

Nouveaux outils de RMN pondérée en diffusion pour la  
caractérisation des différents compartiments tissulaires dans  
le cerveau de rongeur *in vivo*

*Novel diffusion-weighted NMR tools for the characterization of tissue  
compartments in the rodent brain in vivo*

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 575

Electrical, optical, bio : physics and engineering (EOBE)

Spécialité de doctorat : Imagerie et Physique Médicale

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Laboratoire des

Maladies Neurodégénératives : mécanismes, thérapies, imagerie, 92265,

Fontenay-aux-Roses, France

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue à Paris Saclay,  
le 07/06/2021, par

**Mélissa VINCENT**

### Composition du Jury

**Luisa CIOBANU**

Chercheure, Neurospin, CEA, Université Paris-Saclay

Présidente

**Emmanuel BARBIER**

Directeur de Recherche INSERM, GIN, Université Grenoble Alpes

Rapporteur &  
examinateur

**Sylvain MIRAUX**

Directeur de Recherche CNRS, CRMSB, Université de Bordeaux

Rapporteur &  
examinateur

**Nadya PYATIGORSKAYA**

MD PhD, ICM, Sorbonne Universités, Université Paris 6

Examinatrice

**Angèle VIOLA**

Directrice de Recherche CNRS, CRMBM, Université Aix-Marseille

Examinatrice

### Direction de la thèse

**Julien VALETTE**

Chercheur, MIRGen, CEA

Directeur de thèse

**Titre : Nouveaux outils de RMN pondérée en diffusion pour la caractérisation des différents compartiments tissulaires dans le cerveau de rongeur *in vivo***

**Mots clés :** Spectroscopie RMN *in vivo*, Diffusion, Microstructure, Espace Extracellulaire, Lactate

**Résumé :** Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par des altérations de la microstructure cellulaire (hypertrophie astrocytaire, atrophie neuronale) ainsi que du métabolisme cérébral. Le signal RMN pondéré en diffusion reflète l'environnement exploré localement à l'échelle microscopique par un ensemble de molécules, constituant ainsi un outil de mesure non-invasif de la microstructure cérébrale. L'imagerie de diffusion de l'eau s'est donc imposée comme une approche prometteuse pour mieux comprendre et diagnostiquer les pathologies neurodégénératives. En outre, des mesures de spectroscopie pondérée en diffusion pourraient aider à clarifier la distribution au sein des différents types cellulaires de métabolites impliqués dans le métabolisme cérébral, tels que le lactate. Dans le contexte de l'hypothèse de la navette astrocyte-neurone, cette information est en effet cruciale afin d'éclaircir le rôle métabolique de ces molécules en conditions saine et pathologique. Cependant, l'analyse des données de diffusion de l'eau en terme de microstructure, ou bien des données de diffusion du lactate en termes de distribution cellulaire, suppose d'une part la connaissance précise des propriétés de diffusion au sein des différents compartiments tissulaires, en particulier les compartiments intracellulaires (ICS) et extracellulaire (ECS), et d'autre part que ces propriétés soient suffisamment différentes entre ces compartiments, afin de les discriminer. Par exemple, la diffusion est-elle plus rapide dans l'ECS ou l'ICS ? La diffusion dans l'ECS est-elle libre ou bien est-on au contraire sensible à des phénomènes de restriction et de tortuosité ?

Le but de ce travail de thèse est de répondre en partie à ces questions. Dans un premier temps, nous étudions la sensibilité de la spectroscopie RMN à double encodage en diffusion (DDE) aux différents aspects de la microstructure cellulaire, montrant ainsi que le « signal » DDE des métabolites endogènes purement intracellulaire reflète non seulement la diffusion dans des prolongements cellulaires fibreux, mais aussi vraisemblablement la présence d'embranchements de ces prolongements cellulaires. Dans un second temps, nous caractérisons les propriétés de diffusion du sucrose, un marqueur exogène injecté dans l'ECS, grâce à des outils de spectroscopie RMN pondérée en diffusion permettant de collecter des informations complémentaires telles que le coefficient de diffusion apparent, la tortuosité, la restriction et l'anisotropie microscopique. Les mesures DDE se révèlent particulièrement à même de discriminer l'ECS et l'ICS. Enfin, nous explorons le potentiel d'une approche originale utilisant le transfert de saturation par échange chimique (CEST) afin de filtrer la contribution de l'ICS lors des mesures de diffusion. Pour conclure, nous évoquons comment des expériences de  $^{13}\text{C}$  hyperpolarisé pourraient permettre d'affiner la connaissance des propriétés de diffusion du lactate dans les différents compartiments.

**Title : Novel diffusion-weighted NMR tools for the characterization of tissue compartments in the rodent brain *in vivo***

**Keywords :** In vivo NMR spectroscopy, Diffusion, Microstructure, Extracellular Space, Lactate

**Abstract :** Neurodegenerative diseases lead to alterations in both cell microstructure (astrocytic hypertrophy, neuronal atrophy) and brain metabolism. The diffusion-weighted NMR signal reflects the environment locally explored by an ensemble of molecules at a microscopic scale, thus allowing to non-invasively probe brain microstructure. Diffusion imaging of water is therefore a promising method to better understand and diagnose neurodegenerative diseases. Besides, diffusion-weighted NMR spectroscopy could help clarifying the biodistribution within cell types of key molecules involved in brain metabolism, such as lactate. In the framework of the astrocyte-to-neuron lactate shuttle hypothesis, this information could indeed be crucial to elucidate the metabolic role of these molecules in both healthy and pathological conditions. The analysis of water diffusion data in terms of microstructure, or lactate diffusion data in terms of cell type distribution, however requires a precise knowledge of the diffusion properties within the different tissue compartments, in particular within the intracellular space (ICS) and the extracellular space (ECS). For example, is diffusion faster in ECS or ICS? Can diffusion in ECS be considered as free or is it sensitive to restriction and/or tortuosity?

The goal of this work is to partly answer those questions. First, we study the sensitivity of double diffusion encoding (DDE) experiments to several features of cell microstructure, showing that the DDE signal of intracellular metabolites not only reflect diffusion in cell fibers, but also the presence of branching along those fibers. We then characterize the diffusion properties of sucrose, an exogenous marker of the ECS, using complementary diffusion-weighted NMR tools. These measurements allow us to capture several aspects of the ECS microstructure such as the apparent diffusion coefficient, tortuosity, restriction and microscopic anisotropy. Lastly, we explore the potential of an original approach using chemical exchange saturation transfer (CEST) to filter out the ICS contribution during water diffusion measurements. We conclude by mentioning how hyperpolarized  $^{13}\text{C}$  experiments could allow us to better characterize lactate diffusion properties within the different compartments.

---

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord Philippe Hentraye de m'avoir accueillie au sein de MIRCen, ainsi qu'Emmanuel Brouillet et Gilles Bonvento de m'avoir ouvert les portes du LMN. Je remercie également mes rapporteurs Emmanuel Barbier et Sylvain Miraux, de même que mes examinatrices Luisa Ciobanu, Nadya Pyatigorskaya et Angèle Viola, d'avoir pris le temps de lire et évaluer mon travail de thèse ainsi que pour leurs retours constructifs lors de la soutenance.

La thèse étant avant tout une aventure scientifique collaborative, il va sans dire que la liste des remerciements s'en retrouve d'autant plus allongée. S'il ne fallait cependant retenir qu'un seul nom, il s'agirait bien évidemment de celui du légendaire Julien Valette, le chevalier de la spectro, l'homme aux deux ERC ! Julien, je m'estime particulièrement chanceuse de t'avoir eu pour directeur de thèse : tu as su me guider grâce à ton expertise, ta rigueur scientifique et tes idées de génie (toujours trois coups d'avance sur le signal, c'est tellement râlant !). Merci de m'avoir donnée ma deuxième chance après mes déconvenues britanniques et de m'avoir soutenue pour partir jusqu'au bout du monde à San Francisco en ces temps sombres de pandémie !

Vient ensuite le reste de l'équipe 4 : Céline, aka Grand Spin, tu auras été une mentor et amie hors du commun ! Merci pour tous tes enseignements, ton soutien et toutes tes observations cocasses et imagées sur le monde qui nous entoure. Merci Julien F. pour tes nombreux conseils sur les mystères de l'effet CEST. Merci également à notre efficace duo de post-doc ! Eloise, merci pour toutes nos discussions RMN et tous tes conseils durant ma fin de thèse. Rodrigo, thank you for your kindness and your relentless efforts for the lactate project ! Par ailleurs, je n'oublie évidemment pas l'équipe de choc des thésards. JB, El Presidente, mon cher binôme de mission conseil, merci pour tous nos débats enflammés, que ce soit à la cantine ou autour d'un café ! Yohann, merci pour ta bonne humeur toujours constante et pour tous les cannelés qu'on a pu manger grâce à toi aux repas de l'ACTIF ! Sophie, merci de m'avoir challengée avec toutes tes questions en tant qu'étudiante de master, je te souhaite bon courage pour la suite, le lactate compte sur toi ! Amélie, merci pour ta gentillesse et ta douceur, on en avait bien besoin au 110 en ces temps sombres ! Clémence, merci pour tes conseils avisés et bienveillants du début, ce fut un honneur pour moi de reprendre le flambeau de ta quête doctorale et de suivre tes pas. Tu avais placé la barre très haut ! Marco, thank you for your guidance and your incredible positivity ! Enfin, merci Brice pour nos virées impromptues à Montréal et à SF !

Je pense également aux membres passés du bureau 110 qui m'ont si bien accueillie à mes débuts et m'ont fait découvrir les joies de la cantine : Clémence D., Suzanne (aka Crêpe Suzette), Clément, Jérémy, Nad... Je n'oublie bien évidemment pas tous les autres thésards sans qui il n'aurait pas fait aussi bon vivre à MIRcen. Chacun d'entre vous m'aura à un moment donné apporté du soutien, de la joie et des sourires et j'espère rester en contact avec chacun d'autre vous pour de bien nombreuses années. La team course à pied : Camille, Laurène, Marianne, Anastasie (et Mylène, et Nadja, et Dimitri, et Fanny même s'ils ne sont pas thésards !). On les aura faits ces semis !!! La team ACTIF : Anastasie, Miriam, Pauline R (et JB et Yohann évidemment). On en aura mené des tables rondes et autres débats à destination des jeunes chercheurs ! Mes camarades de la promo de doctorants de 2017 : Océane, PA, Charlotte. On l'aura eue cette thèse ! Et enfin les stagiaires (même si maintenant vous ne l'êtes plus !) : Dame Lebourg, Mathilde, Pauline L. Emma, je ne t'oublie pas également ! Enfin, merci Lucile pour nos discussions scientifiques autour d'un bon verre de vin rouge et/ou de whisky !

J'adresse également mes remerciements infinis envers toutes les personnes qui m'ont grandement facilité la vie au cours de ma thèse (et sans qui je n'aurais rien pu faire !) en me formant avec patience et bienveillance et en partageant sans contrepartie avec moi leur précieuse expertise. Mylène et Martine pour l'expérimentation animale. Carole et Océane pour le tri cellulaire. Pauline, Fanny P. et Caroline pour l'histologie. Luc pour la préparation des homogénats de cerveau de rat. Didier et Nicolas pour l'informatique. Olivier pour les simulations sous Matlab. Laurent, Kristell et Chrisys pour le support logistique!

Last but not least, I would like to also thank Myriam Chaumeil and the rest of the team (Marina, Xiao, Kai, Caroline, Chaitali and Lydia) for welcoming me at UCSF. I had an incredible stay in San Francisco thanks to all of you and I will dearly cherish the memories of this extraordinary journey. You all taught me a lot, both through your knowledge and kindness, and I will truly miss working with you.

Pour finir, j'adresse mes pensées émues à mes parents, vous qui m'avez toujours soutenue dans mes projets fous sans jamais douter une seule seconde de mes capacités à parvenir à mes fins. A travers nos tribulations familiales, vous m'avez donné cet esprit aventurier et ce goût pour l'inconnu qui m'animent tant. Merci également à mon petit frère Noah, toi qui m'inspires tant par ton audace et ton esprit d'initiative du haut de tes 20 ans. Et enfin, merci à Cédric, pour ton écoute constante, ta patience infinie et tes mots toujours plein de sagesse. C'est une chance incroyable de t'avoir à mes côtés.

