il va être possible d'obtenir une information provenant de toute la drosophile en utilisant le même T_R que dans le cas d'une acquisition localisée sur une unique tranche. A partir de l'information récupérée il est possible de reconstituer les spectres de toute les parties de la drosophiles (tête, thorax, abdomen) et même de définir des zones plus fines en fonctions de l'étude réalisée.

C'est la méthode de spectroscopie CSI à une dimension spatiale qui a été retenue car c'est celle qui nous offre la possibilité de récupérer le plus d'information en un minimum de temps. J'ai représenté la séquence utilisée sur la figure 4.18. Les paramètres d'acquisition sont les suivants :

- $T_E = \frac{2}{f_{rot}}$;
- $T_R = 4\ s$;
- $FOV = 5\ mm$;
- $N_{acc} = 256$;
- le nombre d'incréments de phase est de 32, ainsi la résolution spatiale, le long de l'axe est de 156 μm ;
- la durée totale de 3h56.

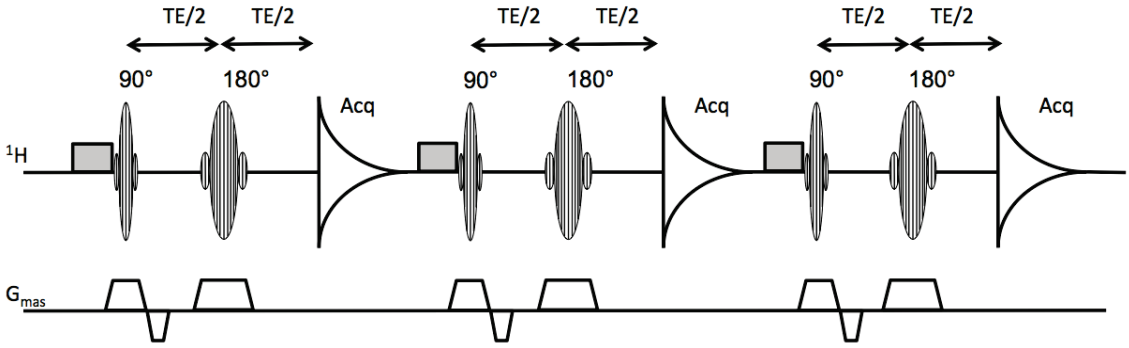


FIGURE 4.17 – Exemple de séquence envisagée afin de réaliser l'acquisition du signal provenant des 3 tranches dans la même acquisition. Pour cette séquence les impulsions utilisées sont à chaque fois sélectives. La suppression d'eau est représentée à l'aide des impulsions de saturation, représentées par les rectangles gris. Celle-ci doit être réalisée avant chaque impulsion 90°sélective.

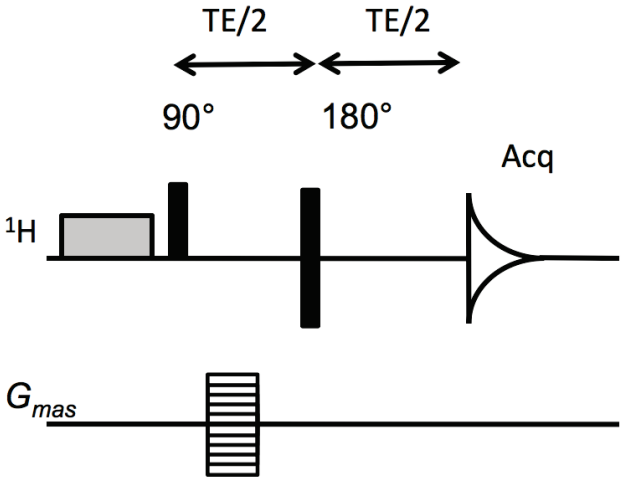


FIGURE 4.18 – Séquence CSI à une dimension spatiale utilisée pour les acquisitions HRMAS *in vivo* sur la drosophile. Etant donnée que la séquence renvoie seulement une dimension spatiale on retrouve ici un seul gradient de codage de phase selon l'axe de rotation du rotor. C'est ce gradient qui permet d'obtenir l'information sur les différentes tranches.

4.3.6.1 Résultats obtenus en CSI

Nous avons fait des acquisitions CSI sur des drosophiles Oregon et Up^{101}. Ainsi il nous a été possible de réaliser une cartographie 1D de la répartition des métabolites de la drosophile pour les deux souches étudiées. Ce type d'acquisitions renferme une grande quantité d'information. En effet avec les acquisitions CSI il est possible d'avoir une information sur les corrélations spatiales entre les différents métabolites présent dans la drosophile. La résolution spatiale le

long de l'axe d'acquisition de la drosophile étant de 156 μm (32 tranches pour un champ de vue de 5 mm), on acquière pour chaque structures plusieurs spectres. Il est donc possible ensuite de sommer plusieurs spectres obtenus sur différentes tranches pour obtenir une information sur toute une zone ou sur une partie seulement de la structure, cela peut en particulier être intéressant au niveau de l'abdomen où certain organes sont localisés. Etant donné la taille de la structure on peut envisager de travailler sur seulement 2 ou 3 spectres tout en ayant un rapport signal sur bruit suffisant.

Sur la figure 4.19 j'ai représenté un spectre CSI acquis *in vivo* sur une drosophile *Oregon R* femelle sur une durée totale de 3h56. Sur la figure deux choses importantes sont mises en évidences :

- d'une part le fait que l'on retrouve la localisation spatiale pour les différents pics qui sont corrélé car provenant du même métabolite (exemple de la β-alanine dont le signal est entouré en rouge sur la figure) ;
- d'autre part le fait que l'on trouve une corrélation spatiale pour des pics qui ne proviennent pas nécessairement de la même molécule (zones entourées en orange qui désignent des signaux provenant de molécules ayant la même localisation).

Sur la figure 4.20 j'ai représenté des spectres 1D obtenus à partir des données CSI en sommant les spectres issus d'une même structure. On retrouve 3 spectres pour les parties tête thorax et abdomen. Avec cette figure on peut se rendre compte que l'on obtient le même type de spectre que lorsque l'on travaille en spectroscopie localisée. Le temps nécessaire pour l'obtention de ces spectres (extraits des données CSI) est par contre beaucoup plus court que si l'on acquière les 3 spectres les uns après les autres.

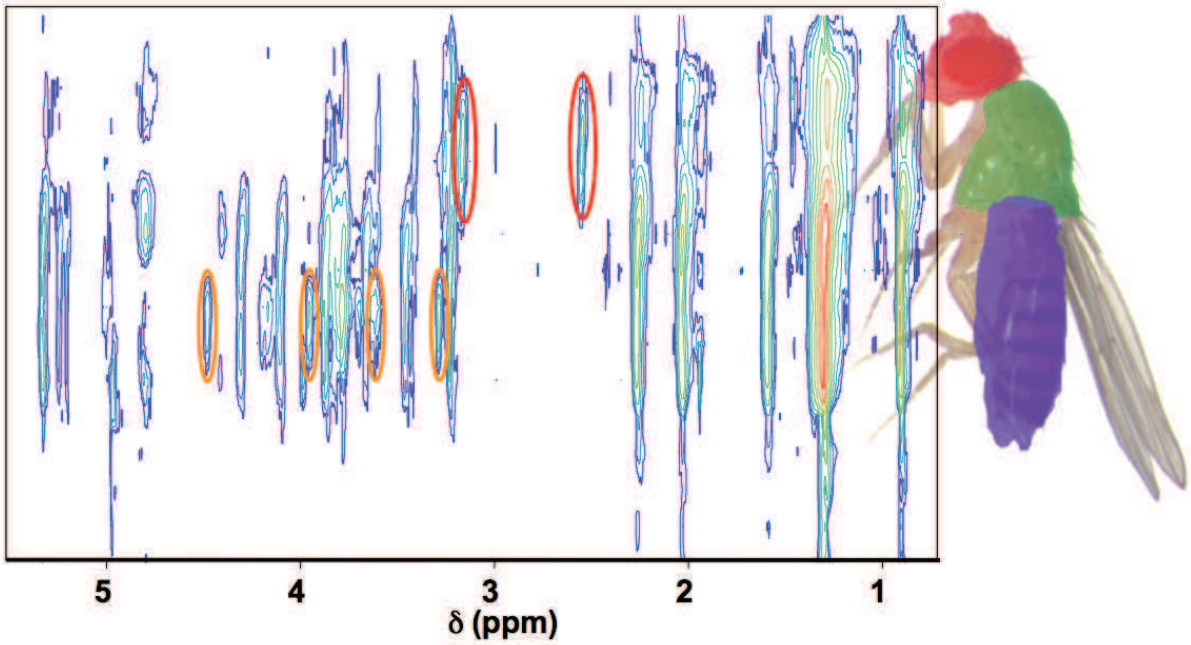


FIGURE 4.19 – Spectre de drosophile obtenu avec une séquence CSI sur un mâle de la souche *Oregon R*. La résolution du spectre est de 1,25Hz dans la dimension spectroscopique, et de 156μm dans la dimension spatiale.

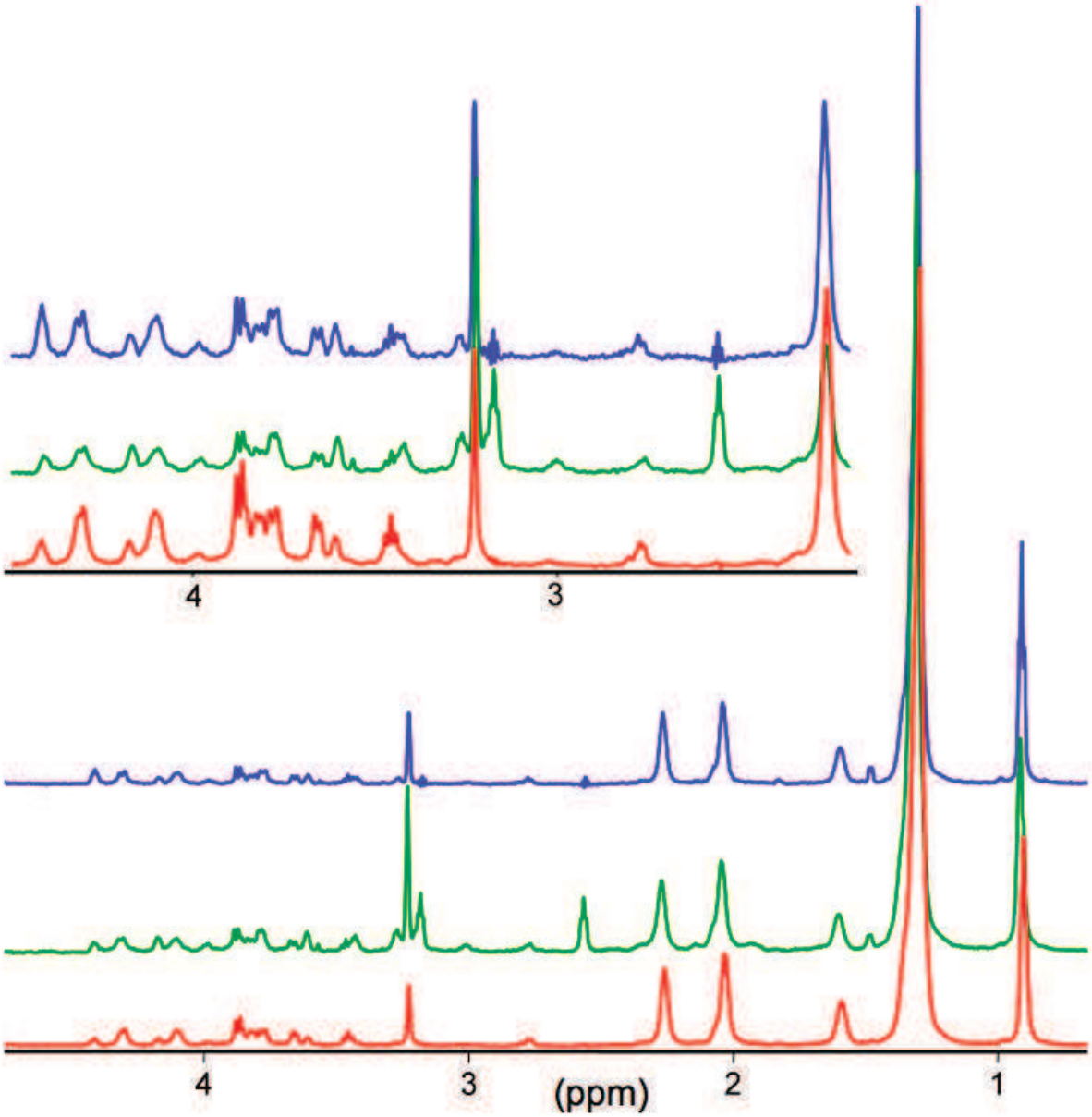


FIGURE 4.20 – Spectres 1D obtenus à partir de plusieurs spectres extraits de la cartographie CSI présentée sur la figure 4.19. Le spectre rouge correspond à l'abdomen, le vert aux thorax et le bleu à la tête. J'ai également intégré un zoom sur la zone de 2 à 4,5 *pm*. Les échelles ne sont pas les mêmes pour les spectres.

4.4 Discussion et conclusion

Le travail présenté dans cette partie doit être vu comme une procédure complète pour l'étude de la drosophile *in vivo* par SRM. Les différentes méthodes exposées permettent de réaliser plusieurs types d'acquisitions qui restent plus ou moins adaptées en fonction de l'étude. Avec les différentes méthodes proposées il est possible de travailler sur un modèle qui n'a pas encore été caractérisé (il est alors plus raisonnable de réaliser des acquisitions de types TOBSY, pour pouvoir identifier la présence d'éventuels nouveaux pics) aussi bien que sur un modèle déjà connu (il sera alors possible de réaliser directement des acquisitions $1D$, localisées ou non). De plus nous avons réussi à mettre en place une séquence $2D$ de type CSI (1 dimension spatiale et une dimension fréquentielle) qui permet de réaliser un profil de répartition spatiale des différents métabolites dans une drosophile. Cette information sur la corrélation spatiale des métabolites peut être vue comme une information complémentaire à celle obtenu à l'aide de la séquence TOBSY qui donne un renseignement sur les corrélations chimiques. Evidemment l'information de corrélation spatiale peut être obtenue en travaillant à l'aide de séquences de spectroscopie 1D spatialement sélectives mais le temps total pour l'obtention de la même quantité d'information avec la même qualité de signal serait bien plus longue. De plus la méthode CSI peut être vu comme une méthode qui permet d'obtenir une information globale (car le signal provient de toute la drosophile), mais avec la possibilité d'extraire des données localisées. De ce point de vue on peut considérer la méthode CSI mise en place comme un lien entre les deux parties initialement prévues dans notre étude, c'est à dire la mise en place de la spectroscopie globale et de la spectroscopie localisée. Cette idée est reprise sur la page 156 où est repris l'ensemble des séquences utilisées.

4.4.1 Validation de la localisation

Le travail présenté avait pour but de mettre en place une méthode de spectroscopie localisée. Le protocole de localisation comprend en particulier l'acquisition d'un profil de densité de proton selon l'axe de rotation et l'identification à partir de ce profil des différentes zones d'intérêts. Cette localisation est validée par plusieurs résultats présentés plus haut.

Au cours de l'étude du modèle Up^{101} présentant une dégénérescence musculaire nous avons observé une décroissance importante de la quantité de β-alanine dans la zone identifiée comme étant le thorax. La littérature confirme la présence abondante de β-alanine dans les muscles de la drosophile [15], ainsi cette observation va dans le sens d'une bonne localisation des acquisitions à l'aide du protocole mis en place. Plus haut il a été question d'un signal de β-alanine détecté dans la tête. Ce signal pourrait être interprété comme une pollution provenant du thorax mais la littérature confirme également la présence de la β-alanine dans la tête (dans les yeux plus précisément) [10].

Cette bonne localisation se retrouve également avec l'exemple des pics spécifiques aux mâles. En effet ces pics ont pu être identifiés comme étant le signal d'un galactoside présent dans les organes sexuels du mâle [11]. Ce métabolite est donc présent dans l'abdomen de la drosophile mâle, ce qui a été confirmé par les acquisitions en spectroscopie localisée sur les différents modèle.

4.4.2 Normalisation des données

J'ai parlé un peu plus haut de la normalisation des données en proposant diverses méthodes dont l'une a été utilisée pour une partie du travail réalisé, mais une fois la méthode de normalisation déterminée un problème subsiste toujours. En effet, dans bien des cas, lorsque l'on réalise des acquisitions de SRM *in vivo* ou *ex vivo*, les acquisitions sont réalisées dans un volume de taille déterminée par l'utilisateur (c'est le cas en spectroscopie localisée dans un voxel) ou sur un seul type de tissu de masse connue. Il est alors facile de comparer les données connaissant, ou la masse ou le volume, parfois même les deux.

Dans un premier temps le volume de la drosophile n'était pas connu. La masse, quand à elle, est mesurée à chaque expérience réalisée. Le fait d'utiliser la masse par contre ne paraît pas être la bonne solution car même si à chaque fois on s'intéresse à une drosophile entière la répartition de la masse sur les trois parties de l'animal n'est pas nécessairement la même. Afin de rendre les comparaison plus pertinente la solution qui est envisagée pour la suite est d'utiliser l'imagerie de la drosophile en rotation à l'angle magique afin de pouvoir déterminer le volume depuis lequel est acquis le signal. Ainsi il sera possible de normaliser les données par le volume. En associant l'information de volume avec la méthode PULCON, on peut espérer pouvoir réaliser une comparaison plus efficace des données.

Nous avons à ce jour déjà réalisé des images en rotation à l'angle magique. La séquence utilisée est une séquence de type écho de gradient (qui permet donc des acquisitions rapides), le fait d'utiliser la méthode MAS, tout comme dans le cas des acquisitions de spectroscopie, permet de s'affranchir des problèmes liés aux variations de susceptibilité magnétique aux interfaces air-tissus et d'obtenir une bonne définition du volume de la drosophile (cf. Fig.4.21). Il

est possible d'obtenir une qualité d'image suffisante pour l'estimation du volume en 15 min.

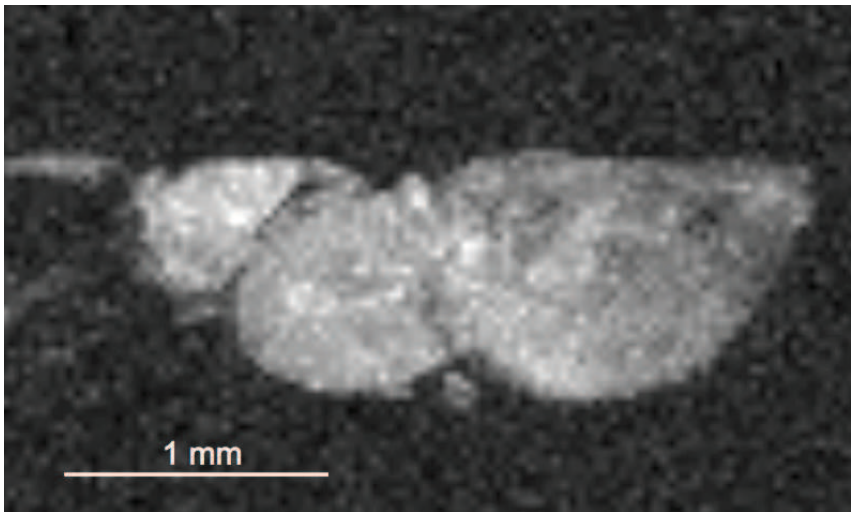


FIGURE 4.21 – Image d'une drosophile obtenu en réalisant une projection du maximum d'intensité sur des données obtenues, *in vivo*, en imagerie à l'angle magique à l'aide d'une séquence FLASH (écho de gradient) à 3 dimensions . $T_R = 100\ ms$, $T_E = 3{,}1\ ms$, angle de bascule de 30°, résolution de 31μ dans les 3 directions, FOV de $4 \times 3 \times 3\ mm^3$, $N_{acc} = 1$.

Spectroscopie globale

1D proton (ES)	2D homonucléaire (TOBSY)
Obtention du spectre à partir de l'ensemble de la drosophile. Va ensuite permettre la quantification des métabolites.	Permet de réaliser l'identification des métabolites grâce au spectre de corrélation

CSI

Imagerie de déplacement chimique selon l'axe de rotation

Permet d'obtenir des données spectroscopiques sur l'ensemble de la drosophile. Le signal se présente comme étant des spectres obtenus sur des tranches perpendiculaires à l'axe de rotation du rotor.

Spectroscopie localisée

Imagerie 1D selon l'axe de rotation de l'échantillon

Permet d'obtenir le profil de densité selon l'axe de rotation du rotor, cet axe correspond à l'axe antéro-postérieur de la drosophile. Le profil obtenu va nous permettre de placer les coupes pour les acquisitions en spectroscopie localisée.

Imagerie 1D selon l'axe de rotation pour les coupes sélectionnées

Permet d'obtenir le profil de densité selon l'axe de rotation du rotor, sur les zones d'intérêt. Cela nous permet de nous assurer du bon positionnement des coupes et de la bonne sélectivité des impulsions.