---

# TABLE DES MATIERES

<b>CHAPITRE I. DEVOILER LA MICROSTRUCTURE CEREBRALE PAR SPECTROSCOPIE RMN PONDEREE EN DIFFUSION: COMMENT ET DANS QUEL BUT ?</b>	<b>1</b>
<b>I.1. INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>	<b>1</b>
<b>I.2. DE LA MICROSTRUCTURE CEREBRALE AUX METABOLITES</b>	<b>5</b>
I.2.I. DIFFERENTS ASPECTS DE LA MICROSTRUCTURE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL	5
a. Microstructure des différents types cellulaires	5
Neurones	5
Cellules Gliales	7
b. Substance blanche et substance grise	8
I.2.II. LES METABOLITES CEREBRAUX : BIOMARQUEURS DES TYPES CELLULAIRES AU SEIN DU SNC	9
a. Marqueurs neuronaux	9
N-Acetylaspartate (NAA)	9
Glutamate (Glu)	9
b. Marqueurs gliaux	10
Myo-inositol (Ins)	10
Glutamine (Gln)	10
Composés à base de choline (tCho)	10
c. Métabolites non-spécifiques	11
Créatine et phosphocréatine (tCr)	11
Taurine	11
<b>I.3. LE PHENOMENE DE DIFFUSION</b>	<b>12</b>
I.3.I. DE LA DIFFUSION LIBRE...	12
I.3.II. ... A LA DIFFUSION EN CONDITIONS BIOLOGIQUES	13
a. Quelques définitions	13
b. Coefficient de diffusion apparent	14
<b>I.4. MESURER LA DIFFUSION PAR RMN</b>	<b>17</b>
I.4.I. BASES DE RMN	17
I.4.II. LE DEPLACEMENT CHIMIQUE OU COMMENT DISTINGUER LES MOLECULES EN RMN	21
I.4.III. PRINCIPE DE LA PONDERATION EN DIFFUSION	22
I.4.IV. APPROXIMATION DES GRADIENTS COURTS	23
I.4.V. PRISE EN COMPTE DE LA DIFFUSION DANS LES EQUATIONS DE BLOCH	24

<b>I.5. DEVOILER LA MICROSTRUCTURE CELLULAIRE GRACE A DES OUTILS DE RMN PONDERES EN DIFFUSION</b>	<b>26</b>
I.5.I. SENSIBILITE A LA RESTRICTION ET IMAGERIE Q-SPACE	26
I.5.II. MESURE EXPERIMENTALE DE L'ADC	27
I.5.III. IMAGERIE DU TENSEUR DE DIFFUSION	27
I.5.IV. MODELISATION DE LA MICROSTRUCTURE	29
a. Différents modèles	29
b. Limitations	30
c. Simulations numériques	30
I.5.V. DIFFUSION DES METABOLITES : QUELLE MESURE POUR QUEL PARAMETRE DE LA MICROSTRUCTURE ?	32
a. Spectroscopie RMN pondérée en diffusion	32
b. Mesure aux hautes valeurs de b	32
c. Mesures de l'ADC à $t_d$ ultracourt	35
d. Mesure de l'ADC aux longs temps de diffusion	36
e. En résumé	40
<b>I.6. AU-DELA DES CELLULES OU L'OBJECTIF DE CE TRAVAIL DE THESE</b>	<b>41</b>
I.6.I. L'ECS EN TANT QUE COMPARTIMENT TISSULAIRE	41
I.6.II. PROBLEME 1 : EVALUATION DE LA BIODISTRIBUTION CEREBRALE DU LACTATE	42
I.6.III. PROBLEME 2 : DEGENERESCENCE DES SOLUTIONS EN IRM DE DIFFUSION QUANTITATIVE	47
I.6.IV. APPORTS DE CE TRAVAIL DE THESE	48
<b>CHAPITRE II. LA SPECTROSCOPIE RMN PONDEREE EN DIFFUSION EN PRATIQUE</b>	<b>50</b>
<b>II.1. SETUP EXPERIMENTAL</b>	<b>50</b>
II.1.I. IRM 11.7 T ET ANTENNES UTILISEES	50
II.1.II. MISE EN PLACE DE L'ANIMAL	51
<b>II.2. SEQUENCES UTILISEES</b>	<b>52</b>
II.2.I. SUPPRESSION DE L'EAU GRACE AU MODULE VAPOR	52
II.2.II. ECHO STIMULE PONDERE EN DIFFUSION	52
II.2.III. LOCALISATION DU VOXEL EN SPECTROSCOPIE	53
a. Principe de localisation	53
b. Bloc de localisation LASER et absence de termes croisés	54
c. Impulsions adiabatiques	55
d. Erreur de déplacement chimique	58
II.2.IV. ACQUISITION DES MACROMOLECULES	59
II.2.V. DEROULE D'UNE EXPERIENCE EN PRATIQUE	60

<b>II.3. ETAPES DE TRAITEMENT DU SIGNAL</b>	<b>62</b>
II.3.I. ETAPES DE POST-TRAITEMENT	62
II.3.II. QUANTIFICATION DES METABOLITES SOUS LCMODEL	63

**CHAPITRE III. DOUBLE ENCODAGE EN DIFFUSION DANS LE CERVEAU DE SOURIS A 11.7 T: A QUELS PARAMETRES DE LA MICROSTRUCTURE SOMMES-NOUS SENSIBLES ?** **65**

<b>III.1. INTRODUCTION</b>	<b>65</b>
<b>III.2. METHODES SPECIFIQUES</b>	<b>68</b>
III.2.I. ACQUISITIONS EXPERIMENTALES	68
III.2.II. MODELISATION DES DONNEES	69
<b>III.3. RESULTATS</b>	<b>71</b>
III.3.I. MODULATION DU SIGNAL DDE POUR LES METABOLITES CEREBRAUX	71
III.3.II. ESTIMATION DE $D_{\text{FIBRE}}$ : SIMULATIONS DANS DES CYLINDRES INFINIS SOUS MISST	75
<b>III.4. DISCUSSION</b>	<b>79</b>
III.4.I. SENSIBILITE LIMITEE AU DIAMETRE DES FIBRES CELLULAIRES	79
III.4.II. A QUEL ASPECT DE LA MICROSTRUCTURE CELLULAIRE SOMMES-NOUS SENSIBLES ?	81
III.4.III. IMPACT DU TM SUR L'INFORMATION MICROSTRUCTURALE COLLECTEE	87
<b>III.5. CONCLUSION</b>	<b>90</b>

**CHAPITRE IV. ETUDE DES PROPRIÉTÉS DE DIFFUSION DU MILIEU EXTRACELLULAIRE PAR INJECTION STÉRÉOTAXIQUE DE SUCROSE DANS LE CERVEAU DE SOURIS** **91**

<b>IV.1. INTRODUCTION</b>	<b>91</b>
<b>IV.2. MATÉRIEL &amp; MÉTHODES SPÉCIFIQUES</b>	<b>95</b>
IV.2.I. CHIRURGIE STÉRÉOTAXIQUE	95
IV.2.II. PARAMÈTRES D'ACQUISITION POUR LES PROTOCOLES DE DW-MRS <i>IN VIVO</i>	95
a. Paramètres communs à toutes les mesures	95
b. Mesures aux hautes valeurs de B & ADC aux longs $t_{\text{ds}}$	96
c. Double encodage en diffusion (DDE)	97
d. Mesure du coefficient de diffusion libre du sucrose	98
e. Protocole de dissociation cellulaire	98
f. Spectroscopie HR-MAS	99
<b>IV.3. RÉSULTATS</b>	<b>100</b>



IV.3.I. INJECTION DANS LES VENTRICULES : DISTRIBUTION SATISFAISANTE DU SUCROSE ET CONTAMINATION LIMITÉE EN PROVENANCE DU CSF DANS NOTRE VOXEL D'INTÉRÊT	100
IV.3.II. INJECTION DANS LES VENTRICULES : PROPRIÉTÉS DE DIFFUSION DU SUCROSE DANS L'HIPPOCAMPE	102
IV.3.III. SITE D'INJECTION ALTERNATIF : PROPRIÉTÉS DE DIFFUSION DU SUCROSE DANS LE CORTEX PRÉFRONTAL	106
IV.3.IV. LE SUCROSE RESTE MAJORITAIREMENT DANS L'ECS D'APRÈS UN PROTOCOLE DE DISSOCIATION CELLULAIRE	109
<b>IV.4. DISCUSSION</b>	<b>112</b>
IV.4.I. BIAIS POTENTIELS LIÉS À L'UTILISATION D'UNE SONDE EXOGÈNE POUR LE MARQUAGE DE L'ESPACE EXTRACELLULAIRE	112
IV.4.II. LA DIFFUSION EST PLUS RAPIDE DANS L'ESPACE EXTRACELLULAIRE...	114
IV.4.III. ... MAIS ELLE EST ÉGALEMENT TORTUEUSE ET RESTREINTE	115
IV.4.IV. ABSENCE D'ANISOTROPIE MICROSCOPIQUE DANS L'ESPACE EXTRACELLULAIRE	117
IV.4.V. IMPACT DU PROTOCOLE D'INJECTION	117
IV.4.VI. UNE SENSIBILITÉ AU SYSTÈME GLYMPHATIQUE ?	118
a. Vasculature cérébrale et système glymphatique	118
<b>IV.5. CONCLUSION</b>	<b>122</b>
<b>CHAPITRE V. DEVELOPPEMENT D'UNE SEQUENCE GLUTAMATE-CEST PONDEREE EN DIFFUSION : RESULTATS PRELIMINAIRES ET PISTES D'AMELIORATION</b>	<b>123</b>
<b>V.1. INTRODUCTION</b>	<b>123</b>
V.1.I. L'EFFET GLUCEST EN BREF	123
V.1.II. GLUCEST ET DIFFUSION : UNE NOUVELLE SOURCE DE CONTRASTE POUR DISTINGUER LES ESPACES INTRA- ET EXTRANEURONAL ?	126
<b>V.2. METHODES SPECIFIQUES</b>	<b>129</b>
V.2.I. SEQUENCE DEVELOPEE	129
V.2.II. MESURES ISOTROPES DANS LE CORTEX (SUBSTANCE GRISE)	129
V.2.III. MESURES DIRECTIONNELLES DANS LE CORPS CALLEUX (SUBSTANCE BLANCHE)	130
V.2.IV. ANALYSE DES DONNEES	130
V.2.V. MESURE CONTROLE SUR FANTOME	131
<b>V.3. RESULTATS</b>	<b>132</b>
V.3.I. MESURE CONTROLE DANS UNE SOLUTION DE GLUTAMATE A 50 MM	132
V.3.II. MESURES DANS LE CORTEX	133
V.3.III. MESURES DANS LE CORPS CALLEUX	138
<b>V.4. DISCUSSION</b>	<b>143</b>

V.4.I. SPECIFICITE DE NOS PARAMETRES DE SATURATION CEST AU GLUTAMATE (ET DONC AU COMPARTIMENT NEURONAL)	143
V.4.II. UNE DIFFUSION MOINS RAPIDE DANS LES NEURONES DE LA SUBSTANCE GRISE ?	143
V.4.III. VERS UNE POTENTIELLE SENSIBILITE DIRECTIONNELLE DANS LA SUBSTANCE BLANCHE ?	144
<b>V.5. POUR ALLER PLUS LOIN (1/2) : ETAPES DE VALIDATION SUPPLEMENTAIRES</b>	<b>147</b>
V.5.I. MESURES SUR UN BROYAT DE CERVEAU	147
V.5.II. MODELE SYNTHETIQUE DE FIBRES PARALLELES	150
<b>V.6. POUR ALLER PLUS LOIN (2/2) : DEVELOPPEMENT D'UNE SEQUENCE D'IMAGERIE</b>	<b>153</b>
V.6.I. DESIGN DE LA SEQUENCE	153
V.6.II. PARAMETRES D'ACQUISITION ET ETAPES DE TRAITEMENT DU SIGNAL	154
V.6.III. RESULTATS PRELIMINAIRES	155
<b>V.7. CONCLUSION</b>	<b>160</b>
<b>CHAPITRE VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>161</b>
<b>CHAPITRE VII. PUBLICATIONS ET FINANCEMENTS OBTENUS EN LIEN AVEC CE TRAVAIL DE THESE</b>	<b>166</b>
<b>VII.1. PUBLICATIONS DANS DES JOURNAUX A COMITE DE RELECTURE</b>	<b>166</b>
<b>VII.2. PRESENTATIONS ORALES EN CONFERENCE</b>	<b>166</b>
<b>VII.3. BOURSES DE MOBILITE SCIENTIFIQUE</b>	<b>166</b>
<b>CHAPITRE VIII. RÉFÉRENCES</b>	<b>167</b>

---

# ABBREVIATIONS ET NOTATIONS

AD	Diffusivité axiale
ADC	Coefficient de diffusion apparent
AFP	Adiabatic Full Passage
AHP	Adiabatic Half Passage
Ala	Alanine
ATP	Adénosine tri-phosphate
b	Pondération en diffusion
$B_0$	Champ magnétique statique
$B_1$	Champ magnétique oscillant
CEST	Chemical Exchange Saturation Transfert
Cho	Choline
Cr	Créatine
CRLB	Cramér-Rao Lower Bounds
CSF	Liquide cérébrospinal
D	Coefficient de diffusion libre théorique
$D_{\parallel}$	Diffusivité axiale dans des fibres
$D_{\perp}$	Diffusivité radiale dans des fibres
DDE	Double encodage en diffusion
$d_{\text{fibre}}$	Diamètre de la fibre cellulaire
$D_{\text{free}}$	Coefficient de diffusion libre expérimental
DKI	Diffusion Kurtosis Imaging
$d_{\text{soma}}$	Diamètre du corps cellulaire
DTI	Diffusion Tensor Imaging
DW-MRS	Spectroscopie RMN pondérée en diffusion
DW-MRI	Imagerie de diffusion
ECM	Matrice extracellulaire
ECS	Espace extracellulaire
FA	Fractional Anisotropy

FID	Décroissance libre de l'induction
G	Intensité du gradient
g	Forme du gradient
GABA	Acide $\gamma$ -aminobutyrique
$G_{diff}$	Gradient de diffusion
GFAP	Glial acidic fibrillary protein
Gln	Glutamine
Glu	Glutamate
HBSS	Solution saline équilibrée de Hank
HR-MAS	High-Resolution Magic Angle Spinning
ICS	Milieu intracellulaire
Ins	Myo-Inositol
IRM	Imagerie par résonance magnétique
Lac	Lactate
LASER	Localisation by Adiabatic SElective Refocusing
LDH	Lactate déshydrogénase
$L_{seg}$	Longueur des segments des fibres cellulaires
M	Aimantation macroscopique
MD	Diffusivité moyenne
MM	Macromolécules
MTRasym	Asymetrical Magnetization Transfer Ratio
NAA	N-acetylaspartate
$N_{branche}$	Nombre d'embranchements
PCA	Acide perchlorique
PCr	Phosphocréatine
RD	Diffusivité radiale
RF	Radiofréquence
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SDE	Simple encodage en diffusion
SNR	Rapport signal sur bruit

SVD	Single Value Decomposition
$T_1$	Temps de relaxation longitudinale
$T_2$	Temps de relaxation transversale
Tau	Taurine
tCho	Choline totale
tCr	Créatine totale
td	Temps de diffusion
TE	Temps d'écho
TI	Temps d'inversion
TM	Temps de mélange
TR	Temps de répétition
VAPOR	Variable Pulse power and Optimized Relaxation delays
$\delta$	Durée d'un gradient de diffusion
$\Delta$	Durée entre deux gradients de diffusion
$\gamma$	Rapport gyromagnétique
$\lambda$	Tortuosité
$\omega_0$	Fréquence de Larmor
$\omega_1$	Fréquence de l'impulsion radiofréquence

---

# CHAPITRE I. DEVOILER LA MICROSTRUCTURE CEREBRALE PAR SPECTROSCOPIE RMN PONDEREE EN DIFFUSION: COMMENT ET DANS QUEL BUT ?

## I.1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et de Huntington constituent l'objet de recherche principal du laboratoire MIRCen et sont toutes trois causées par l'accumulation toxique de protéines mal conformées et insolubles dans le système nerveux central : plaques de peptides amyloïde- $\beta$  et amas de protéines tau hyperphosphorylées dans le cas de la maladie Alzheimer, fibrilles d' $\alpha$ -synucléine pour Parkinson et mutation génétique de la huntingtine pour la maladie de Huntington (1). Ces maladies chroniques et incurables mènent à l'apparition de symptômes cognitifs et moteurs entraînant une perte d'autonomie progressive pour le patient (2). De plus, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson constituent les deux maladies neurodégénératives les plus courantes, avec 750 000 et 200 000 cas en France respectivement (3,4).