Spectroscopie 1D proton localisée

Après voir vérifié la position des coupes pour la spectroscopie localisée on peut réaliser les acquisitions de spectroscopie localisée. On va pouvoir travailler sur ces spectres pour réaliser la quantification des métabolites.

Ce travail a permis d'offrir un outil innovant pour l'étude de la drosophile. Dans le cadre du travail présenté nous avons pu démontrer l'efficacité de la méthode de localisation en spectroscopie HRMAS aux travers de 2 exemples, le cas d'une dégénérescence musculaire ainsi que la mise en évidence de marqueurs spécifique du mâle.

Le travail présenté ici va plus loin que ce qui a déjà été fait auparavant. Nous avons tout d'abord réussi à reproduire le travail réalisé par Righi *et al.* et nous avons réussi à mettre en place la spectroscopie localisée et la méthode CSI, qui sont à notre connaissance « des premières ». De plus la perspective d'associer la micro-imagerie par résonance magnétique en rotation à l'angle magique au travail déjà réalisé ouvre des perspectives sur la possibilité de réaliser une meilleure quantification des métabolites détectés. Tous ces travaux ouvrent un accès à un ouveau modèle : la drosophile, qui ne remplacera pas la souris, mais qui donnera un plus large spectre d'expérimentations génétiques.

Annexe A

Calcul du champ magnétique le long de l'axe de la bobine de Helmholtz

On considère que chaque élément de la bobine, (c'est à dire les deux éléments circulaires) sont parcourus par un courant de valeur I. Les deux boucles étant fermées et parcourues par un courant elles créent un champ magnétique (principe d'induction). Nous n'allons pas calculer le champ magnétique en tout point mais expliquer le calcul pour la valeur du champ magnétique créé le long de l'axe. Pour cela nous devons utiliser la loi de Biot et Savart qui permet de calculer le champ magnétique crée en tout point (M) (cf. Fig.A.1) par un déplacement de charge en un point de l'espace (P). Cette loi peut s'énoncer de façon infinitésimale ou intégrale.

$$d\vec{B}_P(M) = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{I\vec{dl} \wedge u_{\vec{PM}}}{\overline{PM}^2}$$

avec $d\vec{B}_P(M)$ le champ magnétique créé au point M par le courant qui parcours le point P de l'élément conducteur, μ_0 la permitivité électrique du vide, $\vec{dl}$ l'élément du fil au point P, $u_{\vec{PM}}$ le vecteur unitaire définie par la droite PM et $\overline{PM}$ la distance entre les points P et M.

L'expression intégrale de cette loi est :

$$\vec{B}(M) = \frac{\mu_0}{4\pi} \oint \frac{I\vec{dl} \wedge u_{\vec{PM}}}{\overline{PM}^2}$$

On considère maintenant une des deux spires, et l'on applique la loi infinitésimale pour le calcul du champ créé selon l'axe de la spire (axe $\vec{z}$) lorsque celle-ci est parcourue par un courant I. On considère que la spire possède un rayon a et que son centre O est situé à $-\frac{a}{2}$ sur l'axe $\vec{z}$.

Le résultat graphique pour le calcul du petit élément de champ magnétique $dB(\vec{M})$ crée en un point M est donné sur la figure A.2. Cet élément peut se

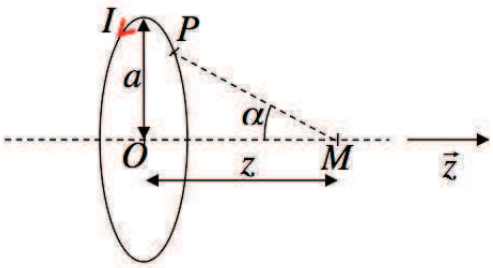


FIGURE A.1 – Représentation d'une des spires constituant la bobine de Helmholtz

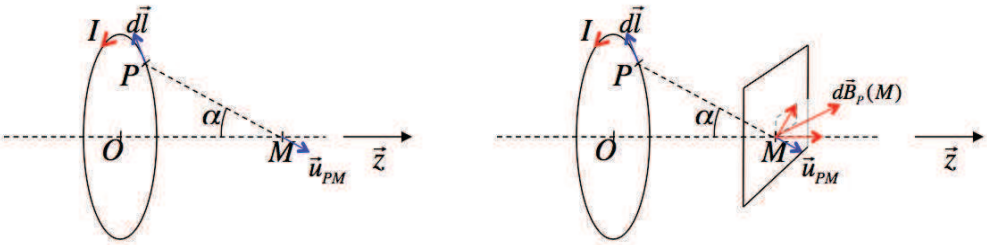


FIGURE A.2 – Représentation graphique pour le calcul du champ magnétique créé par une spire parcourue par un courant d'intensité I. Le champ $d\vec{B}_P(M)$ est le champ infinitésimal créé en M par le courant parcourant la spire en P

décomposer en deux parties. La première qui est dirigé selon l'axe $\vec{z}$ et la deuxième qui est dans le plan parallèle au plan de la spire et passant par le point M. Il est évident avec cette figure que, par effet de symétrie, en réalisant l'intégrale sur toute la spire les composantes dans le plan transverse vont se compenser et que seules les composantes selon l'axe $\vec{z}$ vont s'ajouter. Ainsi le champ magnétique en un point de l'axe d'une spire parcourue par un courant électrique est dirigé selon cet axe.

On peut déjà calculer la valeur de la projection de l'élément $d_P B(\vec{M})$ selon l'axe $\vec{z}$. On a :

$$d_P\vec{B}(M).\vec{z} = \frac{\mu_0}{4\pi}\frac{I\vec{dl} \wedge u_{\vec{PM}}}{\overline{PM}^2}.\vec{z} = \frac{\mu_0}{4\pi}\frac{I||\vec{dl}||}{a^2+z^2}sin(\alpha) = \frac{\mu_0}{4\pi}\frac{I||\vec{dl}||a}{\sqrt[3]{a^2+z^2}}$$

Le calcul complet du champ magnétique se fait maintenant avec la formule de Biot et Savart intégrale. Dans le cas où le point M se trouve sur l'axe de la spire la valeur de la projection est constante, il est donc possible de sortir la quasi totalité du terme $d_P\vec{B}(M)$ de l'intégrale hormis le terme en $\vec{dl}$ qui est le terme sur lequel est réalisé l'intégrale.

On a ainsi :

$$\vec{B}(M) = \oint d\vec{B_P}(M) = \frac{\mu_0}{4\pi}\frac{Ia}{\sqrt[3]{a^2+z^2}}\oint ||\vec{dl}|| = \frac{\mu_0}{2}\frac{Ia^2}{\sqrt[3]{a^2+z^2}} \tag{A.1}$$

On a ainsi pu calculer la contribution d'une des spires qui constituent une bobine de Helmholtz. Si l'on souhaite calculer le champ total crée par la bobine complète en un point de l'axe on peut repartir du résultat de l'équation A.1 et tenir compte du fait que les deux bobines soient distantes de a.

On pourra trouver de façon évidente que les deux composantes du champ magnétique se somment (les courants parcourent les deux spires selon le même sens de parcours) et sont toujours dirigées selon l'axe des spires. Si l'on prend le centre du repère au point central entre les deux spires, alors chacune des spires est placée en $\pm\frac{a}{2}$, l'expression du champ magnétique pour un point situé en z est alors :

$$\vec{B}(z) = \frac{\mu_0 I}{2}\left[\frac{a^2}{\sqrt[\frac{3}{2}]{a^2 + (z - \frac{a}{2})^2}} + \frac{a^2}{\sqrt[\frac{3}{2}]{a^2 + (z + \frac{a}{2})^2}}\right]$$

Annexe B

Détails de la séquence POCE

Dans cette annexe je vais présenter le code utilisé par TOPSPIN pour générer la séquence POCE-PRESS. Ce code est une adaptation du code Brucker pour la séquence PRESS. Le code est donné ici tel qu'il est présent dans le fichier appelé par TOPSPIN. Afin que celui-ci soit compréhensible j'en donne ici une version très détaillée. Avant je vais tout de même définir quelques notations usuelles pour le code Bruker qui est en fait un code de type C avec certaines notations spécifiques. Le début du programme est très commenté, ensuite, les commandes qui se répètent ne sont pas nécessairement commentées.

- « subr » fait appel à des modules additionnels ;
- « grad { (..) | (..) | (..) } »permet de déclarer les valeurs des gradients selon les 3 axes codage de phase, codage en fréquence et gradient de lecture ;
- « groff » est la commande qui permet de mettre les gradients à 0 ;
- « *pi* » désigne la valeur de puissance pour l'impulsion i ;
- « *phi* » désigne la valeur de phase i ;
- « *spi* » désigne la forme d'impulsion i ;
- *di* désigne un délai i ;
- « if » indique un test sur une condition, si le test indiqué après le « if » est vérifié alors le programme va rentrer dans l'accolade et exécuter les ordres ;
- « else » est associé avec le « if » , lorsque la condition sur le « if » n'est pas remplie alors, à la place, est éxécuté ce qui se trouve dans l'accolade suivant le « else » ;
- les « ; » indiquent des commentaires ;
- des durées sont souvent indiquées en début de ligne de commande, une durée notée $1u$ correspond à 1 μs, une durée notée $3m$ correspond à 3 ms

Séquence POCE-PRESS

```
#include <MRI.include>

#include <PrepModulesHead.mod>

define delay de4
"de4=0.00002s-de"

define delay d7m1
"d7m1=d7-1u"
define delay decodur ;définition d'un délai decodur
"decodur=0.00002s-de" ;calcul de la valeur de ce delai
#include <decoacq.mod> ;inclusion de la bibliothèque decoacq
define loopcounter lds={$NDummyScans}
    ; definition d'un compteur pour le nombre de scan de préparation
    ; la valeur est appelé à partir des données indiqué par l'utilisateur
    ;au niveau de l'interface (d'où la notation {$Nom_de_valeur}
define loopcounter lnav

"l5=1" ; initialisation de la valeur l5 à 1

preset off

INIT_DEVICES ;initialisation du système

;-------D/P-----GRAD----------------------------RF/ACQ------------

        1u      rpp1 ; remise à zéro de l'incrément de phase 1
        1u      rpp2 ; remise à zéro de l'incrément de phase 2
        1u      rpp3 ; remise à zéro de l'incrément de phase 3
        1u      rpp31 ; remise à zéro de l'incrément de phase 31

start,4u        ; start sert de repère pour les boucles
"l5=1"           ; initialisation de la valeur l5 à 1
test, 10u       ; test sert de repère pour les boucles
av,d1 fq8b:f1     ; av sert de repère pour les boucles

;---------Triggered data ------------------------------------------
#include <TriggerPerSlice.mod>

;---------noe  module-----------------------------------------
subr Noe()     ;permet l'appel à la routine Noe
         ;n'est pas utilisé ici
;---------ws & ovs module-------------------------------------------
```

```
subr WsOvs(ph0,ph0)     ;permet l'appel à la routine de
         ;suppression de l'eau qui est la méthode VAPOR

;---------localisation  module-----------------------------------
; toute cette partie correspond à la localisation de type PRESS
; on y retrouve les 3 impulsions dans les 3 directions
; également les gradients crushers

1u
d4 grad{  (t1) | (0.0) | (0.0) }  fq1:f1
         ;  mise en route des gradient selon la direction de codage
            ;en phase et definition de la fréquence de travail
d6 gatepulse 1
(p1:sp1 ph1):f1
         ; définition des paramètres pour l'impulsion avec la
            ;définition de la puissance, de la forme et de la phase
d6
d7m1 groff ; mise à 0 des gradients
0.5u
        0.5u

d8 grad{ (t4)  | (t6) | (t7) } ; activation des gradients
             ;selon les 3 directions
d4 grad{ (0.0) |  (t2) | (0.0) }   fq1:f1
             ; changements de valeur des gradients
d6 gatepulse 1
(p2:sp2 ph2):f1 ; définition des paramètres pour
              ; l'impulsion avec la définition de la puissance
              ; de la forme et de la phase
d6
d8 grad{  (t5) |  (t6) |  (t7) }
             ; changements de valeur des gradients
             ;selon les 3 directions
d9 groff ; mise à 0 des gradients

;pulse adjustments:
if ( PVM_ppgFlag3 == Yes ) {
    d12 grad{ (t11) | (t12) | (t13) }
    d4 groff
}

d10 grad{  (t8) |  (t9) | (t10) } fq1:f1
d4 grad{ (0.0) | (0.0) |  (t3) }
```

```
if "l5==1" {
    d6 gatepulse 1
    (p15:sp15 ph15):f2 (p3:sp3 ph3):f1
    d6
}

; c'est ici que ce trouve l'impulsion qui permet d'inverser le signal
;des protons liés au carbone 13
;elle est définie avec (p15:sp15 ph15) et est envoyée sur le canal f2.
; il y a un test sur la parité du paramètres l5 ce qui permet
;d'envoyer l'impulsion 1 fois sur 2
;on retrouve également la troisième impulsion de la PRESS
if "l5==2" {
    d6 gatepulse 1
    (p3:sp3 ph3):f1
    d6
}
;dans le cas où l5 est égal à 1 alors l'impulsion sur le canal f2
;n'est pas envoyée.

"l5 = l5 +1" ; on incrémente la valeur de l5
d10 grad{  (t8) |  (t9) | (t10) }
d11 groff

;---------data acquisition-----------------------------------------------
;pulse adjustments:

if ( PVM_ppgFlag3 == Yes ) {
    d4 grad{ (t14) | (t15) | (t16) }
    de4
    ADC_INIT_B(ph31, ph0)
    aqq ADC_START
}
;c'est ici qu'est déclaré l'acquisition du signal, il y a
; d'abord initialisation avant acquisition puis
;acquisition pendant la durée aqq
else {
    subr decoup(decodur,ph31,ph0)
        }

        3m groff
if(OPT_RFLOnOff == On) {
    1m reload B0
}
```

```
; fait un test sur l'activation du  retro frequency lock
; si il est activé alors il y a recalage de la fréquence
else {
    1m
}
;sinon il y a juste une attente de 1ms qui correspond
;à la même durée que pour le recalage en fréquence
1m ADC_END


;---------dummy scans ------------------------------------------------
"lds = lds - 1"
if "lds>=0" goto start
; Si le nombre de cycle de préparation 'est pas fini alors
; l'acquisition est relancé sans avoir incrémenté les
;valeurs. Les prochaines données acquises vont donc
; écraser les anciennes. Il va y avoir bouclage au repère
; "start"

;---------averaging & phase cycling-----------------------------------
if ( ACQ_scan_type == Scan_Experiment ) {
    1u ipp1
    1u ipp2
    1u  ipp3
    1u  ipp31
}
;Cette accolade permet d'incrémenter la valeur des phases
; à chaque pas.

lo to test times 2
lo to start times 512
1u rpp1
1u rpp2
1u rpp3
1u rpp31
;après avoir réalisé les 512 acquisitions avec l'impulsion
; d'inversion et 512 sans impulsion d'inversion il y a une remise
;à 0 des incréments de phase

lo to av times NR
SETUP_GOTO(av)
exit

ph0 = 0
```

```
ph1 = {0 0 0 0  0 0 0 0  0 0 0 0  0 0 0 0
            0 0 0 0  0 0 0 0  0 0 0 0  0 0 0 0 }^2^1^3
ph2 = {0 0 0 0  1 1 1 1  0 0 0 0  1 1 1 1
            2 2 2 2  3 3 3 3  2 2 2 2  3 3 3 3}^2^1^3
ph3 = {0 0 2 2  0 0 2 2  1 1 3 3  1 1 3 3
           0 0 2 2  0 0 2 2  1 1 3 3  1 1 3 3}^2^1^3
ph15 = 0
ph31= {0 2 0 2  2 0 2 0  2 0 2 0  0 2 0 2
            0 2 0 2  2 0 2 0  2 0 2 0  0 2 0 2}^2^1^3
```

Annexe C

Traitement des données à l'aide de JMRUI

Pour le traitement des données de spectroscopie j'ai utilisé le logiciel libre JMRUI 4.0. Ce logiciel a été développé par une équipe de recherche du laboratoire « CREATIS » à Lyon sous l'impulsion du Dr Graveron [64]. Je vais ici présenter brièvement la façon dont fonctionne le logiciel et les quelques possibilités que j'ai utilisées pour le traitement de mes données. Le logiciel travaille sur les données FID, il travaille donc dans le domaine temporel.

Il est important de noter qu'usuellement il y a deux logiciels qui permettent de traiter des données de spectroscopie *in vivo* qui sont JMRUI et LCModel [58]. Dans le cas de données HRMAS il existe certains logiciels plus spécifique tel que MestReNova.

C.1 Interface du logiciel JMRUI

L'interface de départ du logiciel est donnée sur la figure C.1. Ce menu offre les fonctionalités usuelles qui permet de charger, sauvergarder des fichiers (menu « File »). Les menus que j'ai principalement utilisé sont les menus « Preprocessing » et « Quantification ». Le premier des deux donne accès aux fonctionalités de préparation du signal avant la quantification. Il est ainsi possible de rajouter des points dans le spectre, filtrer le spectre par une lorentzienne... Le deuxième menu permet de choisir la méthode utilisée pour la quantification. La méthode que j'ai utilisé est la méthode « Amares », cette méthode travaille uniquement sur le spectre et ne nécessite pas d'élément supplémentaire.

Une fois un spectre chargé (on charge le fichier FID brut) on a l'affichage de la FID, ou de sa transformée de fourier, qui est réalisé dans une nouvelle fenêtre (cf. Fig.C.2. A l'aide des options disponibles il est possible de changer l'affichage de l'axe des abscisses (Hz, kHz ou ppm), de recaler le spectre en fréquence et de changer la phase (ordre 0 et 1) via le raccourci.

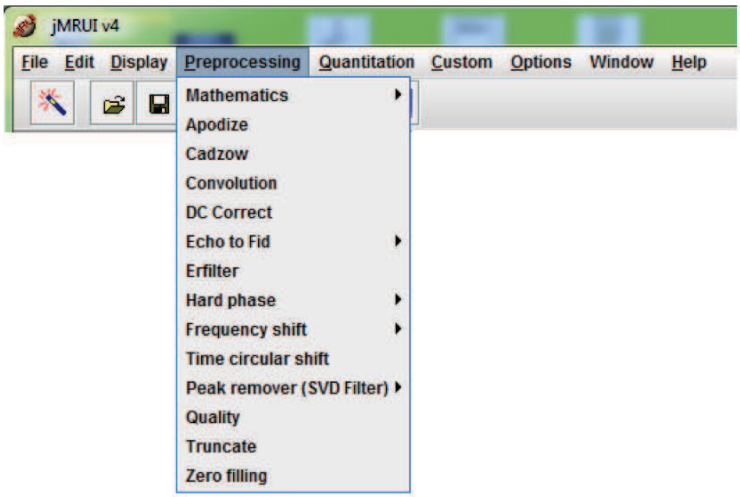


FIGURE C.1 – Aperçu de la fenêtre de JMRUI avec la liste des menus accessibles depuis la fenêtre principale. Sur la figure j'ai mis en évidence le contenu du menu « Preprocessing ».

C.2 Préparation des données avant approximation

Avant de réaliser le calcul de l'approximation il peut être utile d'améliorer les données en réalisant différentes étapes de traitement. Dans les données FID Bruker des points sont ajoutés au début de chaque FID. L'ajout de points au début de la FID induit un déphasage de l'ensemble du spectre. Il est nécessaire d'utiliser l'option « Time circular shift » qui permet de supprimer ces points. Généralement j'ai utilisé les options de « zero filling » pour améliorer la résolution du spectre, et un filtrage de type lorentzien qui permet de diminuer le bruit mais qui élargit également les pics.

C.3 Calcul de l'approximation d'un spectre à l'aide d'AMARES

Je vais ici présenter les étapes que j'ai utilisé pour réaliser les approximations de mes spectres à l'aide de la fonctionalité « AMARES » du logiciel. Le module AMARES se lance depuis le menu « Quantification » de la fenêtre de départ.