A l'échelle métabolique, ces pathologies sont caractérisées par de nombreux dérèglements de la machinerie cellulaire. En effet, le stress oxydatif (5), l'activation de mécanismes inflammatoires (6) ainsi que des dysfonctionnements de la transmission synaptique (7,8), du transport axonal (9), du métabolisme énergétique (10) ou encore de la fonction mitochondriale (11) ont été identifiés comme autant de facteurs impliqués dans la pathogénèse des maladies neurodégénératives. Il est donc particulièrement difficile de dépeindre un tableau exhaustif de toutes les modifications biochimiques caractérisant les maladies neurodégénératives en raison de la myriade de processus métaboliques en jeu ainsi que de leur interdépendance.

L'apparition de symptômes cliniques associés aux maladies neurodégénératives sont caractéristiques d'un stade avancé de la progression de la pathologie ; en d'autres termes, une perte irréversible et importante des cellules neuronales a déjà eu lieu. L'identification de biomarqueurs précoces des maladies neurodégénératives constitue par conséquent un enjeu

majeur afin de permettre 1) une meilleure compréhension des mécanismes ainsi que les possibles relations de causalité les gouvernant et 2) un diagnostic en amont de l'apparition des troubles cognitifs et/ ou moteurs afin d'augmenter les chances de succès d'un éventuel traitement pharmacologique.

Dans ce contexte, l'étude de la microstructure cérébrale apparaît comme une approche prometteuse visant à détecter de possibles altérations de la morphologie cellulaire précédant la mort neuronale. En effet, à l'échelle cellulaire, les maladies neurodégénératives sont souvent caractérisées par une atrophie neuronale accompagnée d'une déformation importante des axones (gonflement et «beading») ainsi qu'une détérioration de l'arbre dendritique et des épines le composant (12–15). Les astrocytes sont quant eux le siège de processus inflammatoires et sont dits « réactifs », un état notamment caractérisé par une hypertrophie cellulaire causée entre autre par la surexpression de la glial fibrillary acidic protein (GFAP) (16). A l'échelle des tissus, une atrophie prononcée des lobes corticaux (17–19) ou d'autres régions cérébrales telles que le corps calleux (20) sont caractéristiques d'un stade avancé de la maladie. Des défauts de connexion entre les régions résultant de la dégradation de la substance blanche peuvent également être observés (21–23).

Plusieurs technologies permettent d'imager la microstructure à différentes échelles en conditions saine ou pathologique. En recherche préclinique, différentes approches de microscopie visent à obtenir une résolution à l'échelle nanométrique (notamment la microscopie électronique ou la microscopie à super résolution). En revanche, ces techniques ne peuvent être utilisées que sur des coupes histologiques *ex vivo*, ce qui limite *de facto* leur utilisation clinique. L'imagerie par résonance magnétique (IRM), et plus précisément les mesures de diffusion de l'eau (DW-MRI), offre une alternative non-invasive à ces méthodes et constitue une modalité incontournable en radiologie clinique. Dans cette optique, un arsenal de méthodes basées sur différentes approches expérimentales (imagerie du tenseur de diffusion et du kurtosis, acquisition du q-space, ...) a été mis au point afin de proposer des métriques quantitatives caractérisant la microstructure dans le but de permettre *in fine* un suivi longitudinal des maladies neurodégénératives (24).

Le signal de diffusion manque malheureusement de spécificité. En effet, la nature ubiquitaire de l'eau complique grandement l'interprétation des données d'imagerie de diffusion en termes de microstructure. Il est par conséquent nécessaire de décomposer le voxel d'intérêt en différents compartiments tissulaires modélisés par des structures géométriques simplifiées

(sphères, cylindres, etc...). Idéalement, ces compartiments doivent par ailleurs présenter des propriétés de diffusion suffisamment différentes pour être discernés expérimentalement. Cette approche nécessite d'utiliser des *a priori* forts sur la nature de ces différents compartiments tissulaires ainsi que leurs propriétés de diffusion. Par exemple, il est en pratique courant de distinguer le milieu intracellulaire (ICS) de l'espace extracellulaire (ECS). Il s'avère donc nécessaire de valider expérimentalement les hypothèses concernant les propriétés de diffusion de ces compartiments. Plus précisément, la diffusion est-elle plus rapide dans l'ECS ou l'ICS ? La diffusion dans l'ECS est-elle libre ou bien est-on au contraire sensible à des phénomènes de restriction et de tortuosité?

La spectroscopie RMN pondérée en diffusion (DW-MRS) constitue une approche plus spécifique car elle permet de sonder uniquement l'ICS en mesurant la diffusion de métabolites cérébraux majoritairement confinés dans l'espace intracellulaire (leur concentration dans l'espace extracellulaire étant 1000 à 10000 fois inférieure à leur concentration intracellulaire). Certains métabolites constituent par ailleurs des biomarqueurs d'un type cellulaire donné, tels que le N-acétylaspartate ou le myo-inositol pour les compartiments neuronal et glial respectivement. A l'instar de l'imagerie de l'eau, différents types de mesures de DW-MRS ont été développées afin de collecter des informations complémentaires sur la microstructure en termes de restriction, de tortuosité et d'anisotropie microscopique. Dans un contexte pathologique, ces outils constituent une approche prometteuse afin de détecter de possibles altérations morphologiques associés à des types cellulaires différents comme l'atrophie neuronale ou la réactivité astrocytaire.

Les mesures de DW-MRS peuvent également aider à clarifier la distribution au sein des différents types cellulaires de métabolites impliqués dans le métabolisme cérébral, tels que le glucose ou le lactate. Dans le contexte de l'hypothèse de la navette astrocyte-neurone, cette information est en effet cruciale afin d'éclaircir le rôle métabolique de ces molécules en conditions saine et pathologique. Ces molécules sont cependant non seulement présentes dans les compartiments intracellulaires (neuronal et glial) mais aussi dans l'ECS. On en revient par conséquent à la nécessité de distinguer les propriétés de diffusion de ces compartiments dans le but de modéliser leur contribution au signal de diffusion et ainsi évaluer la biodistribution de ces métabolites.

Contrairement à l'ICS, l'ECS constitue un territoire encore relativement peu exploré, notamment en raison de l'absence de marqueur endogène de ce compartiment. Le besoin



d'acquérir des connaissances expérimentales supplémentaires sur les propriétés de diffusion de l'ECS a par conséquent motivé ce travail de thèse où nous présentons de nouveaux outils RMN permettant de caractériser la diffusion au sein des différents compartiments tissulaires.

Le reste de cette partie introductive résumera les différents aspects de la microstructure cérébrale avant de rappeler brièvement les principes physiques gouvernant les mécanismes de diffusion. Nous reviendrons ensuite sur l'origine du signal RMN et sur comment mesurer la diffusion *in vivo* en RMN. Nous détaillerons ensuite en quoi les outils de DW-MRS permettent d'obtenir des informations complémentaires et uniques sur la nature de la microstructure cérébrale par rapport à des modalités IRM plus couramment utilisées telles que l'imagerie du tenseur de diffusion. Enfin, nous exposerons en quoi il est intéressant de caractériser expérimentalement les propriétés de diffusion des différents compartiments tissulaires, et plus précisément de l'ECS ; afin de 1) permettre de mieux analyser la diffusion du lactate en termes de distribution cellulaire et 2) affiner les modèles utilisés en IRM de diffusion quantitative.

## **I.2. DE LA MICROSTRUCTURE CEREBRALE AUX METABOLITES**

### **I.2.i. DIFFERENTS ASPECTS DE LA MICROSTRUCTURE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL**

Le cerveau est composé de tissus complexes et hétérogènes du point de vue de la microstructure. Cette partie met en lumière divers éléments de l'architecture cérébrale avant de présenter en quoi certains métabolites sont spécifiques d'un compartiment cellulaire donné.

#### **a. MICROSTRUCTURE DES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES**

##### **NEURONES**

Les neurones sont le siège de la transmission de l'information bioélectrique dans le cerveau : la circulation de charges ioniques de part et d'autre de la membrane cellulaire par l'intermédiaire de canaux calciques, potassiques et sodiques présents au niveau des synapses permet de générer un potentiel d'action. Ce dernier est ensuite transmis par un jeu de transport et d'accumulation des charges ioniques le long de l'axe axonal, sa vitesse de transmission étant grandement amplifiée par la présence d'une gaine de myéline enroulée le long de l'axone (25). Afin d'assurer la neurotransmission ainsi que de nombreuses fonctions métaboliques, des microtubules sont déployés depuis le corps cellulaire jusqu'aux synapses, permettant ainsi le transport de cargos moléculaires le long de l'axe axonal (26).

Les neurones présentent un corps cellulaire étoilé (7-58  $\mu\text{m}$  de diamètre) présentant 1 à 5 ramifications, ou dendrites, qui se subdivisent à leur tour, formant ainsi l'arbre dendritique (27,28). Chez l'Homme, les dendrites, dont le diamètre est généralement compris entre 0.2 et 3  $\mu\text{m}$ , se déploient en branches dont le nombre peut varier de 4 à 400, venant ainsi établir un réseau dense d'interconnexions avec d'autres neurones. La distance radiale entre le soma et l'extrémité de la dendrite la plus éloignée varie de 15 à 1800  $\mu\text{m}$  (28). L'organisation spatiale du réseau de dendrites peut grandement diverger d'une structure à l'autre : alors que ce réseau présente une organisation plutôt isotrope dans le cortex, il est fortement unidirectionnel dans l'hippocampe (29). L'architecture de l'arbre dendritique joue grandement sur le type de potentiel d'action généré par la cellule (30).

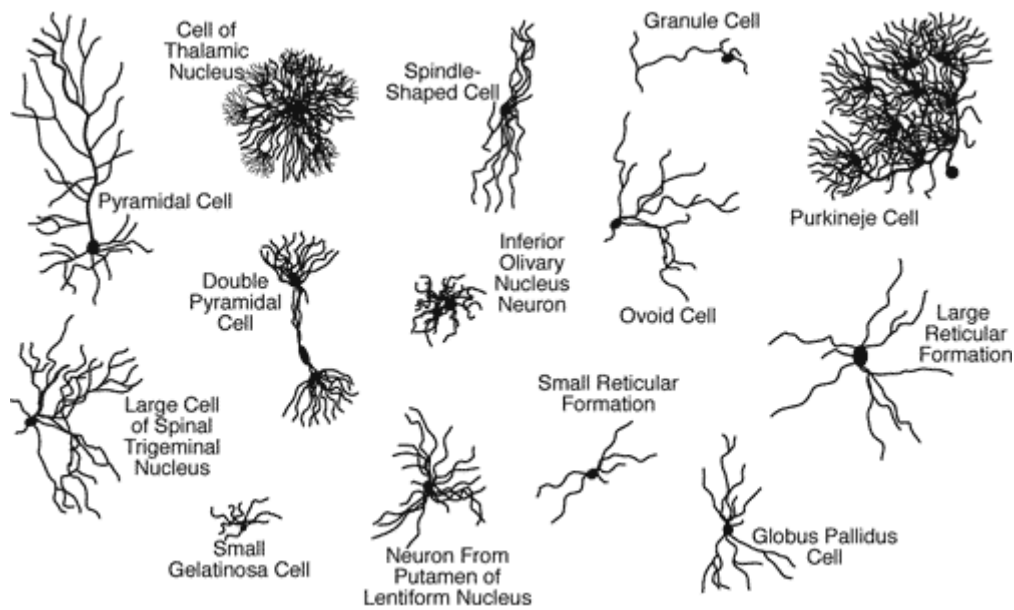
Les épines dendritiques forment des excroissances de 1 à 2  $\mu\text{m}$  de longueur jaillissant des dendrites. Elles contiennent une ou plusieurs synapses et constituent donc le siège de la

communication neuronale. Elles présentent une diversité de morphologies (« filopodium », « thin », « stubby », « mushroom », « cup ») et sont capables de changer de forme en quelques secondes. Les épines dendritiques peuvent également apparaître et disparaître à un rythme élevé, ce qui permet à la cellule de s'adapter en temps réel à l'intensité de l'activité neuronale (31,32).

Les neurones possèdent par ailleurs un axone dont la longueur varie amplement en fonction du type de neurone. On définit ainsi trois catégories d'axones : des « petits » axones (<3 mm) principalement présents dans le cortex, des axones plus longs (3-30 mm) localisés dans la substance blanche dite « superficielle » juste en dessous de la substance grise du cortex et enfin, des axones très longs (>30 mm) retrouvés dans les faisceaux de fibres composant la substance blanche profonde (33,34). Le diamètre axonal est le plus souvent compris entre 0.1 et 10  $\mu\text{m}$  et a un effet direct sur les propriétés conductrices de la cellule : le « gros » axones seront plus conducteurs mais également plus gourmands en énergie (28). Au sein d'un même faisceau, les axones présentent une distribution de diamètre qui dépend des zones d'origine et de projection connectées par ce faisceau (35,36). Cette distribution est communément modélisée par une distribution  $\Gamma$  asymétrique étalée à droite, reflétant une majorité de diamètres axonaux inférieurs à 1  $\mu\text{m}$  tandis que certains axones peuvent s'avérer bien plus larges (37).

La majorité des axones sont protégés par une gaine de myéline épaisse d'une dizaine de nanomètres. Sa composition majoritairement lipidique (80%) lui confère des propriétés isolantes qui permettent de réduire la capacitance de la membrane axonale, améliorant par conséquent la vitesse de propagation des charges ioniques au sein de l'axone. On définit en outre l'espace péri-axonal comme étant la cavité séparant l'axone de la gaine myélinique.

Enfin, il est important de souligner que les neurones se déclinent en une grande diversité de morphologies, allant de l'interneurone (30% du nombre total de cellules neuronales) aux neurones pyramidaux (33). Il faut donc garder à l'esprit qu'il n'existe pas de description générique de la morphologie neuronale (cf **Figure I-1**).