C.3.1 Définition de la liste des pics à simuler

En travaillant avec la méthode Amares il est nécessaire de définir un liste de pics à simuler. Comme il a été dit plus haut le logiciel utilisé travaille dans le domaine temporel mais, par soucis, pratique l'affichage est réalisé dans le

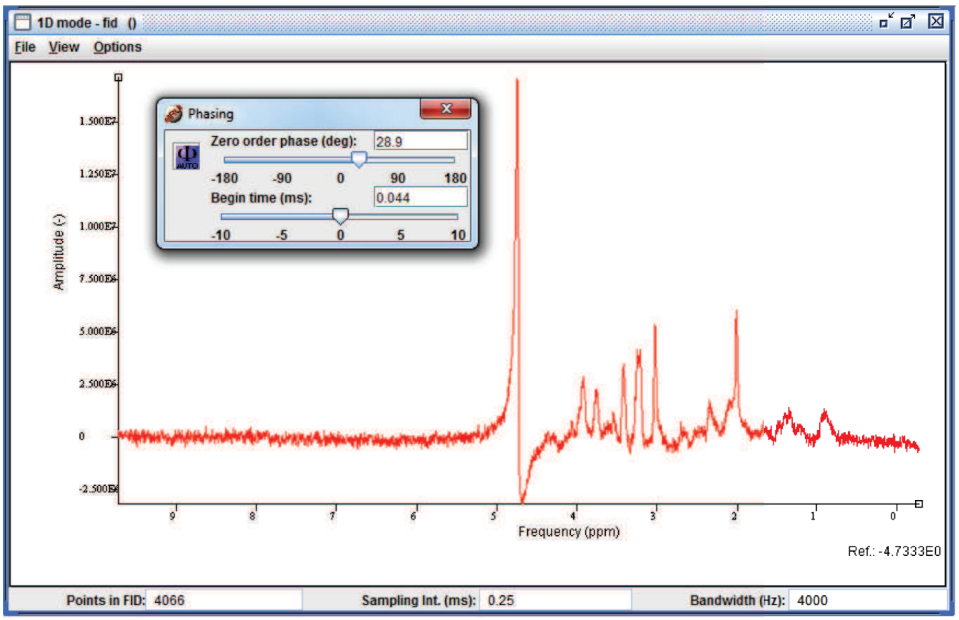


FIGURE C.2 – Aperçu de la fenêtre d'affichage des spectres une fois la FID chargée depuis la fenêtre principale. Depuis cette fenêtre il est possible de changer l'affichage de l'axe des abscisses, en particulier changer l'unité (depuis le menu « view »). Il est également possible de phaser le spectre (cf. la fenêtre Phazing accessible depuis la fenêtre principale). Le logiciel offre également la possibilité de recaler le spectre en fréquence en faisant un clic droit directement sur le spectre. Le spectre affiché a subitun recalage en fréquence et on a changé la valeur du « time circular shift »

domaine fréquentiel. Ainsi il est possible à l'utilisateur de définir les positions des pics présent dans le spectre. Il est proposé à l'utilisateur de pointer directement sur le spectres la position des pics ainsi que de renseigner la largeur à mi-hauteur des pics. Afin de faciliter l'analyse de spectres similaires il est possible de stocker dans un fichier des bases de données de pics. Une fois une liste de pics définie il est donc possible de sauvegarder cette liste pour la recharger pour une autre analyse (via le menu « Database ») (exemple de liste donnée sur la figure C.3).

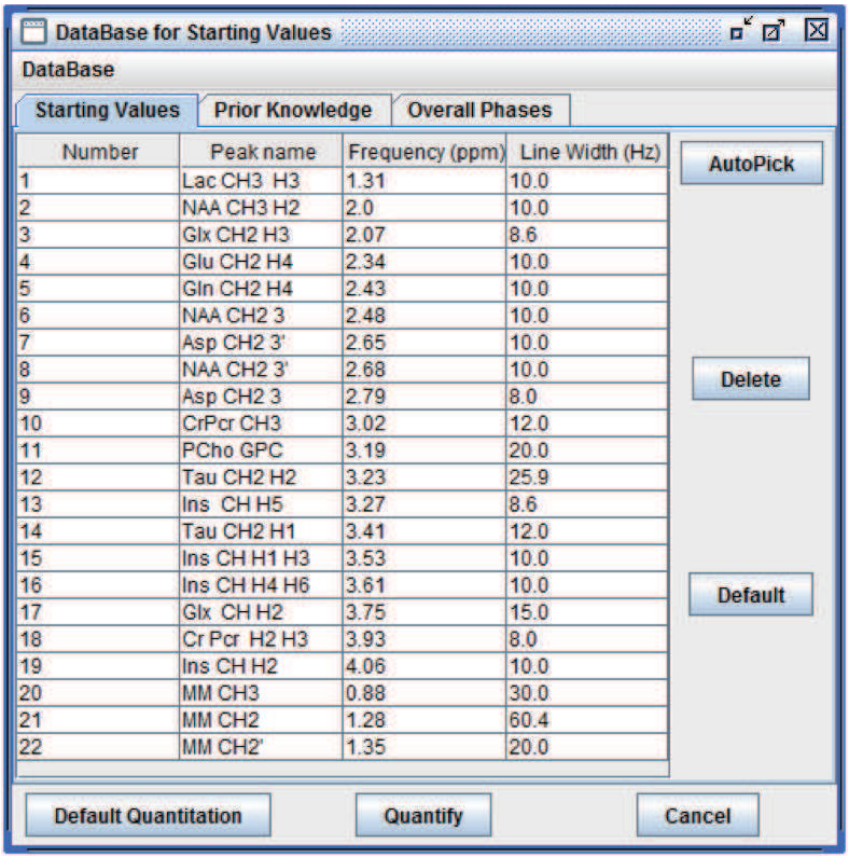
C.3.2 Paramètres ajustables pour le calcul de l'approximation (Fig.C.4)

La plupart des paramètres que le logiciel va utiliser pour réaliser l'approximation sont accessibles par l'utilisateur et différentes contraintes peuvent être imposées. Il est possible de définir la forme de la raie (gaussienne ou lorentzienne), la fréquence du pic, sa largeur à mi-hauteur, son amplitude et sa phase (ordre 0) par rapport à la phase de référence. Ces paramètres peuvent êtres

définis pic par pic avec différentes option possibles. Voici la liste des contraintes qu'il est possibles d'utiliser :

- fixer la valeur (fixed) ;
- imposer un écart fixe par rapport à une valeur (fixed shift) ;
- imposer un ratio fixe par rapport à un paramètre du même type mais lié à un autre pic (fixed ratio). Cela est très pratique dans le cas où l'on connaît des relations d'amplitudes entres deux pics qui sont issus du même métabolites ;
- donner une fenêtre pour un écart par rapport à un autre paramètre (variable shift) ;
- donner une fenêtre pour un ratio par rapport à un autre paramètre (variable ratio) ;
- encadrer une valeur entre un minimum et un maximum (soft constraints).

Il est évidement possible de ne pas imposer de contraintes sur les paramètres de pics. Tout comme la liste des pics qui peut être sauvegardée dans une base de données il est possible de sauvegarder la liste des contraintes.



Number	Peak name	Frequency (ppm)	Line Width (Hz)
1	Lac CH3 H3	1.31	10.0
2	NAA CH3 H2	2.0	10.0
3	Glx CH2 H3	2.07	8.6
4	Glu CH2 H4	2.34	10.0
5	Gln CH2 H4	2.43	10.0
6	NAA CH2 3	2.48	10.0
7	Asp CH2 3'	2.65	10.0
8	NAA CH2 3'	2.68	10.0
9	Asp CH2 3	2.79	8.0
10	CrPcr CH3	3.02	12.0
11	PCho GPC	3.19	20.0
12	Tau CH2 H2	3.23	25.9
13	Ins CH H5	3.27	8.6
14	Tau CH2 H1	3.41	12.0
15	Ins CH H1 H3	3.53	10.0
16	Ins CH H4 H6	3.61	10.0
17	Glx CH H2	3.75	15.0
18	Cr Pcr H2 H3	3.93	8.0
19	Ins CH H2	4.06	10.0
20	MM CH3	0.88	30.0
21	MM CH2	1.28	60.4
22	MM CH2'	1.35	20.0

FIGURE C.3 – Fenêtre accessible lors de l'utilisation du module AMARES de JMRUI. Cette fenêtre comprend principalement un menu « Database » et 3 onglets. Ces trois onglets correspondent à la liste des pics, les paramètres de ces pics (détaillé dans la figure C.4 ainsi que les renseignements sur la phase à utiliser pour le calcul de l'approximation (phase d'ordre 0 et 1 qui peuvent être estimées par le programme ou fixées par l'utilisateur.

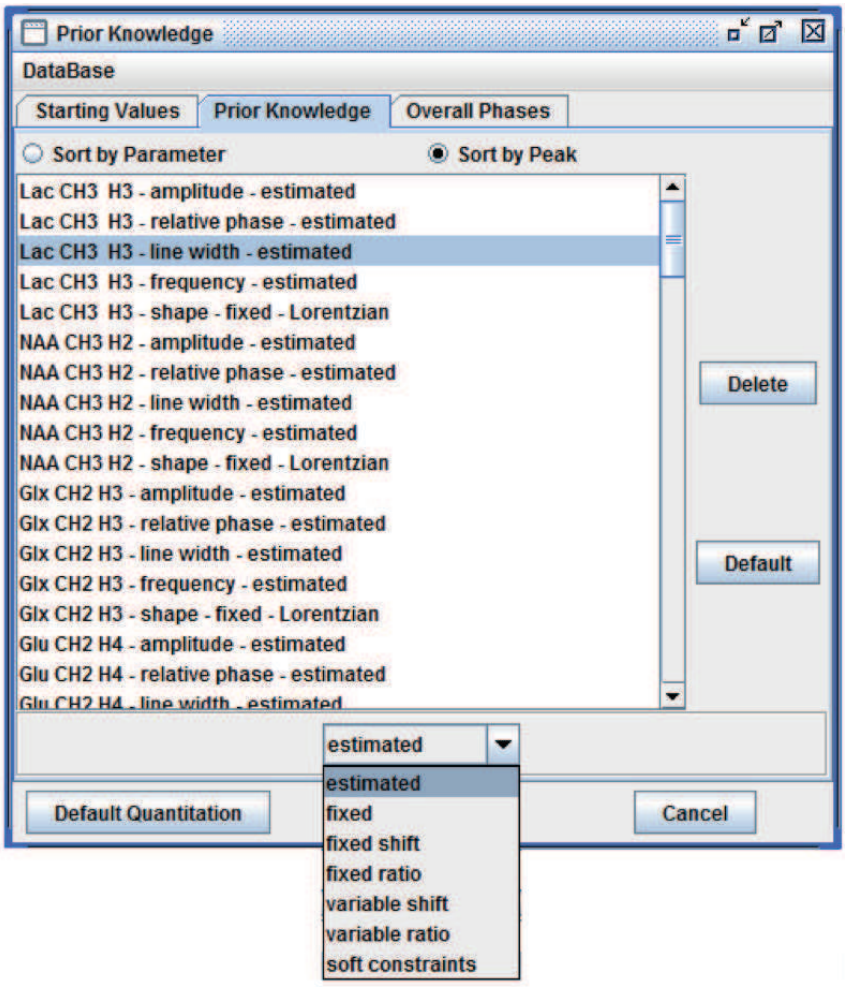


FIGURE C.4 – Volet concernant les paramètres des différents pics définis pour réaliser l'approximation du spectre à l'aide du module AMARES. Dans ce volet il est possible de définir des contraintes pour les différents paramètres qui définissent les pics. Ces paramètres et le type de contraintes qui peuvent êtres imposées sont détaillés un peu plus haut.

C.4 Résultats obtenus

A l'issu du calcul de l'approximation le résultat est donné dans le panneau de sortie représenté sur la figure C.5. Ce panneau comporte globalement 3 parties. La première donne des informations sur les valeurs finales trouvées pour plusieurs paramètres avec entre autres les phases d'ordres 0 et 1. La deuxième partie est un tableau qui donne la liste complète des pics trouvés avec les renseignements suivants :

- la forme utilisé pour le pic (lorentzienne ou gaussienne)
- la position du pic (donnée en Hz ou en ppm en fonction du choix de l'affichage)

– l'amplitude du pic
– la largeur à mi-hauteur du pic
– le pourcentage de signal porté par le pic

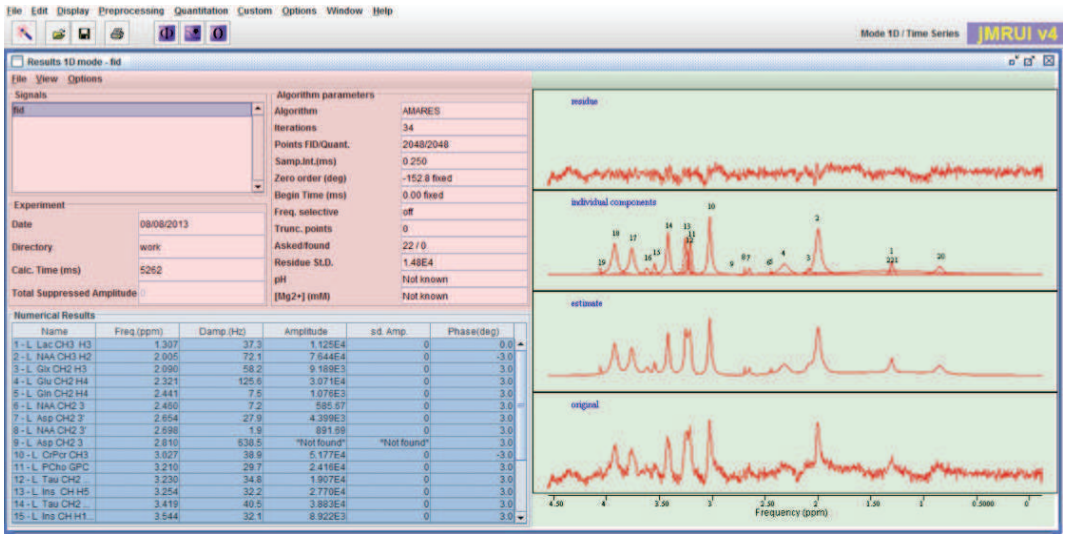


FIGURE C.5 – Panneau obtenu avec JMRUI sur lequel sont affichés les résultats. En rouge j'ai mi en évidence la zone sur laquelle sont affichées les informations numériques sur le signal et le calcul de l'approximation du spectre. En bleu en retrouve le tableau avec le valeurs de paramètres calculés pour chaque pics. En vert j'ai mis en évidence la zone sur laquelle est affiché à la fois le spectre d'origine et l'approximation qui en est faite. Sur la figure C.6 j'ai représenté un exemple de cette partie dans le cas d'un spectre ^{1}H filtré carbone ^{13}C.

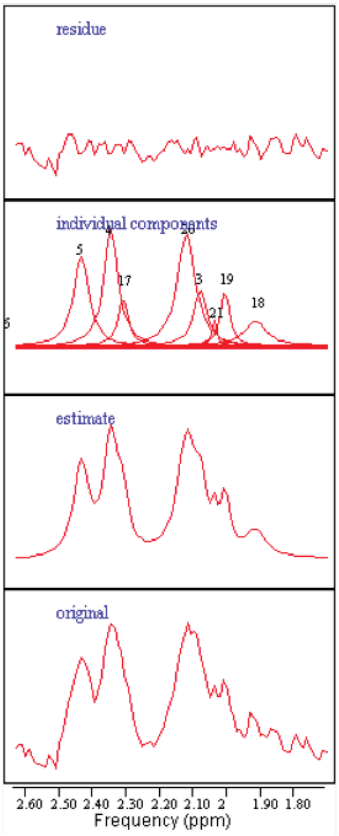


FIGURE C.6 – Exemple de cadre où est affiché le résultat graphique obtenu par JMRUI. On distingue les quatres zones, de bas en haut, spectre d'origine, approximation obtenue, composantes individuelles et résidu.

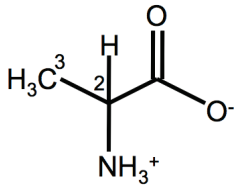
La troisième partie est composée de quatre cadres. De bas en haut les cadres montrent le spectre original, le spectre qui a été calculé, les composantes individuelles qui ont été calculées et enfin, la différence entre le spectre original et le spectre calculé. C'est souvent cette partie là qui va permettre de voir si l'approximation a bien aboutie. Il faut tout de même apporter de l'attention à la fois aux composantes individuelles de chaque pic ainsi qu'aux valeurs numériques, en particulier contrôler qu'il n'y a pas d'inversion de pics. Les résultats peuvent êtres sauvegardé dans un fichier en .results qui peut être ouvert par JMRUI.

Annexe D

Données de spectroscopie sur les différents métabolites

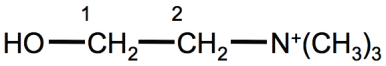
Les valeurs qui sont données dans cette annexe sont issues de [25]

Alanine



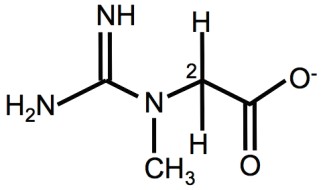
CH (2) 3,77 ppm
CH_3 (3) 1,47 ppm

Choline



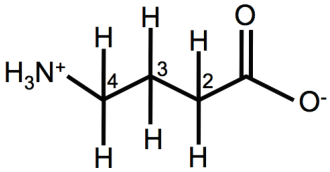
$N(CH_3)_3$ 3,19 ppm
CH_2 (1) 4,05 ppm
CH_2 (2) 3,50 ppm

Créatine



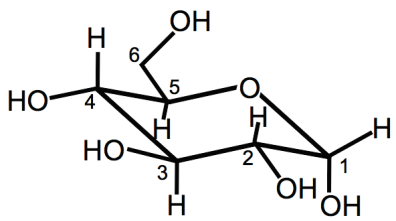
$N(CH_3)$ 3,03 ppm
CH_2 (2) 3,91 ppm

GABA



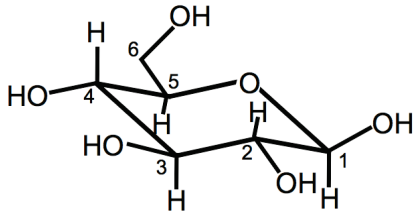
CH_2 (2) 2,28 ppm
CH_2 (3) 1,89 ppm
CH_2 (4) 3,01 ppm

Glucose α



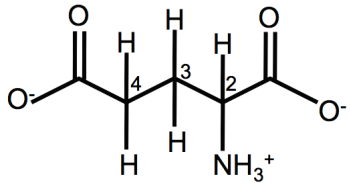
CH (1) 5,22 ppm
CH (2) 3,52 ppm
CH (3) 3,70 ppm
CH (4) 3,40 ppm
CH (5) 3,82 ppm
CH (6) 3,83 ppm
CH (6′) 3,75 ppm

Glucose β



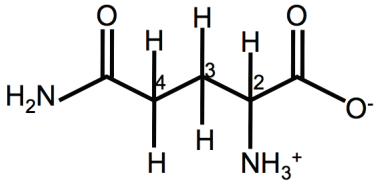
CH (1) 4,63 ppm
CH (2) 3,23 ppm
CH (3) 3,47 ppm
CH (4) 3,39 ppm
CH (5) 3,45 ppm
CH (6) 3,88 ppm
CH (6′) 3,71 ppm

Glutamate



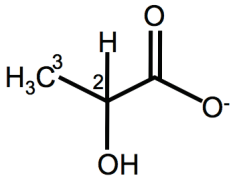
CH (2) 3,74 ppm
CH_2 (3) 2,04 ppm et 2,12 ppm
CH_2 (4) 2,35 ppm

Glutamine



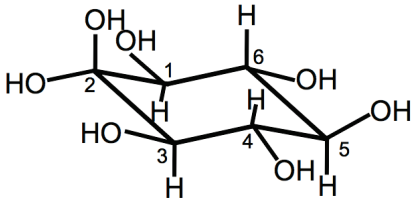
CH (2) 3,75 ppm
CH_2 (3) 2,13 ppm et 2,11 ppm
CH_2 (4) 2,44 ppm

Lactate



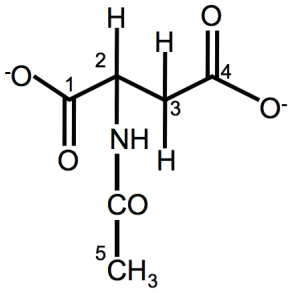
CH (2) 4,10 ppm
CH_3 (3) 1,31 ppm

Myo-Inositol



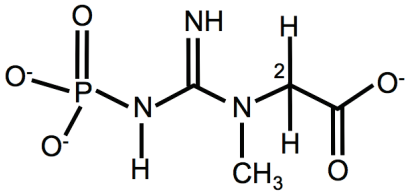
CH (1) et CH (3) 3,52 ppm
CH (2) 4,05 ppm
CH (4) et CH (6) 3,61 ppm
CH (5) 3,28 ppm

NAA



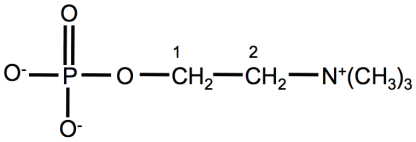
CH_3 (5) 2,01 ppm
CH (2) 4,38 ppm
CH (3) 2,67 ppm et 2,49 ppm

Phosphocréatine



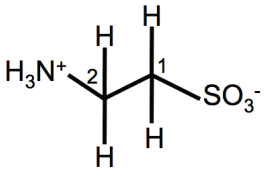
$N(CH_3)$ 3,03 ppm
CH_2 (2) 3,93 ppm

Phosphorylcholine



$N(CH_3)_3$ 3,21 ppm
CH_2 (1) 4,28 ppm
CH_2 (2) 3,64 ppm

Taurine



CH_2 (1) 3,42 ppm
CH_2 (2) 3,25 ppm

Bibliographie

[1] S. Akoka, L. Barantin, and M. Trierweiler. Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method. *Anal. Chem.*, 71(13) :2554–2557, July 1999.

[2] N. J. Allen and B. A. Barres. Neuroscience : Glia — more than just brain glue. *Nature*, 457(7230) :675–677, Feb. 2009.