**Figure I-1 : Illustrations de Cajal représentant la diversité de morphologies caractérisant les cellules neuronales. Tiré de (38).**

### CELLULES GLIALES

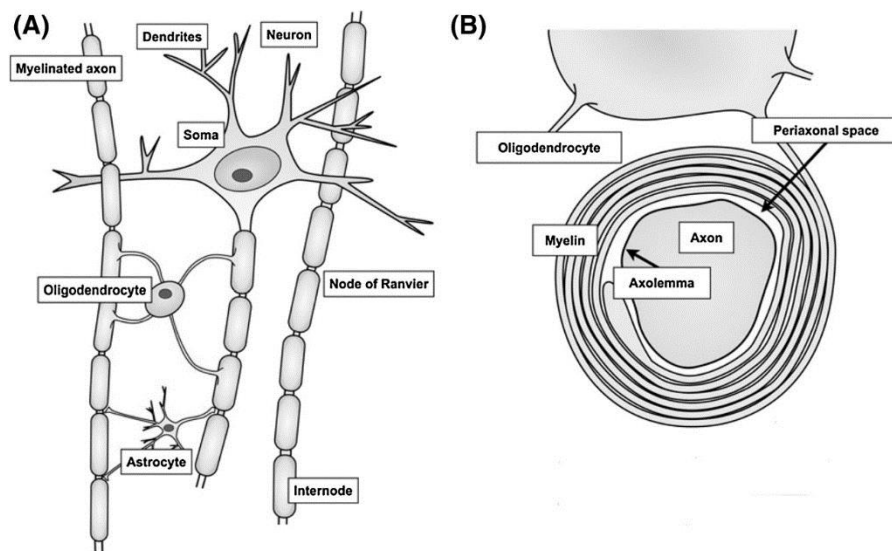
Les cellules gliales regroupent trois types cellulaires : les oligodendrocytes (75% des cellules gliales), les astrocytes (19%) et la microglie (6%) (39). La population de cellules gliales est majoritaire dans la substance grise corticale, leur nombre étant 30 à 40% supérieur à celui des cellules neuronales (28,40).

Les oligodendrocytes sont essentiels à la transmission de l'information neuronale car ils fournissent des segments de myéline venant s'enrouler autour de un ou plusieurs axones. Ils sont constitués d'un corps cellulaire d'environ 13  $\mu\text{m}$  de diamètre présentant jusqu'à 30 prolongements myélinisant (28,41). La microglie est constituée de cellules mobiles dont le corps cellulaire étoilé (10  $\mu\text{m}$  de diamètre) exhibe quelques petites ramifications. L'amplitude radiale totale de ces cellules n'excède pas 15 à 30  $\mu\text{m}$  (28). La microglie joue un rôle de macrophage et constitue donc un acteur majeur de la réponse immunitaire dans le système nerveux central (42).

Les astrocytes établissent une multitude de partenariats signalétiques complexes avec les autres types cellulaires cérébraux, couvrant ainsi de nombreuses fonctions incluant la neurogenèse (43), la synaptogenèse (44), la modulation de l'activité neuronale notamment via le relargage de gliotransmetteurs (45), le support énergétique à l'activité neuronale (46), ou encore la neuroinflammation (47). Les astrocytes prennent également part au couplage neurovasculaire grâce aux pieds astrocytaires qui se déploient autour des vaisseaux sanguins,

contrôlant ainsi la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique afin d'assurer l'homéostasie dans le milieu extracellulaire (48).

Les astrocytes présentent un corps cellulaire étoilé de 10  $\mu\text{m}$  orné de prolongements astrocytaires de 1-2  $\mu\text{m}$  de diamètre dont le nombre peut s'élever jusqu'à 8 (28,49). Ces prolongements se divisent à leur tour en branches plus fines dont les extrémités viennent former des feuilletts dont les dimensions de l'ordre de la centaine de nanomètres permettent d'établir une connexion spatiale rapprochée au plus près des synapses. A l'instar des neurones, les astrocytes présentent une grande variété de phénotypes et le lien entre morphologie, fonction et appartenance à une région cérébrale précise reste encore à clarifier (49). L'organisation spatiale des neurones et des cellules gliales est présentée dans la **Figure I-2**.



**Figure I-2 : A) Représentation schématique des différents types cellulaires présents dans le cerveau ainsi que de leurs principales caractéristiques morphologiques. B) Coupe axiale d'un segment de myéline enroulé autour d'un axone. Tiré de Nilsson *et al* (52).**

## **b. SUBSTANCE BLANCHE ET SUBSTANCE GRISE**

A l'échelle des tissus, on distingue la substance blanche de la substance grise. Tandis que la première est majoritairement composée de cellules gliales ainsi que d'axones myélinisés densément regroupés dans des faisceaux, la seconde regroupe corps cellulaires, dendrites et petits axones intra corticaux.

Contrairement à la substance grise qui présente une organisation spatiale très hétérogène, les faisceaux d'axones sont des structures hautement organisées et anisotropes. Ils peuvent projeter vers des zones localisées dans le même hémisphère (faisceaux longitudinaux) ou bien venir

connecter les deux hémisphères entre eux (corps calleux). La substance blanche superficielle désigne par ailleurs des faisceaux d'association subcorticaux établissant la liaison entre les gyri des différents lobes corticaux dans un même hémisphère (50). La substance blanche profonde assure quant à elle la connexion entre les régions corticales et des régions cérébrales plus profondes telles que les noyaux gris de la base, le tronc cérébral, la moelle épinière ou le thalamus (51). Les faisceaux sont souvent représentés par un ensemble de cylindres parallèles formant une structure compacte. Cependant, nous verrons par la suite que cette vision simplifiée omet d'importants aspects de la microstructure, tels que les ondulations, la dispersion directionnelle des fibres ou encore la possible présence d'un croisement de faisceaux (28,52).

## I.2.ii. LES METABOLITES CEREBRAUX : BIOMARQUEURS DES TYPES CELLULAIRES AU SEIN DU SNC

Par souci de concision et de cohérence avec le reste du manuscrit, il ne sera fait mention dans cette partie que des métabolites détectables en spectroscopie RMN du proton.

### a. MARQUEURS NEURONAUX

#### N-ACETYLASPARTATE (NAA)

Bien que quelques études dans des cultures *in vitro* révèlent la présence en faible quantité de NAA dans des oligodendrocytes immatures ou dans des cellules progénitrices (53), cette molécule constitue un marqueur de choix du compartiment neuronal (53,54). Le NAA est distribué de façon similaire au sein de la substance blanche et de la substance grise et se retrouve dans tous les sous-types neuronaux, principalement au niveau des dendrites proximaux et de l'axone. Il est particulièrement concentré dans les neurones présentant de longs axones (55). Le rôle du NAA au sein des neurones reste cependant à être précisé. Bien qu'il ne soit pas un neurotransmetteur, le NAA prend part à de nombreux processus métaboliques parmi lesquels le maintien de l'osmolarité, le stockage d'aspartate, la formation de lipides lors de la synthèse de la myéline, ... (54,56). L'enzyme permettant la synthèse du NAA est principalement localisée dans les mitochondries (57).

#### GLUTAMATE (GLU)

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur le plus répandu du système nerveux central (58). Il peut également être décarboxylé afin de synthétiser l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique ou GABA, un neurotransmetteur inhibiteur. Le glutamate est réparti entre une sous-population intracellulaire (prenant part au métabolisme et à la neurotransmission) et une sous-population

extracellulaire (représentant cependant moins de 1% de la quantité totale de glutamate) (54). Dans les neurones, une partie du glutamate est stockée dans des vésicules pour être déversé dans la fente synaptique par exocytose. Il se fixe alors aux récepteurs ionotropes du neurone post-synaptique, permettant ainsi l'ouverture des canaux ioniques et la propagation du potentiel d'action. L'accumulation de glutamate dans l'espace extracellulaire peut cependant engendrer une sur-activation délétère des neurones post-synaptiques (excitotoxicité). Le cycle glutamate-glutamine a donc été proposé afin de décrire la recapture du glutamate par les astrocytes afin d'y être converti en glutamine avant d'être à nouveau transporté vers les neurones et reconverti *in situ* en glutamate (59).

## **b. MARQUEURS GLIAUX**

### **MYO-INOSITOL (INS)**

Il a été établi que le myo-inositol constitue un biomarqueur spécifique aux cellules gliales (60) où il prend part à des fonctions d'osmorégulation ainsi qu'à l'homéostasie du calcium (61). Le myo-inositol est également un précurseur de phospholipides membranaires et est impliqué dans le maintien de la structure de la membrane cellulaire ainsi que de la myéline (60,62). De plus, le myo-inositol se retrouve en plus grande quantité dans la substance blanche que la substance grise (62). L'apport en myo-inositol s'effectue à partir de l'alimentation ou bien via sa synthèse à partir du glucose-6-phosphate (63).

### **GLUTAMINE (GLN)**

Ainsi que mentionné précédemment, la glutamine est produite par les astrocytes à partir du glutamate extracellulaire grâce à la glutamine synthase dans le cadre du cycle glutamine/glutamate (64). Elle est donc considérée comme un marqueur astrocytaire.

### **COMPOSES A BASE DE CHOLINE (TCHO)**

La choline totale est deux à trois fois plus concentrée dans les cellules gliales que dans les neurones (54,65). Les composés cholinergiques (choline libre, phosphocholine et glycérophosphocholine) jouent le rôle de nutriments et sont impliqués dans plusieurs réactions en tant que donneur de méthyle. Ils constituent d'indispensables précurseurs à la formation de phospholipides nécessaires à la biogénèse membranaire, la signalisation cellulaire, la myélinisation, la division cellulaire ou encore le transport lipidique. Ils sont également nécessaires à la synthèse d'acétylcholine, un neurotransmetteur permettant l'activation des neurones cholinergiques (66).

## c. METABOLITES NON-SPECIFIQUES

### CREATINE ET PHOSPHOCREATINE (TCr)

Après avoir traversé la barrière hématoencéphalique, la créatine extracellulaire est principalement assimilée par les oligodendrocytes ainsi que les neurones (67). La créatine est également synthétisée *in situ* dans les oligodendrocytes et dans une moindre mesure, les astrocytes, à partir de la glycine et de l'arginine. En outre, le couple créatine/phosphocréatine joue un rôle majeur dans la régulation métabolisme énergétique, notamment dans les neurones (68). La créatine peut en effet être localement phosphorylée par la créatine kinase, permettant le stockage transitoire de groupes phosphores nécessaires à la régénération de l'ATP à partir de l'ADP (67).

### TAURINE

La taurine est un acide aminé impliqué dans une variété de fonctions physiologiques dans le système nerveux central, allant de la neurotransmission à la régulation de l'homéostasie du calcium intracellulaire en passant par la neuroprotection (69). L'apport de la taurine dans le cerveau est assuré par l'alimentation ou bien par sa synthèse à partir de la cystéine par les neurones et les astrocytes (70).



## I.3. LE PHENOMENE DE DIFFUSION

### I.3.i. DE LA DIFFUSION LIBRE...

La notion de mouvement Brownien provient du naturaliste écossais Robert Brown qui observe dès 1827 le mouvement aléatoire de particules à l'intérieur de graines de pollen. De façon plus générale, ce mouvement décrit un déplacement des particules dans un fluide ou gaz en l'absence de mouvement macroscopique de ce fluide (flux), conduisant ainsi à l'homogénéisation du milieu. Ce phénomène, dû à l'agitation thermique, survient donc dans n'importe quel fluide ou gaz dont la température n'est pas égale au zéro absolu. Les particules décrivent alors des trajectoires aléatoires au hasard des collisions qu'elles subissent. Ces déplacements sont isotropes, c'est-à-dire qu'ils possèdent une probabilité égale de survenir dans n'importe quelle direction de l'espace. Chaque déplacement peut être considéré comme une variable aléatoire indépendante des autres déplacements. Si on considère un nombre suffisant de particules, l'application du théorème central limite (TCL) nous permet d'affirmer que la diffusion est un processus suivant une distribution Gaussienne. Dans ce contexte, on parle de diffusion libre car le mouvement des particules n'est pas entravé par d'éventuels obstacles ou parois.

Il n'y a pas de cohérence d'ensemble pour un groupe de particules subissant le mouvement Brownien. Par conséquent, la moyenne arithmétique des positions  $\langle r \rangle$  est nulle. Le mouvement Brownien se caractérise en revanche par la variance des déplacements qui augmente linéairement avec le temps. On s'intéresse donc à la moyenne quadratique des positions  $\langle (r - r_0)^2 \rangle$ . Le mouvement Brownien étant un phénomène Gaussien, la densité de probabilité  $p$  qu'une particule occupe une position  $r$  à l'instant  $t$  prend par conséquent la forme suivante :

$$p(r/r_0, t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp\left(\frac{-(r-r_0)^2}{4Dt}\right) \quad (\text{I.3.1})$$

Où  $D$  est le coefficient de diffusion libre. Cette densité de probabilité est également appelée propagateur de diffusion. Le déplacement quadratique moyen est donné par la relation d'Einstein-Smoluchowski:

$$\langle (r - r_0)^2 \rangle = \int_r (r - r_0)^2 \times p(r, t / r_0) dr \quad (\text{I.3.2})$$

En combinant **I.3.1** et **I.3.2**, on obtient dans un espace à trois dimensions  $\langle (r - r_0)^2 \rangle = 6Dt$  ou encore dans un espace à une dimension  $\langle (x - x_0)^2 \rangle = 2Dt$ , soit :

$$D = \frac{\langle (x-x_0)^2 \rangle}{2t} \quad (\text{I.3.3})$$

La relation d'Einstein-Smoluchowski établit par ailleurs le lien entre  $D$  et la température d'un gaz ou un fluide :

$$D = \mu k_b T \quad (\text{I.3.4})$$

Où  $k_b$  est la constante de Boltzmann et  $\mu$  la mobilité des particules. Pour une particule donnée, la mobilité  $\mu$  est régie par le rapport entre sa vitesse  $\vec{v}$  et la force de frottement visqueux  $\vec{F}$  exercé par le fluide, venant ainsi s'opposer à la diffusion. Dans un écoulement non-turbulent et pour une particule sphérique suffisamment éloignée de tout obstacle, cette force de frottement est proportionnelle à la vitesse de la particule. Elle est plus précisément gouvernée par la loi de Stokes :

$$\vec{F} = -K\vec{v} \quad (\text{I.3.5})$$

Avec  $K = 6\pi\nu R_H$ ,  $\nu$  étant la viscosité dynamique du fluide et  $R_H$  le rayon hydrodynamique. En combinant les équations **I.3.4** et **I.3.5**, on obtient la relation de Stokes-Einstein, ou l'expression du coefficient de diffusion libre d'une particule sphérique à l'état stationnaire :

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\nu R_H} \quad (\text{I.3.6})$$

Cette relation est limitée par le fait que les molécules d'intérêt ne sont généralement pas des sphères. De plus, cette formule n'est valable que dans un milieu suffisamment dilué et pour des particules présentant un rayon hydrodynamique suffisamment grand.