[3] O. C. Andronesi, D. Mintzopoulos, J. Struppe, P. M. Black, and A. A. Tzika. Solid-state NMR adiabatic TOBSY sequences provide enhanced sensitivity for multidimensional high-resolution magic-angle-spinning 1H MR spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 193(2) :251–258, Aug. 2008.

[4] J. H. Ardenkjaer-Larsen, B. Fridlund, A. Gram, G. Hansson, L. Hansson, M. H. Lerche, R. Servin, M. Thaning, and K. Golman. Increase in signal-to-noise ratio of $>$ 10,000 times in liquid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(18) :10158–10163, Sept. 2003.

[5] B. C. Baguley. Antivascular therapy of cancer : DMXAA. *Lancet Oncol.*, 4(3) :141–148, Mar. 2003.

[6] A. Bax and D. Davis. MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. 65(2) :355–360, Nov. 1985.

[7] M. Benadiba, G. Luurtsema, L. Wichert-Ana, C. A. Buchpigel, and G. Busatto Filho. New molecular targets for PET and SPECT imaging in neurodegenerative diseases. *Rev Bras Psiquiatr*, 34 Suppl 2 :S125–136, Oct. 2012.

[8] S. Berger and S. Braun. *200 and more NMR experiments : a practical course*. Wiley-VCH, Aug. 2004.

[9] L. Bolinger and J. S. Leigh. Hadamard spectroscopic imaging (HSI) for multivolume localization. *J Magn Reson*, 80(1) :162–167, 1988.

[10] J. Borycz, J. A. Borycz, T. N. Edwards, G. L. Boulianne, and I. A. Meinertzhagen. The metabolism of histamine in the drosophila optic lobe involves an ommatidial pathway : β-alanine recycles through the retina. *J. Exp. Biol.*, 215(Pt 8) :1399–1411, Apr. 2012.

[11] P. S. Chen, H. M. Fales, L. Levenbook, E. A. Sokoloski, and H. J. Yeh. Isolation and characterization of a unique galactoside from male drosophila melanogaster. *Biochemistry*, 16(18) :4080–4085, Sept. 1977.

[12] W. Chen, H. Jin, M. Nguyen, J. Carr, Y. Lee, C. Hsu, M. Faiman, J. Schloss, and J. Wu. Role of taurine in regulation of intracellular calcium level and neuroprotective function in cultured neurons. *J. Neurosci. Res.*, 66(4) :612–619, 2001.

[13] L.-M. Ching, Z. Cao, C. Kieda, S. Zwain, M. B. Jameson, and B. C. Baguley. Induction of endothelial cell apoptosis by the antivascular agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid. *Br. J. Cancer*, 86(12) :1937–1942, June 2002.

[14] A. Chiribiri, R. M. Botnar, and E. Nagel. Magnetic resonance coronary angiography : where are we today ? *Curr Cardiol Rep*, 15(2) :328, Feb. 2013.

[15] L. Coquin, J. D. Feala, A. D. McCulloch, and G. Paternostro. Metabolomic and flux-balance analysis of age-related decline of hypoxia tolerance in drosophila muscle tissue. *Mol. Syst. Biol.*, 4 :233, 2008.

[16] A. De Silva, V. Salem, P. M. Matthews, and W. S. Dhillo. The use of functional MRI to study appetite control in the CNS. *Exp Diabetes Res*, 2012 :764017, 2012.

[17] B.-T. Doan, G. Autret, J. Mispelter, P. Méric, W. Même, C. Montécot-Dubourg, J.-L. Corrèze, F. Szeremeta, B. Gillet, and J.-C. Beloeil. Simultaneous two-voxel localized 1H-observed 13C-edited spectroscopy for in vivo MRS on rat brain at 9.4 t : Application to the investigation of excitotoxic lesions. *J Magn Reson*, 198(1) :94–104, May 2009.

[18] M. S. Dodd, V. Ball, R. Bray, H. Ashrafian, H. Watkins, K. Clarke, and D. J. Tyler. In vivo mouse cardiac hyperpolarized magnetic resonance spectroscopy. *J Cardiovasc Magn Reson*, 15 :19, 2013.

[19] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, and A. Wokaun. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*. Oxford University Press on Demand, 1990.

[20] T. Ernst and J. Hennig. Improved water suppression for localized in vivo 1H spectroscopy. *J Magn Reson B*, 106(2) :181–186, Feb. 1995.

[21] S. K. Fisher, J. E. Novak, and B. W. Agranoff. Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues : homeostasis, metabolism and functional significance. *J. Neurochem.*, 82(4) :736–754, Aug. 2002.

[22] M. E. Fortini, M. P. Skupski, M. S. Boguski, and I. K. Hariharan. A survey of human disease gene counterparts in the drosophila genome. *J. Cell Biol.*, 150(2) :F23–30, July 2000.

[23] I. Gaidarov, Q. Chen, J. R. Falck, K. K. Reddy, and J. H. Keen. A functional phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate/Phosphoinositide binding domain in the clathrin adaptor AP-2 alpha subunit. implicatins for the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.*, 271(34) :20922–20929, Aug. 1996.

[24] L. B. Gladden. Lactate metabolism : a new paradigm for the third millennium. *J Physiol*, 558(Pt 1) :5–30, July 2004.

[25] V. Govindaraju, K. Young, and A. A. Maudsley. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed*, 13(3) :129–153, May 2000.

[26] A. Haase, J. Frahm, W. Hänicke, and D. Matthaei. 1H NMR chemical shift selective (CHESS) imaging. *Phys Med Biol*, 30(4) :341–344, Apr. 1985.

[27] E. L. Hahn. Spin echoes. *Phys. Rev.*, 80(4) :580–594, Nov. 1950.

[28] J. W. Hand, J. J. Lagendijk, J. V. Hajnal, R. W. Lau, and I. R. Young. SAR and temperature changes in the leg due to an RF decoupling coil at frequencies between 64 and 213 MHz. *J Magn Reson Imaging*, 12(1) :68–74, July 2000.

[29] B. Hassel and A. Bråthe. Cerebral metabolism of lactate in vivo : evidence for neuronal pyruvate carboxylation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 20(2) :327–336, Feb. 2000.

[30] B. Hassel, U. Sonnewald, and F. Fonnum. Glial-neuronal interactions as studied by cerebral metabolism of [2-13C]acetate and [1-13C]glucose : an ex vivo 13C NMR spectroscopic study. *J. Neurochem.*, 64(6) :2773–2782, June 1995.

[31] P. G. Henry, R. Roussel, F. Vaufrey, C. Dautry, and G. Bloch. Semiselective POCE NMR spectroscopy. *Magn Reson Med*, 44(3) :395–400, Sept. 2000.

[32] M. Humbert, J. Gerry Coghlan, and D. Khanna. Early detection and management of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev*, 21(126) :306–312, Dec. 2012.

[33] R. E. Hurd, Y.-F. Yen, A. Chen, and J. H. Ardenkjaer-Larsen. Hyperpolarized 13C metabolic imaging using dissolution dynamic nuclear polarization. *J Magn Reson Imaging*, 36(6) :1314–1328, Dec. 2012.

[34] R. Jolivet, I. Allaman, L. Pellerin, P. J. Magistretti, and B. Weber. Comment on recent modeling studies of astrocyte-neuron metabolic interactions. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 30(12) :1982–1986, Dec. 2010.

[35] S. Kim, L. Peshkin, and T. J. Mitchison. Vascular disrupting agent drug classes differ in effects on the cytoskeleton. *PLoS ONE*, 7(7) :e40177, July 2012.

[36] K. Kuroda, Y. Suzuki, Y. Ishihara, K. Okamoto, and Y. Suzuki. Temperature mapping using water proton chemical shift obtained with 3D-MRSI : feasibility in vivo. *Magn Reson Med*, 35(1) :20–29, Jan. 1996.

[37] H. Lei, F. Morgenthaler, T. Yue, and R. Gruetter. Direct validation of in vivo localized 13C MRS measurements of brain glycogen. *Magn Reson Med*, 57(2) :243–248, Feb. 2007.

[38] Y. S. Levin, M. J. Albers, T. N. Butler, D. Spielman, D. M. Peehl, and J. Kurhanewicz. Methods for metabolic evaluation of prostate cancer cells

using proton and (13)C HR-MAS spectroscopy and [3-(13)C] pyruvate as a metabolic substrate. *Magn Reson Med*, 62(5) :1091–1098, Nov. 2009.

[39] D. L. Lindsley and G. G. Zimm. *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, Mar. 1992.

[40] Y. Liu, K. Ai, and L. Lu. Nanoparticulate x-ray computed tomography contrast agents : from design validation to in vivo applications. *Acc. Chem. Res.*, 45(10) :1817–1827, Oct. 2012.

[41] R. Llinás, M. Sugimori, E. J. Lang, M. Morita, M. Fukuda, M. Niinobe, and K. Mikoshiba. The inositol high-polyphosphate series blocks synaptic transmission by preventing vesicular fusion : a squid giant synapse study. *PNAS*, 91(26) :12990–12993, Dec. 1994.

[42] K. E. Luker and G. D. Luker. Bioluminescence imaging of reporter mice for studies of infection and inflammation. *Antiviral Res.*, 86(1) :93–100, Apr. 2010.

[43] S. Mangia, M. DiNuzzo, F. Giove, A. Carruthers, I. A. Simpson, and S. J. Vannucci. Response to 'comment on recent modeling studies of astrocyte-neuron metabolic interactions' : much ado about nothing. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 31(6) :1346–1353, June 2011.

[44] S. Mangia, I. A. Simpson, S. J. Vannucci, and A. Carruthers. The in vivo neuron-to-astrocyte lactate shuttle in human brain : evidence from modeling of measured lactate levels during visual stimulation. *J. Neurochem.*, 109 Suppl 1 :55–62, May 2009.

[45] J. Mispelter, M. Lupu, and A. Briguet. *NMR probeheads for biophysical and biomedical experiments*. Imperial College Press, 2006.

[46] J. R. Moffett, B. Ross, P. Arun, C. N. Madhavarao, and A. M. Namboodiri. N-acetylaspartate in the CNS : from neurodiagnostics to neurobiology. *Progress in Neurobiology*, 81(2) :89–131, Feb. 2007.

[47] C. I. H. C. Nabuurs, D. W. J. Klomp, A. Veltien, H. E. Kan, and A. Heerschap. Localized sensitivity enhanced in vivo 13C MRS to detect glucose metabolism in the mouse brain. *Magn Reson Med*, 59(3) :626–630, Mar. 2008.