### I.3.ii. ... A LA DIFFUSION EN CONDITIONS BIOLOGIQUES

#### a. QUELQUES DEFINITIONS

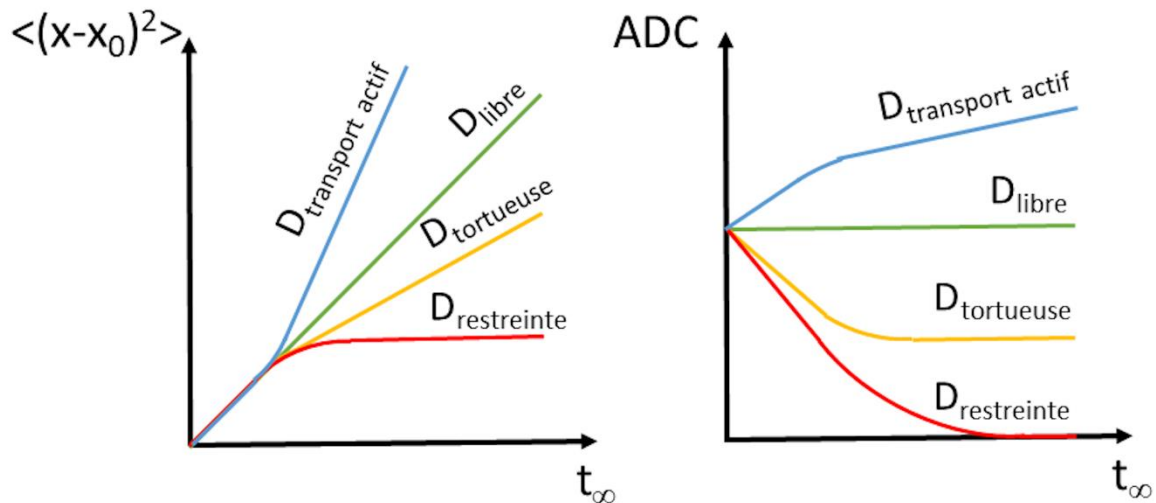
Le milieu intracellulaire constitue le siège de multiples réactions métaboliques et comprend de nombreux ions impliqués dans l'osmorégulation, la signalisation cellulaire ou encore la génération de potentiels d'action. Il s'agit de plus d'un milieu encombré à l'échelle nanométrique par des amas de macromolécules. Cet encombrement moléculaire permet de réguler le volume de solvant disponible au sein de la cellule, modulant ainsi la concentration d'autres molécules telles que des protéines ou des acides nucléiques. Dans ce contexte, le cytosol est par nature un milieu visqueux.



de la diffusion de molécules confinées dans une structure hermétique conduit *in fine* à une mesure indirecte de la géométrie de cette structure ; le propagateur de diffusion moyen dans l'espace devient ainsi un marqueur de la microstructure cellulaire.

Dans un cadre expérimental de mesures *in vivo*, le coefficient de diffusion libre est remplacé par le coefficient de diffusion apparent (ADC). A l'instar de  $D$ , l'ADC peut être défini comme environ égal à  $\langle(r-r_0)^2\rangle/6t$  en 3D ou bien à  $\langle(x-x_0)^2\rangle/2t$  en 1D. Il est important de garder ici à l'esprit que l'on s'intéresse à la moyenne d'ensemble des déplacements des particules. Ainsi, en conditions *in vivo*, la proportion de molécules expérimentant un contact direct avec les obstacles formés par la microstructure augmente avec le temps et la valeur de l'ADC dépend non seulement des propriétés du milieu de diffusion mais également du temps de diffusion.

Par conséquent, on distingue trois régimes en fonction du temps de diffusion en conditions restreintes. A temps de diffusion très court ( $<1$  ms), il est très peu probable que la majorité des particules rencontrent un quelconque obstacle biologique et l'ADC reflète principalement la viscosité du milieu. Pour un temps de diffusion intermédiaire (de l'ordre de la dizaine à la centaine de millisecondes), la diffusion est sensible à la tortuosité ainsi qu'à la restriction induite par des structures ou sous-structures biologiques dont les dimensions sont inférieures à la dizaine de micromètres, tels que les organelles ou le diamètre des fibres cellulaires. Enfin, les mesures aux longs temps de diffusion (centaine de millisecondes et plus) permettent d'accéder à des propriétés structurelles de l'ordre de la dizaine voire centaine de micromètres telles que le diamètre du corps cellulaire ou la longueur des fibres cellulaires. Lorsque le temps de diffusion tend vers l'infini, l'ensemble des particules confinées dans un espace clos a subi la restriction induite par l'environnement. L'ADC tend alors vers zéro. La **Figure I-4** ci-dessous présente le lien entre les différents cas de figure possibles en diffusion et l'évolution temporelle de la moyenne quadratique des déplacements  $\langle(x-x_0)^2\rangle$  ainsi que de l'ADC.



**Figure I-4 : Schéma de l'évolution temporelle de la moyenne quadratique des déplacements  $\langle(x-x_0)^2\rangle$  (à gauche) et de l'ADC (à droite) pour différents comportements de diffusion. En conditions restreintes,  $\langle(x-x_0)^2\rangle$  ne décrit plus une droite linéaire en fonction du temps, mais finit par atteindre un plateau. Dans le cas d'une diffusion uniquement tortueuse, le comportement de  $\langle(x-x_0)^2\rangle$  dévie également de celui de la diffusion libre : bien que dans ce cas un plateau ne soit jamais atteint, la vitesse d'accroissement de  $\langle(x-x_0)^2\rangle$  diminue par rapport au cas de la diffusion libre. Le comportement inverse est observé lors d'une diffusion active, facilitée par exemple par des transporteurs membranaires ou dans le cas d'un flux convectif. L'évolution temporelle de  $\langle(x-x_0)^2\rangle$  se reflète logiquement dans celle de l'ADC. Dans le cas de la diffusion libre, l'ADC reste constant. Il diminue néanmoins en conditions tortueuses et finit par atteindre une valeur nulle dans le cas d'une diffusion en milieu restreint lorsque  $t$  tend vers l'infini. A l'inverse, l'ADC augmente dans le cas de la diffusion active.**

## I.4. MESURER LA DIFFUSION PAR RMN

### I.4.i. BASES DE RMN

Le noyau atomique se caractérise par quatre propriétés essentielles : sa masse, sa charge électrique, son magnétisme et son spin. Cette dernière propriété quantique a été fortuitement mise en lumière par l'expérience de Stern et Gerlach en 1922, dont le but initial était de mesurer expérimentalement la quantification discrète des moments cinétique et magnétique atomiques prédite par le modèle de Bohr. Le spin caractérise une forme de moment cinétique intrinsèque au noyau, qui contrairement au moment angulaire défini en mécanique classique, ne résulte pas d'une réelle rotation mécanique. L'observation du spin est en effet restreinte au monde quantique et ne possède pas d'équivalent à l'échelle macroscopique.

A un noyau de spin  $I$  peuvent être associés plusieurs configurations de spins des protons et des neutrons qui correspondent au même niveau d'énergie : on parle alors de dégénérescence. Plus précisément, pour un noyau de spin  $I$ , on aura  $(2I+1)$  états quantiques associés au même état fondamental. L'atome possède un moment cinétique intrinsèque, ou moment cinétique de spin, dont l'amplitude dépend de  $I$  :

$$P = \frac{h}{2\pi} \sqrt{I(I+1)} \quad (\text{I.4.1})$$

Avec  $h$  est la constante de Planck. La direction qu'est susceptible de prendre ce moment angulaire intrinsèque  $P$  est discrétisée et gouvernée par le nombre quantique  $m$ . La composante en  $z$  du moment angulaire peut alors s'exprimer comme suit:

$$P_z = \frac{h}{2\pi} m \quad (\text{I.4.2})$$

Avec  $m = \{I, I-1, \dots, -I\}$ .

On associe par ailleurs à ce moment cinétique intrinsèque un moment magnétique de spin directement proportionnel à  $P$  via le rapport gyromagnétique  $\gamma$  :

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{P} \quad (\text{I.4.3})$$

Lorsque  $\gamma$  est positif, le moment cinétique intrinsèque et le moment magnétique de spin sont orientés dans la même direction, tandis que  $\gamma < 0$  induit une orientation antiparallèle du moment magnétique par rapport au moment angulaire intrinsèque. En l'absence de champ magnétique, les spins sont orientés de manière aléatoire et discrétisée dans toutes les directions.

L'application d'un champ magnétique externe  $B_0$  entraîne un mouvement de précession des spins autour de l'axe de  $B_0$  et une énergie magnétique est acquise, définie par la relation suivante :

$$Em = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 = -\mu_z \cdot B_0 = -\gamma \frac{\hbar}{2\pi} m B_0 \quad (\text{I.4.4})$$

L'application d'un champ magnétique  $B_0$  a alors pour effet la levée de dégénérescence des niveaux d'énergie, i.e. l'état fondamental d'énergie occupé par les spins se subdivise en  $2I+1$  niveaux. Ce phénomène est appelé effet Zeeman anomal. Dans le cas des noyaux présentant un spin égal à  $\frac{1}{2}$ , on obtient deux subdivisions de l'état fondamental :

$$E_{1/2} = -\frac{1}{2} \gamma \frac{\hbar}{2\pi} B_0 \quad (\text{I.4.5a})$$

$$E_{-1/2} = \frac{1}{2} \gamma \frac{\hbar}{2\pi} B_0 \quad (\text{I.4.5b})$$

Dans ce cas, le niveau d'énergie le plus bas,  $E_{1/2}$ , correspond aux spins dont le moment magnétique est orienté parallèlement à  $B_0$ , tandis que le plus haut niveau d'énergie  $E_{-1/2}$  est occupé par des spins dont le moment magnétique est antiparallèle à  $B_0$ . La condition de résonance permettant aux particules d'effectuer la transition d'un bas niveau d'énergie à un haut niveau d'énergie est remplie lorsque l'énergie fournie au système correspond exactement à la différence d'énergie entre les deux états discrets :

$$\Delta_E = \gamma \frac{\hbar}{2\pi} B_0 \quad (\text{I.4.6})$$

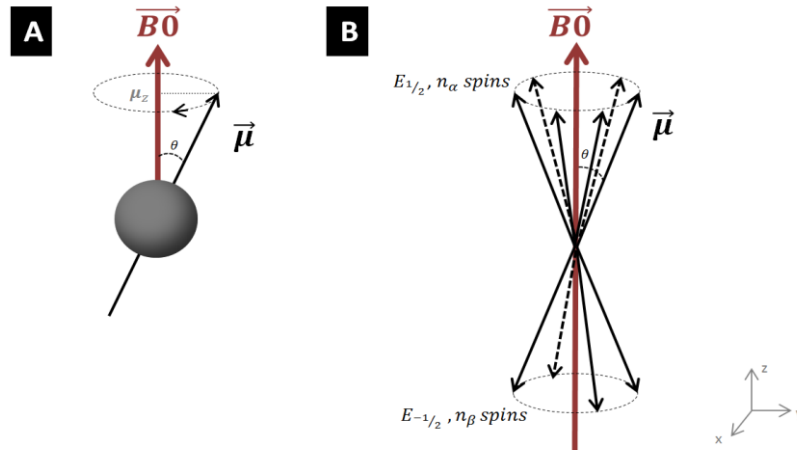
On définit donc à partir de cette relation la fréquence de résonance du système :

$$\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (\text{I.4.7})$$

Cette expression correspond à la fréquence de Larmor qui repose au cœur de toute expérience de RMN : il est possible de manipuler l'aimantation d'un groupe de spins plongés dans un champ magnétique par l'action d'une onde électromagnétique oscillant à la fréquence de Larmor. On remarque ici que les noyaux de spins nuls ne peuvent être sujets à l'effet Zeeman, et donc donner lieu à un signal RMN. C'est le cas de tous les isotopes possédant un nombre de masse et un nombre de charge pairs (par exemple,  $^{16}\text{O}$  ou  $^{12}\text{C}$ ).

L'énergie thermique induite par la température  $T$  empêche cependant une relaxation complète des moments magnétiques et ceux-ci ne peuvent être complètement alignés avec  $B_0$ . Chaque

moment magnétique individuel décrit à la place un angle  $\theta$  par rapport à  $B_0$  égal à  $\cos^{-1}\left(\frac{m}{\sqrt{I(I+1)}}\right)$ . A l'équilibre thermique les spins sont donc distribués de façon aléatoire, décrivant un cône autour de l'axe de  $B_0$  (cf **Figure I-5** extraite de la référence (72)). A l'échelle macroscopique, la composante transverse du moment magnétique net total est par conséquent nulle car les moments magnétiques individuels s'annulent entre eux.



**Figure I-5 :** A) Le moment magnétique  $\vec{\mu}$  décrit un angle  $\theta$  par rapport à  $\vec{B}_0$ . B) Le niveau d'énergie parallèle à  $\vec{B}_0$  ( $n_\alpha$ ) est légèrement plus peuplé que le niveau d'énergie antiparallèle ( $n_\beta$ ). A l'équilibre, la composante transverse de la magnétisation est nulle car les spins s'annulent entre eux et l'intensité de  $M_0$  ne dépend que de la différence de peuplement des niveaux d'énergie haut et bas ( $n_\alpha - n_\beta$ ) Adaptée de la référence (72).

L'aimantation macroscopique  $M_0$  de l'échantillon est par conséquent seulement définie par la magnétisation selon l'axe z. L'intensité de  $M_0$  dépend alors directement de la différence de population entre les niveaux de basse ( $n_\alpha$ ) et haute énergies ( $n_\beta$ ) multipliée par la norme du moment magnétique de chaque spin selon  $B_0$  :

$$M_0 = (n_\beta - n_\alpha) \times \mu_z = (n_\beta - n_\alpha) \times \frac{\gamma\hbar}{2\pi} \times \frac{1}{2} \quad (\text{I.4.8})$$

Le ratio de peuplement des états d'énergie est par ailleurs donné par la statistique de Maxwell-Boltzmann :

$$\frac{n_\alpha}{n_\beta} = e^{\Delta E/kT} \quad (\text{I.4.9})$$



Où  $k$  est la constante de Boltzmann. En combinant les équations I.4.8 et I.4.9, et en considérant que  $\Delta E \ll kT$ , l'intensité de l'aimantation longitudinale  $M_0$ , dans le cas d'un spin  $\frac{1}{2}$ , peut finalement s'écrire selon l'expression suivante :

$$M_0 = \left(\frac{\gamma h}{2\pi}\right)^2 \frac{nB_0}{4kT} \quad (\text{I.4.10})$$

Où  $n = n_\alpha + n_\beta$ , le nombre de spins présents dans l'échantillon.

Il peut être déduit de cette équation que l'intensité de  $M_0$  augmente avec l'intensité du champ magnétique externe  $B_0$ . De plus, la dépendance quadratique au rapport gyromagnétique implique que des noyaux possédant des rapports gyromagnétiques élevés seront à l'origine d'un signal RMN plus intense.

L'application dans le plan transverse d'une impulsion radiofréquence  $B_1$  correspondant à la fréquence de Larmor a pour effet de faire basculer l'aimantation avec un angle de nutation  $\theta$  dépendant directement de l'intensité et de la forme de  $B_1$ :

$$\theta = \gamma \int_0^{T_p} B_1(t) dt \quad (\text{I.4.11})$$

On a donc  $\theta = \gamma B_1 T_p$  pour une impulsion classique de profil carré,  $T_p$  correspondant à la durée de l'impulsion. Une fois basculés dans le plan transverse, les spins subissent des inhomogénéités locales de champ magnétique couplées à de possibles interactions dipolaires avec les spins voisins. Ces phénomènes entraînent une perte progressive de leur cohérence de phase (relaxation  $T_2$ ). La repousse longitudinale de l'aimantation est quant à elle gouvernée par le transfert de l'énergie acquise par les spins lors de l'excitation RF aux noyaux environnants de plus basse énergie (relaxation  $T_1$ ).

La précession de l'aimantation dans le plan transverse à la fréquence de Larmor induit une force électromotrice dans une antenne placée en réception. Ce signal est caractérisé par une décroissance exponentielle au cours du temps résultant du retour progressif de l'aimantation à l'état d'équilibre. On parle alors décroissance d'induction libre (fid).

Finalement, l'évolution de l'aimantation macroscopique peut être modélisée par les équations de Bloch (ici dans le référentiel du laboratoire) (73) :

$$\frac{dM_x(t)}{dt} = \gamma [M_y(t)B_{1z}(t) - M_z(t)B_{1y}(t)] - \frac{M_x(t)}{T_2} \quad (\text{I.4.12a})$$

$$\frac{dM_y(t)}{dt} = \gamma[M_z(t)B_{1x}(t) - M_x(t)B_{1z}(t)] - \frac{M_y(t)}{T_2} \quad (\text{I.4.12b})$$

$$\frac{dM_z(t)}{dt} = \gamma[M_x(t)B_{1y}(t) - M_y(t)B_{1x}(t)] + \frac{M_0 - M_z(t)}{T_1} \quad (\text{I.4.12c})$$

#### I.4.ii. LE DEPLACEMENT CHIMIQUE OU COMMENT DISTINGUER LES MOLECULES EN RMN

Le nuage électronique formé à l'échelle atomique ou moléculaire possède des propriétés de susceptibilité diamagnétique : en réponse à l'action du champ magnétique externe  $B_0$ , les électrons induisent un champ magnétique qui interfère directement avec le champ magnétique principal, formant ainsi un « écran » venant s'opposer à  $B_0$ . Le champ magnétique effectif perçu par le noyau - ou un groupe fonctionnel donné au sein d'une molécule- correspond donc à :

$$B_{eff} = B_0(1 - \sigma) \quad (\text{I.4.13})$$

On définit  $\sigma$  la constante d'écran induite par le nuage électronique. Une molécule sera par conséquent d'autant plus « blindée » que  $\sigma$  sera élevée. Chaque molécule possède une structure électronique qui lui est propre en fonction de la configuration des différents atomes et liaisons chimiques la composant. Il en résulte une combinaison unique d'une ou plusieurs résonances due(s) à la ou aux constantes d'écran associées. Ce phénomène confère à une molécule donnée une « signature » RMN unique et sa fréquence de résonance effective est alors égale à :

$$\omega_{eff} = \gamma B_{eff} \quad (\text{I.4.14})$$

Dans un contexte biologique, ce phénomène permet de discriminer et quantifier de manière non invasive des métabolites présents dans un voxel d'intérêt.

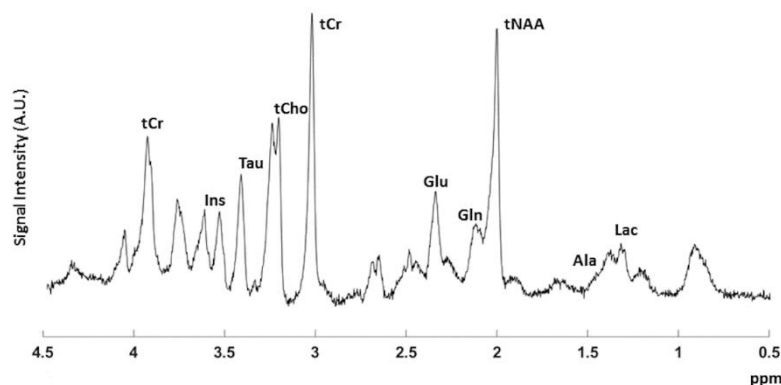
Il est intéressant de définir une échelle indépendante de  $B_0$  qui représente le déplacement chimique  $\delta$  en partie par million (ppm) :

$$\delta = \frac{10^6(\omega_{eff} - \omega_{TMS})}{\omega_{ref}} \quad (\text{I.4.15})$$

$\omega_{ref}$  correspond ici à la fréquence de résonance du spectromètre. Le tétraméthylsilane (TMS) est une molécule extrêmement blindée souvent arbitrairement choisie comme molécule résonnant à 0 ppm. On peut remarquer ici que la valeur du décalage en fréquence augmente avec  $B_0$ , permettant par conséquent des mesures plus résolues à haut champ. A 11.7 T, la fréquence de Larmor du spectromètre est égale à 498.15 MHz, ce qui correspond à des

déplacements chimiques couvrant une plage de fréquences de l'ordre de  $10^2 - 10^3$  Hz. Pour un noyau donné, plus  $\sigma$  est faible, plus la fréquence de résonance effective  $\omega_{\text{eff}}$  est élevée. Le déplacement chimique en ppm est donc d'autant plus important et se décale alors vers la partie « downfield » du spectre.

Dans le contexte de cette thèse, nous nous intéressons à la spectroscopie  $^1\text{H}$  des métabolites cérébraux (cf **Figure I-6**) dont les résonances sont comprises entre 0.5 et 4.5 ppm (partie « up field » du spectre). L'eau résonne quant à elle à 4.7 ppm. Il a par ailleurs été expérimentalement démontré que la température expérimentale possède un effet non négligeable sur les déplacements chimiques des métabolites (74). Enfin, le pH influence également le déplacement chimique, ce qui peut compliquer l'identification des résonances d'un échantillon à l'autre lors d'expériences *in vitro*. Cet effet a été initialement mis à profit en spectroscopie du  $^{31}\text{P}$  par Moon et Richards afin de déterminer le pH intracellulaire des érythrocytes (75).



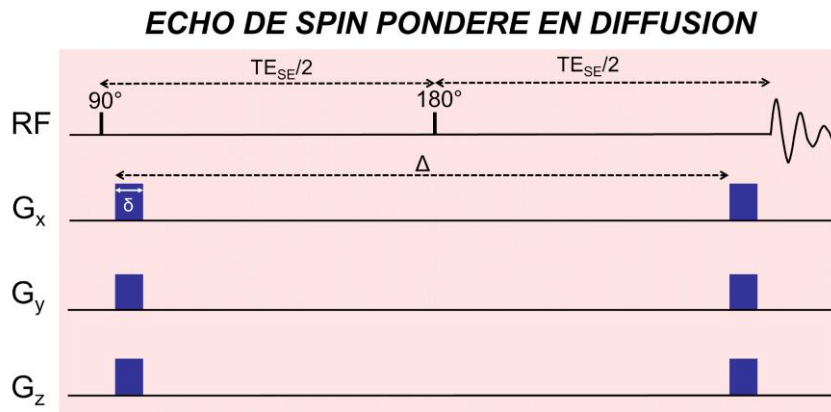
**Figure I-6 : Exemple d'un spectre RMN  $^1\text{H}$  acquis dans un voxel positionné autour de l'hippocampe chez la souris à 11.7 T**

#### I.4.iii. PRINCIPE DE LA PONDERATION EN DIFFUSION

La première séquence pondérée en diffusion, appelée méthode des gradients pulsés, a été mise au point par Stejskal et Tanner en 1965 (76). Elle consiste en l'incorporation d'une paire de gradient de diffusion au sein d'une séquence écho de spin (voir **Figure I-7**).

L'application du premier gradient induit une phase pour chaque spin en fonction de leur position dans l'échantillon. Les spins diffusent ensuite durant un temps de mélange  $\Delta$  avant l'application d'un second gradient, d'intensité et de durée identiques au premier, permettant ainsi d'inverser l'encodage de phase. Dans le cas des spins stationnaires, la phase s'annule parfaitement sous l'effet des deux gradients successifs. En revanche, les molécules porteuses de spins accumulent une phase supplémentaire due aux déplacements sous l'effet de la diffusion. Dans ce cas, leur

position finale  $r_f$  est différente de leur position initiale  $r_0$  et l'application du second gradient de diffusion n'aura pas pour effet de rétablir entièrement la cohérence de phase dans le plan transverse. La pondération en diffusion entraîne par conséquent une baisse de l'intensité du signal d'autant plus marquée que les déplacements quadratiques moyens effectués par l'ensemble des particules mesurées sont importants.



**Figure I-7 : Schéma d'une séquence écho de spin pondérée en diffusion. Une impulsion  $90^\circ$  permet de basculer l'aimantation dans le plan transverse. L'application d'un premier gradient de diffusion de durée  $\delta$  encode la position des spins. Ces derniers parcourent leur environnement sous l'effet de la diffusion avant l'application d'un second gradient après une durée  $\Delta$ . La phase étant ici inversée par l'impulsion de refocalisation, il n'est pas nécessaire d'inverser la polarité du second gradient de diffusion.**

#### I.4.iv. APPROXIMATION DES GRADIENTS COURTS

L'approximation des gradients courts considère que tous les déplacements s'effectuent en dehors de la durée d'application des gradients de diffusion ( $\delta \ll \Delta$ ). Dans ce cas, la phase induite lors de l'application du gradient de diffusion est égale à l'expression suivante :

$$\phi(t) = \int_0^\delta \gamma \vec{g}(t) \vec{r} dt \quad (\text{I.4.16})$$

Dans le cas d'un gradient de forme carrée d'intensité  $G$ , la phase initiale est  $\phi_0 = \gamma G \vec{r}_0 \delta$  tandis que la phase finale est égale à  $\phi_f = \gamma G \vec{r}_f \delta$ . L'écart de phase correspond donc à l'expression suivante :

$$\Delta\phi = \phi_f - \phi_0 = \gamma G (\vec{r}_f - \vec{r}_0) \delta \quad (\text{I.4.17})$$

L'atténuation du signal résulte de la somme non cohérente des phases accumulées par les  $N_s$  spins de l'échantillon :

$$\frac{S}{S_0} = \frac{1}{N_s} \sum_{p=1}^{N_s} e^{i\phi_p} \quad (\text{I.4.18})$$

Le passage à la limite continue donne :

$$\frac{S}{S_0} = \iint_{-\infty}^{+\infty} e^{i\gamma \vec{g}(\vec{r}_f - \vec{r}_0) \delta} \times P(\vec{r}/\vec{r}_0, t) d\vec{r} d\vec{r}_0 \quad (\text{I.4.19})$$

Si on considère le propagateur de diffusion Gaussien tel que défini par l'équation I.3.1, on obtient :

$$\frac{S}{S_0} = e^{-\gamma^2 G^2 \delta^2 \Delta D} \quad (\text{I.4.20})$$

On définit par ailleurs la pondération en diffusion  $b$  :

$$b = \gamma^2 G^2 \delta^2 \Delta \quad (\text{I.4.21})$$

Ainsi, on obtient finalement :

$$\frac{S}{S_0} = e^{-bD} \quad (\text{I.4.22})$$

#### I.4.v. PRISE EN COMPTE DE LA DIFFUSION DANS LES EQUATIONS DE BLOCH

En 1956, Torrey généralise les équations de Bloch afin d'y incorporer les effets de la diffusion (isotropique, non encombrée) de l'aimantation, permettant ainsi de prendre en compte tous les gradients présents dans la séquence en fonction de leur expression générale (73). L'évolution de l'aimantation transversale s'écrit alors de la façon suivante (les termes liés à la relaxation sont ici négligés) :

$$\frac{\partial \overline{M}_{xy}(\vec{r}, t)}{\partial t} = \overline{M}_{xy}(\vec{r}, t) \times \gamma (B_0 + \vec{g}(t) \cdot \vec{r}) + D \Delta \overline{M}_{xy}(\vec{r}, t) \quad (\text{I.4.23})$$

Le premier terme de l'équation exprime le couple exercé par le champ magnétique sur l'aimantation macroscopique en prenant compte de l'action supplémentaire des gradients de diffusion tandis que le second terme exprime la vitesse de dérive acquise par les particules sous l'effet de la diffusion.