[48] M. Ohara-Imaizumi, M. Fukuda, M. Niinobe, H. Misonou, K. Ikeda, T. Murakami, M. Kawasaki, K. Mikoshiba, and K. Kumakura. Distinct roles of C2A and C2B domains of synaptotagmin in the regulation of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *PNAS*, 94(1) :287–291, July 1997.

[49] R. Ordidge, A. Connelly, and J. Lohman. Image-selected in vivo spectroscopy (ISIS). a new technique for spatially selective nmr spectroscopy. *J Magn Reson*, 66(2) :283–294, Feb. 1986.

[50] A. B. Patel, R. A. de Graaf, G. F. Mason, T. Kanamatsu, D. L. Rothman, R. G. Shulman, and K. L. Behar. Glutamatergic neurotransmission and neuronal glucose oxidation are coupled during intense neuronal activation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 24(9) :972–985, Sept. 2004.

[51] L. Pellerin, A.-K. Bouzier-Sore, A. Aubert, S. Serres, M. Merle, R. Costalat, and P. J. Magistretti. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes : an update. *Glia*, 55(12) :1251–1262, Sept. 2007.

[52] L. Pellerin and P. J. Magistretti. Sweet sixteen for ANLS. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 32(7) :1152–1166, July 2012.

[53] L. A. Peng, A. Schousboe, and L. Hertz. Utilization of alpha-ketoglutarate as a precursor for transmitter glutamate in cultured cerebellar granule cells. *Neurochem. Res.*, 16(1) :29–34, Jan. 1991.

[54] A. C. Pereira, D. E. Saunders, V. L. Doyle, J. M. Bland, F. A. Howe, J. R. Griffiths, and M. M. Brown. Measurement of initial n-acetyl aspartate concentration by magnetic resonance spectroscopy and initial infarct volume by MRI predicts outcome in patients with middle cerebral artery territory infarction. *Stroke*, 30(8) :1577–1582, Jan. 1999.

[55] L. Persano, E. Rampazzo, G. Basso, and G. Viola. Glioblastoma cancer stem cells : role of the microenvironment and therapeutic targeting. *Biochem. Pharmacol.*, 85(5) :612–622, Mar. 2013.

[56] J. Pfeuffer, I. Tkác, I. Y. Choi, H. Merkle, K. Ugurbil, M. Garwood, and R. Gruetter. Localized in vivo 1H NMR detection of neurotransmitter labeling in rat brain during infusion of [1-13C] d-glucose. *Magn Reson Med*, 41(6) :1077–1083, June 1999.

[57] D. Prantner, D. J. Perkins, W. Lai, M. S. Williams, S. Sharma, K. A. Fitzgerald, and S. N. Vogel. 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) activates stimulator of interferon gene (STING)-dependent innate immune pathways and is regulated by mitochondrial membrane potential. *J. Biol. Chem.*, 287(47) :39776–39788, Nov. 2012.

[58] S. W. Provencher. Automatic quantitation of localized in vivo 1H spectra with LCModel. *NMR Biomed*, 14(4) :260–264, June 2001.

[59] V. Righi, Y. Apidianakis, L. G. Rahme, and A. A. Tzika. Magnetic resonance spectroscopy of live drosophila melanogaster using magic angle spinning. *J Vis Exp*, (38), Apr. 2010.

[60] P. Sarup, S. M. M. Pedersen, N. C. Nielsen, A. Malmendal, and V. Loeschcke. The metabolic profile of long-lived drosophila melanogaster. *PLoS ONE*, 7(10) :e47461, 2012.

[61] A. Schousboe, U. Sonnewald, and H. S. Waagepetersen. Differential roles of alanine in GABAergic and glutamatergic neurons. *Neurochem. Int.*, 43(4-5) :311–315, Oct. 2003.

[62] M. Seshadri and M. J. Ciesielski. MRI-based characterization of vascular disruption by 5,6-dimethylxanthenone-acetic acid in gliomas. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 29(8) :1373–1382, Aug. 2009.

[63] I. A. Simpson, A. Carruthers, and S. J. Vannucci. Supply and demand in cerebral energy metabolism : the role of nutrient transporters. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 27(11) :1766–1791, Nov. 2007.

[64] D. Stefan, F. D. Cesare, A. Andrasescu, E. Popa, A. Lazariev, E. Vescovo, O. Strbak, S. Williams, Z. Starcuk, M. Cabanas, D. van Ormondt, and D. Graveron-Demilly. Quantitation of magnetic resonance spectroscopy signals : the jMRUI software package. *Meas. Sci. Technol.*, 20(10) :104035, Oct. 2009.

[65] M. Tangney and K. P. Francis. In vivo optical imaging in gene & cell therapy. *Curr Gene Ther*, 12(1) :2–11, Feb. 2012.

[66] I. Tkác, Z. Starcuk, I. Y. Choi, and R. Gruetter. In vivo 1H NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. *Magn Reson Med*, 41(4) :649–656, Apr. 1999.

[67] G. M. Tozer. Measuring tumour vascular response to antivascular and antiangiogenic drugs. *Br J Radiol*, 76 Spec No 1 :S23–35, 2003.

[68] J. Urenjak, S. R. Williams, D. G. Gadian, and M. Noble. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy unambiguously identifies different neural cell types. *J. Neurosci.*, 13(3) :981–989, Mar. 1993.

[69] A. J. van den Bergh, H. J. van den Boogert, and A. Heerschap. Calibration of the 1H decoupling field strength and experimental evaluation of the specific RF absorption rate in 1H-decoupled human 13C-MRS. *Magn Reson Med*, 39(4) :642–646, Apr. 1998.

[70] P. van Eijsden, K. L. Behar, G. F. Mason, K. P. J. Braun, and R. A. de Graaf. In vivo neurochemical profiling of rat brain by 1H-[13C] NMR spectroscopy : cerebral energetics and glutamatergic/GABAergic neurotransmission. *J. Neurochem.*, 112(1) :24–33, Jan. 2010.

[71] J. Vappou. Magnetic resonance- and ultrasound imaging-based elasticity imaging methods : a review. *Crit Rev Biomed Eng*, 40(2) :121–134, 2012.

[72] H. S. Waagepetersen, U. Sonnewald, O. M. Larsson, and A. Schousboe. A possible role of alanine for ammonia transfer between astrocytes and glutamatergic neurons. *J. Neurochem.*, 75(2) :471–479, Aug. 2000.

[73] P. G. Webb, N. Sailasuta, S. J. Kohler, T. Raidy, R. A. Moats, and R. E. Hurd. Automated single-voxel proton MRS : technical development and multisite verification. *Magn Reson Med*, 31(4) :365–373, Apr. 1994.

[74] P. Wesseling, D. J. Ruiter, and P. C. Burger. Angiogenesis in brain tumors ; pathobiological and clinical aspects. *J. Neurooncol.*, 32(3) :253–265, May 1997. PMID : 9049887.

[75] G. Wider and L. Dreier. Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(8) :2571–2576, Mar. 2006.

[76] J.-Y. Wu and H. Prentice. Role of taurine in the central nervous system. *J. Biomed. Sci.*, 17 Suppl 1 :S1, 2010.

[77] L. Xin, H. Frenkel, V. Mlynárik, F. D. Morgenthaler, and R. Gruetter. Selective resonance suppression 1H-[13C] NMR spectroscopy with asymmetric adiabatic RF pulses. *Magn Reson Med*, 61(2) :260–266, Feb. 2009.

[78] L. Xin, V. Mlynárik, B. Lanz, H. Frenkel, and R. Gruetter. 1H-[13C] NMR spectroscopy of the rat brain during infusion of [2-13C] acetate at 14.1 t. *Magn Reson Med*, 64(2) :334–340, Aug. 2010.

[79] S. Yoshida, K. Oishi, A. V. Faria, and S. Mori. Diffusion tensor imaging of normal brain development. *Pediatr Radiol*, 43(1) :15–27, Jan. 2013.

[80] C. S. Zuo, J. L. Bowers, K. R. Metz, T. Nosaka, A. D. Sherry, and M. E. Clouse. TmDOTP5- : a substance for NMR temperature measurements in vivo. *Magn Reson Med*, 36(6) :955–959, Dec. 1996.

[81] C. Zwingmann and D. Leibfritz. Regulation of glial metabolism studied by 13C-NMR. *NMR Biomed*, 16(6-7) :370–399, 2003.

Nicolas JOUDIOU

Développement de méthodes de Spectroscopie par Résonance Magnétique localisée pour l'étude du métabolisme chez le petit animal.

Le travail présenté ici a consisté en la mise au point d'une méthode de spectroscopie localisée proton filtrée carbone ^{13}C chez la souris ainsi que de la mise en place d'un protocole pour des acquisitions, *in vivo*, de spectroscopie localisée en rotation à l'angle magique sur la drosophile. Le travail sur la souris a en particulier porté sur l'effet d'un traitement antivasculaire sur des tumeurs cérébrales. Pour réaliser cette étude il a également fallu concevoir une sonde de mesure (support + détecteur) spécialement dédiée à ce type d'étude. Le travail a permis de mettre en évidence l'apport de cette nouvelle méthode par rapport à la méthode classique de spectroscopie proton.
Le travail sur la drosophile a permis la mise en place de la spectroscopie localisée par tranche, ce qui était l'objectif de départ, mais également la mise en place d'imagerie de déplacement chimique à 1 dimension spatiale, qui permet de réaliser une cartographie de la répartition spatiale des métabolites. Ces deux méthodes de spectroscopie sur la drosophile représentent à notre connaissance, deux premières, et ouvrent des perspectives importantes de recherche sur cet insecte qui est le plus utilisé dans le domaine, en particulier car il représente un très bon modèle génétique.

Mots clés : SRM, IRM, HRMAS, souris, drosophile

Development of localized Magnetic Resonance Spectroscopy methods for the study of small animal metabolism.

Here we present a $^{1}H-^{13}C$ filtered method for localized spectroscopy for the study of mice brain metabolism and, also for the development of localized HRMAS spectroscopy methods for the *in vivo* study of drosophila. The aim of the work on mice was to study the effect of a vascular disrupting agent on glioma. We had to build a probe (cradle + detector) dedicated to this work. With this work we succeed to show the contribution of the $^{1}H-^{13}C$ spectrocopic method, compared to the classical one, ^{1}H spectroscopy.
For the drosophila part of my work we succeed to perform slice selective spectroscopy on living drosophila using high Resolution Magic Angle Spinning, we even perform chemical shift imaging (1 spatial dimension) which give us a mapping of the metabolites distribution. As far we known, those methods represent two « premieres », and offer new perspectives of research on this insect, which is the most used in this field, particularly because of the numerous genetic studies on this animal.

Keywords : MRS, MRI, HRMAS, mice, drosophila

UPR 4301, Centre de Biophysique Moléculaire
Rue Charles Sadron, 45000 Orléans La source