La solution de l'équation ci-dessus s'écrit alors :

$$\overrightarrow{M_{xy}}(\vec{r}, t) = M_0 e^{-i(\int_0^t g(t') dt') \cdot \vec{r}} e^{-\gamma^2 D \int_0^t [\int_0^{t'} \bar{g}(t'') dt'']^2 dt'} \quad (\text{I.4.24})$$

A l'écho, l'écriture de cette expression se simplifie néanmoins car l'intégrale de G(t) est nulle. On peut de plus définir le moment d'ordre zéro k :

$$k(t) = \gamma \int_0^t g(t') dt' \quad (\text{I.4.25})$$

L'évolution temporelle de l'aimantation transversale en fonction des positions s'écrit alors :

$$\overrightarrow{M_{xy}}(\vec{r}, t) = M_0 e^{(-D \int_0^t \bar{k}^2 dt')} \quad (\text{I.4.26})$$

On peut écrire par ailleurs l'expression de  $M_{xy}$  de la façon suivante :

$$\overrightarrow{M_{xy}}(\vec{r}, TE) = M_0 e^{-bD} \quad (\text{I.4.27})$$

On trouve alors que l'expression générale de la pondération en diffusion b correspond à l'intégrale du carré du moment des gradients :

$$b = \int_0^t k(t')^2 dt' \quad (\text{I.4.28})$$

Dans le cas de l'expérience de Stejskal-Tanner (76) pour des gradients d'impulsions carrées d'intensité G et de durée  $\delta$ ,  $b = \gamma^2 G^2 \delta^2 t_d$ , avec  $t_d = \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)$ . Par conséquent l'atténuation du signal s'écrit :

$$\ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = -\gamma^2 G^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) D \quad (\text{I.4.29})$$

Enfin, on peut remarquer que l'expression de b telle que définie dans l'équation **I.4.23** met en avant l'apparition de termes croisés lorsque d'autres gradients (i.e. gradients de sélection de l'aimantation) sont présents dans la séquence (cf **Section II.2.iii.b**).

## **I.5. DEVOILER LA MICROSTRUCTURE CELLULAIRE GRACE A DES OUTILS DE RMN PONDERES EN DIFFUSION**

### **I.5.i. SENSIBILITE A LA RESTRICTION ET IMAGERIE Q-SPACE**

Aux faibles valeurs de  $b$ , l'atténuation du signal résulte principalement de déplacements de spins dont la diffusion plus rapide et peu restreinte survient dans des structures telles que le corps cellulaire ou bien l'espace extracellulaire. A l'instar de la diffusion libre, les mesures aux faibles valeurs de  $b$  sont par conséquent caractérisées par une atténuation monoexponentielle du signal. L'augmentation progressive de la valeur de  $b$  a pour effet d'affiner la grille d'encodage des déplacements des spins. La mesure est alors sensible à des déplacements effectués sur de plus courtes distances, traduisant ainsi une sensibilité accrue à des éléments de la microstructure restreignant fortement la diffusion, tels que le diamètre des fibres cellulaires, la présence d'épines dendritiques ou de feuilletts astrocytaires. L'atténuation du signal s'écarte alors d'un comportement monoexponentiel.

Il est possible de récupérer des informations sur la restriction grâce à l'acquisition du  $q$ -space. Cette technique, introduite par Callaghan et collègues (77), considère plusieurs pools de molécules d'eau aux propriétés de diffusion distinctes et présentant peu d'échanges entre les différentes populations. Il est possible de rendre compte d'un contraste lié à la restriction dans des structures pseudopériodiques en posant :

$$q = \frac{\gamma \delta G}{2\pi} \quad (\text{I.5.1})$$

L'atténuation du signal peut alors être reliée à la fonction de probabilité des déplacements par l'équation suivante :

$$E_{\Delta}(q) = \int P(R, \Delta) \exp(i2\pi q \cdot R) dR \quad (\text{I.5.2})$$

Avec  $R = r-r_0$ . Il est alors possible d'obtenir le profil de distribution des déplacements en effectuant la transformée de Fourier de l'atténuation du signal en fonction de  $q$ . Afin d'être sensible à la restriction, il est par ailleurs nécessaire que le temps de diffusion soit suffisamment long pour que les particules puissent sonder les limites/parois de l'échantillon (78). Cela se traduit mathématiquement par la condition suivante :

$$t_d \gg \frac{a^2}{2D} \quad (\text{I.5.3})$$

Avec  $a$  la taille de l'échantillon. Dans des échantillons pseudopériodiques, la probabilité que les particules reviennent à leur position d'origine augmente après qu'elles ont rencontré une paroi de l'échantillon. Il en résulte un phénomène de diffraction de l'atténuation du signal en fonction de  $qa$ . La résolution du  $q$ -space est cependant directement inversement proportionnelle à l'intensité des gradients de diffusion. L'eau étant principalement restreinte dans des structures de taille micrométrique souvent inférieure à  $10 \mu\text{m}$ , il est nécessaire d'appliquer des gradients très intenses afin de rendre compte des déplacements survenant à cette échelle de distance.

En conditions biologiques, les tissus ne constituent pas un échantillon pseudopériodique mais contiennent une variété de structures présentant des dimensions et orientations diverses. Le phénomène de diffraction de l'atténuation du signal en fonction de  $qa$  n'est alors plus visible. On observe en revanche une atténuation non-monoexponentielle du signal qui peut être analysée par un ajustement des données à une fonction multi-exponentielle reflétant la contribution des différents pools de molécules présentant propriétés de diffusion distinctes. Cette approche nécessite cependant de prendre une décision arbitraire concernant le nombre de pools à considérer.

#### I.5.ii. MESURE EXPERIMENTALE DE L'ADC

D'après l'Equation I.4.29, le coefficient de diffusion libre  $D$  peut être exprimé de la façon suivante :

$$D = -\frac{1}{b} \ln\left(\frac{S}{S_0}\right) \quad (\text{I.5.4})$$

Nous avons vu dans la **Section I.3.ii** que la diffusion en conditions biologiques n'est pas libre mais anormale et notamment caractérisée par des phénomènes de viscosité, de tortuosité et de restriction. L'Equation I.5.4 reste cependant valide pour estimer l'ADC aux faibles valeurs de  $b$  pour lesquelles nous ne sommes pas sensibles à la restriction. L'ADC peut donc être expérimentalement mesuré en effectuant une régression linéaire sur les valeurs du logarithme de l'atténuation du signal en fonction de  $b$ .

#### I.5.iii. IMAGERIE DU TENSEUR DE DIFFUSION

L'imagerie du tenseur de diffusion (DTI), proposé par Basser et al (79), a non seulement pour but de cartographier la diffusivité moyenne dans les différentes structures du cerveau mais également d'identifier les directions dominant localement le phénomène de diffusion au sein



des tissus (diffusion isotrope versus diffusion anisotrope). Cette approche se base sur le fait qu'il est possible de décomposer la diffusion en trois composantes dont les directions et amplitudes associées décrivent un ellipsoïde orienté dans n'importe quelle direction de l'espace. En DTI, on considère que l'atténuation du signal correspond alors à l'expression suivante :

$$S_k = S_0 e^{-b g_k^T D g_k} \quad (\text{I.5.5a})$$

Avec :

$$g_k = [G_x \ G_y \ G_z] \quad (\text{I.5.5b})$$

Et

$$D = \begin{bmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{bmatrix} \quad (\text{I.5.5c})$$

L'écriture du tenseur de diffusion D permet de consigner mathématiquement les valeurs des coefficients de diffusion en fonction des différentes directions. On peut noter ici que cette matrice est par essence symétrique. Par conséquent, six mesures directionnelles sont expérimentalement nécessaires afin de reconstruire le tenseur. Après diagonalisation, les valeurs propres du tenseur de diffusion permettent alors de calculer des métriques caractérisant la diffusion pour chaque pixel de l'image. Plus précisément, la première valeur propre caractérise la diffusion axiale dans le cas de fibres ou, de façon plus générale, la diffusion le long d'une direction principale définie par le premier vecteur propre. Les deuxième et troisième valeurs propres reflètent quant à elles la diffusion radiale (dans le cas de fibres), i.e. la diffusion survenant dans un plan orthogonal au premier vecteur propre. La diffusivité moyenne (MD) est définie par la moyenne des trois valeurs propres. Le degré d'anisotropie de la diffusion au sein d'un pixel, ou anisotropie fractionnelle (FA), se calcule selon la formule suivante :

$$FA = \sqrt{\frac{((\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_1 - \lambda_3)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2)}{(\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2)}} \quad (\text{I.5.6})$$

On peut constater que la FA est de fait comprise entre 0 et 1. Lorsque les trois valeurs propres sont similaires, la FA tend vers 0, reflétant ainsi une diffusion isotrope. *A contrario*, la FA se rapproche de 1 pour  $\lambda_1$  très grand devant  $\lambda_2$  et  $\lambda_3$ , ce qui est caractéristique d'une diffusion anisotrope.

Les mesures de DTI sont effectuées à des valeurs de pondération en diffusion relativement faibles et par conséquent, on considère *a priori* que la diffusion ne dévie pas de l'approximation gaussienne sur laquelle repose l'équation de Stejskal-Tanner. En d'autres termes, la sensibilité à un possible phénomène de restriction n'est pas prise en compte. L'imagerie du kurtosis propose de quantifier la déviation du comportement purement gaussien de l'atténuation du signal en présence de restriction à des valeurs de  $b$  légèrement plus élevées en utilisant l'expansion de Taylor de l'équation I.4.29 (80). Cette approche n'a cependant pas été employée au cours de ce travail de thèse.

Enfin, un problème supplémentaire est posé par le fait que les mesures de DTI restent insensibles aux croisements de fibres survenant au sein d'un voxel. La mesure étant moyennée sur la population de spins présents dans un voxel, la FA réelle au sein de fibres individuelles peut être potentiellement masquée par des croisements de fibre ou des embranchements dont la présence a pour effet de diminuer cette métrique.

*Dans le contexte de cette thèse, des mesures de DTI ont été principalement effectuées dans le chapitre V de ce manuscrit.*

#### I.5.iv. MODELISATION DE LA MICROSTRUCTURE

##### **a. DIFFERENTS MODELES**

Afin d'aller au-delà de l'analyse multi-exponentielle des données et de considérer l'hétérogénéité microstructurale au sein d'un même voxel, différents modèles ont été proposés afin d'extraire des paramètres quantitatifs de la microstructure cellulaire. Cette approche décompose les différents aspects de la microstructure en compartiments modélisés par des formes géométriques simplifiées desquelles peuvent être déduites une expression analytique régissant le phénomène de diffusion. Il ne sera pas fait ici d'une revue exhaustive des différents modèles utilisés dans la littérature (se référer à la revue d'Alexander et al (28)), mais seulement mention de quelques exemples à titre indicatif.

Entre autres, le modèle de Stanisz considère trois compartiments, i.e. neuronal, glial et extracellulaire, respectivement modélisés par des sphères, des ellipsoïdes et un modèle de tortuosité afin d'analyser la diffusion dans le nerf optique bovin (81). Le modèle « ball & stick » propose de modéliser la substance blanche par des cylindres parallèles de diamètre nul (« stick ») tandis que la diffusion dans l'ECS est décrite par un tenseur de diffusion isotrope (« ball ») (82). Le modèle CHARMED propose une modélisation plus complexe de la diffusion

axonale qui rend compte à la fois de la restriction et de la tortuosité tout en considérant des cylindres de rayon non-nul générés selon une distribution  $\Gamma$ , établissant ainsi des paramètres de diffusivité axiale  $D_{\parallel}$  et radiale  $D_{\perp}$ . La diffusion dans l'ECS est quant à elle modélisée par un tenseur de diffusion (83). Enfin, le modèle NODDI vise à prendre en compte plus précisément l'orientation et de la densité des fibres ainsi que leur dispersion dans l'espace. La tortuosité est également prise en compte pour caractériser la diffusion extra-axonale (84).

## **b. LIMITATIONS**

Certains modèles peuvent s'avérer plus appropriés que d'autres en fonction de la composition tissulaire de la région cérébrale étudiée, i.e. substance blanche ou substance grise. Cette approche repose dans tous les cas sur la formulation *a priori* d'hypothèses fortes concernant la microstructure dont la validation expérimentale demeure cependant compliqué. Ces *a priori* considèrent le plus souvent des cellules neuronales comme essentiellement constitués de longs axones tels que présents dans la substance blanche. Modéliser les fibres axonales par des cylindres infinis peut cependant s'avérer être une simplification trop drastique ignorant la présence d'ondulations, d'embranchements ou encore d'épines dendritiques (85). Cette représentation ne reflète pas non plus de façon réaliste la morphologie des cellules gliales. De plus, les échanges d'eau entre les compartiments intra- et extracellulaires ne peuvent être totalement ignorés (86) tandis que la perméabilité des membranes cellulaires tend quant à elle à augmenter en conditions pathologiques, remettant en cause la validité d'un modèle basé sur des compartiments totalement hermétiques (87,88). En outre, chaque compartiment se voit pondéré par ses propriétés intrinsèques de relaxation, induisant un biais sur les contributions respectives de chaque compartiment à l'atténuation totale du signal (89). Enfin, les propriétés de diffusion de l'ECS doivent encore être expérimentalement clarifiées afin d'affiner les modèles.

## **c. SIMULATIONS NUMERIQUES**

Des approches par simulations ont été adoptées afin d'étudier plus précisément l'influence de paramètres plus fins de la microstructure sur le signal de diffusion. Les équations de Bloch peuvent être résolues dans des cas de figure précis grâce à la méthode des éléments finis (90,91). Une seconde approche consiste par ailleurs à effectuer des simulations de Monte Carlo dans des modèles réalistes de cellules neuronales et gliales (92). Dans ce cas, il ne s'agit pas de proposer une formule analytique du signal : la diffusion d'un grand nombre  $N$  de particules piégées au sein du substrat est numériquement simulée. A chaque pas de simulation, les coordonnées dans

l'espace de chaque particule sont mises à jour afin de calculer la phase accumulée à chaque déplacement. L'intensité du signal peut ensuite être facilement calculée à partir de l'ensemble des trajectoires des N particules simulées. Il est alors possible de simuler une bibliothèque de signaux à partir d'une base de cellules synthétiques générées pour différentes valeurs de paramètres structuraux (longueur et diamètre des fibres, diamètre du corps cellulaire, nombre d'embranchements, etc). Les données expérimentales peuvent être *a posteriori* ajustées aux signaux synthétiques ainsi obtenus afin de déterminer les valeurs des paramètres précédemment mentionnés. Ces approches demeurent cependant gourmandes en termes de puissance de calcul et il est nécessaire d'optimiser le processus de simulation, en recourant notamment à la programmation parallèle sur GPU (93,94).

## I.5.v. DIFFUSION DES METABOLITES : QUELLE MESURE POUR QUEL PARAMETRE DE LA MICROSTRUCTURE ?

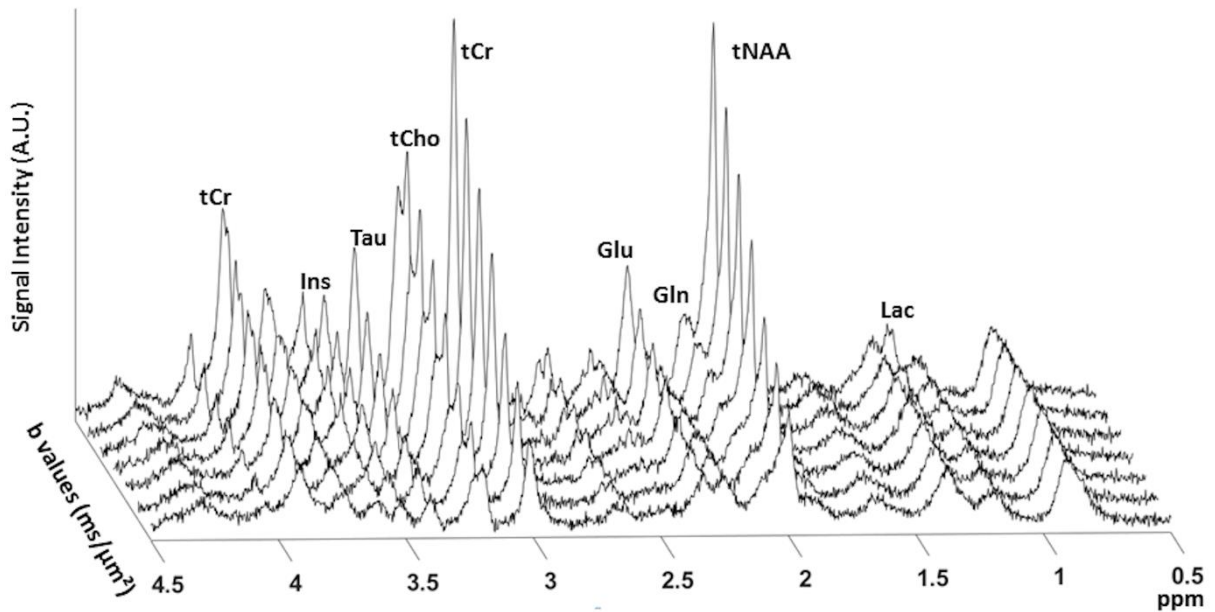
### a. SPECTROSCOPIE RMN PONDEREE EN DIFFUSION

Nous avons vu que la nature ubiquitaire de l'eau complique grandement l'analyse du signal de diffusion car celui-ci reflète la diffusion au sein de compartiments aux propriétés différentes. A l'instar des mesures en DW-MRI, il est également possible de mesurer la diffusion des métabolites cérébraux grâce à des outils de DW-MRS. Cette approche offre l'avantage d'un signal de diffusion plus spécifique car les métabolites cérébraux sont quant à eux majoritairement localisés dans les cellules et offrent ainsi la possibilité de sonder plus spécifiquement la microstructure de l'ICS. En outre, certains métabolites constituent des marqueurs plus ou moins spécifiques d'un type cellulaire donné, i.e. cellules neuronales vs cellules gliales (95,96). Ce gain de spécificité aux compartiments neuronal et glial est néanmoins obtenu au détriment de la résolution spatiale car il est alors nécessaire d'acquérir le signal sur de plus gros voxels afin de compenser la concentration bien plus faible des métabolites (de l'ordre du mM) par rapport à celle de l'eau.

Bien que la diffusion des métabolites soit restreinte au sein des cellules, de nombreuses questions se posent quant à la nature précise de ce confinement : les métabolites sont-ils piégés dans des organelles, ou bien diffusent-ils librement dans le cytosol ? Peuvent-ils faire l'objet d'un transport transmembranaire actif ? Peut-on être sensible à des protrusions telles que les épines dendritiques ? Quid de la présence d'embranchements ou de possibles ondulations des fibres cellulaires ? Différentes approches expérimentales (détaillées ci-dessous) permettent de répondre en partie à ces questions.

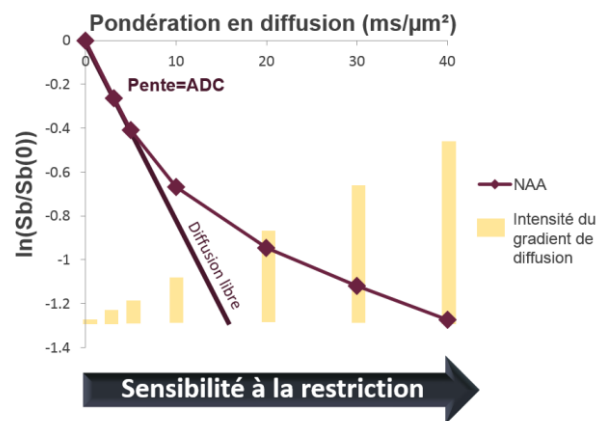
### b. MESURE AUX HAUTES VALEURS DE B

A l'instar de l'imagerie q-space, la pondération en diffusion peut être graduellement augmentée via l'application de gradients de diffusion de plus en plus intenses. On part alors de mesure aux hautes valeurs de b (cf **Figure I-8**).



**Figure I-8 :** Jeu de données pondérées en diffusion (jusqu'à  $b= 50 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ) acquises chez la souris à 11.7 T.

Ainsi qu'expliqué dans la **Section I.5.i**, la sensibilité à la restriction augmente progressivement avec l'intensité de la pondération en diffusion  $b$ . Il en résulte une déviation du régime d'atténuation monoexponentielle du signal de diffusion à mesure que l'on s'éloigne d'un comportement de diffusion libre, ainsi qu'illustré en **Figure I-9**. La modélisation de ce comportement pour les différents métabolites intracellulaires permet de quantifier des aspects de la morphologie cellulaire induisant une forte restriction, telle que le diamètre des fibres. Pour les métabolites en conditions *in vivo*, le régime linéaire est observé pour des valeurs de  $b$  inférieures à  $5 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ .



**Figure I-9 :** Logarithme de l'atténuation du signal du NAA en fonction de la pondération en diffusion. En présence de restriction, l'atténuation du signal s'éloigne rapidement d'un comportement mono-exponentiel à mesure que  $b$  augmente.

Les mesures pionnières de Cohen et Assaf effectuées *ex vivo* dans des tissus cérébraux prélevés chez le rat montrent dès 1997 cette atténuation non-monoexponentielle du signal (97). Des mesures complémentaires dans le nerf optique bovin excisé confirment ce phénomène pour les trois métabolites principaux (tNAA, tCho et tCr) (98). Les données sont par la suite ajustées à un modèle bi-exponentiel, mettant ainsi en avant deux pools de métabolites aux propriétés de diffusion distinctes, respectivement caractérisés par un ADC rapide et un ADC plus lent. En 2004, Kroenke *et al* mesurent la diffusion du NAA en fonction de  $b$  chez le rat (99). Leur analyse met en avant que la diffusion du NAA dans le corps calleux est fortement anisotrope, suggérant que les déplacements surviennent quasi-exclusivement le long des fibres cellulaires.

L'étude de Palombo *et al* vient confirmer cette observation (100). En effet, la comparaison des données de diffusion à hautes valeurs de  $b$  (issues de l'étude de Ligneul *et al* (101)) au modèle des neurites (i.e. un modèle de cylindres orientés de façon isotropes dans l'espace) permet d'estimer le diamètre des fibres  $d_{\text{fibre}}$  ainsi que le coefficient de diffusion intracellulaire  $D_{\text{intra}}$  pour les différents métabolites dans des gammes de valeurs cohérentes avec le reste de la littérature ( $d_{\text{fibre}} = 1-3 \mu\text{m}$  et  $D_{\text{intra}} = 0.3-0.45 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ ). Une exception notable est celle du NAA pour lequel  $d_{\text{fibre}} \approx 0 \mu\text{m}$ . Une correction des données prenant en compte une sous-population de NAA fortement restreinte et avec un  $T_2$  court, dans les mitochondries ou dans la myéline, permet de corriger le problème.

L'effet de la présence d'épines dendritiques ou feuilletts astrocytaires de densité  $\Phi$  et de longueur  $l$  sur les données acquises à hautes valeurs de  $b$  a également été caractérisé par Palombo *et al* (102). Dans ce cas, la géométrie de ces structures impacte grandement l'atténuation du signal en fonction de  $b$  : l'atténuation du signal est d'autant moins marquée que  $\Phi$  et  $l$  sont élevés, ce qui est cohérent avec une diffusivité réduite en raison de la présence d'un plus grand nombre d' « obstacles » venant entraver la diffusion le long des fibres. Il est également intéressant de distinguer ici les diffusivités axiales et radiales. L'atténuation du signal parallèle à l'axe de la fibre dévie grandement du comportement Gaussien, à mesure que  $\Phi$  et  $l$  sont augmentés, ce qui supporte l'idée que la diffusivité axiale est fortement sensible à la restriction induite la présence de structures secondaires. De façon assez intuitive, la diffusivité radiale augmente quant à elle progressivement avec  $\Phi$  et  $l$ , reflétant un espace plus « étendu » dans cette direction. Il en résulte une sur-estimation de  $d_{\text{fibre}}$  couplée à une sous-estimation de  $D_{\text{intra}}$ . Par conséquent, on peut noter ici que l'absence de prise en compte de structures secondaires le long des fibres cellulaires peut mener à une mauvaise estimation de  $d_{\text{fibre}}$ , et ce pour des variations physiologiques des paramètres  $\Phi$  et  $l$ .

L'un des désavantages majeurs présentés par les mesures à hautes valeurs de  $b$  est la forte réduction du rapport signal sur bruit (SNR) associé, ce qui complique grandement la quantification fiable des données. D'autre part, l'application de gradients de diffusion très intenses est moins évidente sur des scanners cliniques qui sont rarement équipés de tels gradients. Rallonger la durée d'application des gradients peut également permettre d'augmenter  $b$ . Cette approche se fait cependant au détriment de la validité de l'approximation des gradients courts, et il devient difficile d'estimer précisément le  $t_d$ . Ainsi que nous le verrons dans le **Chapitre III**, une autre approche consiste à se pencher sur des schémas de séquence plus complexes, tels que l'encodage en double diffusion.

*Dans le contexte de cette thèse, les mesures aux hautes valeurs de  $b$  nous ont permis de caractériser la restriction imposée par la microstructure dans l'espace extracellulaire, ainsi que présenté dans le **Chapitre IV** de ce manuscrit.*

### **c. MESURES DE L'ADC A $T_d$ ULTRACOURT**

Afin de déterminer la viscosité du cytosol ou d'être sensible au phénomène de restriction dans des structures de dimensions inférieures au micromètre, une approche intéressante consiste à fortement diminuer le  $t_d$ . On parle alors de mesures de diffusion aux  $t_{ds}$  ultracourts. Dans le cas des gradients pulsés, la diminution du  $t_d$  est cependant limitée par la nécessité d'augmenter l'intensité des gradients afin de maintenir une pondération en diffusion permettant l'obtention d'un contraste satisfaisant.

Une façon de contourner le problème est de recourir à des gradients dits « oscillants » définis par des fonctions mathématiques telles qu'un cosinus apodisé ou bien un sinus trapézoïde. Dans ce cas, la répétition de  $N$  périodes permet d'augmenter d'autant la pondération en diffusion. Cette approche nécessite cependant de rallonger de façon conséquente le TE. Il a par conséquent été proposé d'optimiser la forme du gradient oscillant afin de maximiser  $b$  sur des temps d'écho plus courts (103).

Les mesures expérimentales acquises par Marchadour *et al* chez le rat (104), puis Ligneul et Valette chez la souris (103) montrent une nette augmentation de l'ADC avec la fréquence des gradients oscillants (correspondant à une valeur de  $t_d$  minimale égale à 1 ms). La sensibilité de la mesure à la restriction est ainsi progressivement diminuée pour se rapprocher petit à petit de la diffusion libre. La modélisation des données d'ADC dans l'étude de Ligneul et Valette permet d'estimer le rayon des fibres cellulaires comme étant compris dans une gamme de 0.78-



1  $\mu\text{m}$ . Cependant, l'ADC mesuré correspond à moins du tiers de la valeur estimée par modélisation du coefficient de diffusion libre dans le cytosol. On se heurte ici à une limite posée par le matériel utilisé : des gradients plus intenses seraient nécessaires afin de diminuer d'avantage le  $t_d$  et ainsi accéder expérimentalement à la mesure de la viscosité du cytosol. Nous n'entrerons cependant pas dans les détails ici, car cette approche n'a pas été utilisée dans le cadre de ce travail de thèse.

#### **d. MESURE DE L'ADC AUX LONGS TEMPS DE DIFFUSION**

L'idée d'utiliser l'ADC comme potentiel biomarqueur de l'altération de la microstructure en condition pathologique a été largement étudiée dans la littérature, tout d'abord dans un contexte d'ischémie cérébrale (105–109), et plus récemment chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé (110) ou encore dans des modèles d'inflammation (111). Ces mesures se limitent cependant pour la plupart à une seule valeur de  $t_d$  donné pour, à partir de là, émettre des hypothèses sur la nature des modifications de la microstructure à l'origine des différences observées au niveau de l'ADC entre tissus sains et tissus pathologiques.

Pour aller plus loin, il est très intéressant de se pencher sur la dépendance temporelle de l'ADC en fonction du  $t_d$ . En effet, lors d'une mesure aux longs  $t_d$ s, les métabolites ont la possibilité de parcourir le milieu intracellulaire sur des distances d'autant plus élevées et une dépendance temporelle de l'ADC est effectivement constatée *in vivo* dans de nombreuses études (112–114). En 2014, Novikov *et al* proposent que la relation entre l'ADC et le  $t_d$  peut être modélisée par une loi de puissance dont l'exposant résulte directement de la nature de la microstructure observée (arrangement périodique, désordre sur de courtes ou de larges échelles de distance, ...) (115).

En spectroscopie, des études menées aux longs temps de diffusion jusqu'à  $t_d=1.011$  s chez le macaque (116) et jusqu'à  $t_d=712$  ms chez l'Homme (117) montrent que l'ADC ne varie que très légèrement en fonction du  $t_d$  pour  $t_d \geq 80$  ms. Le fait que l'ADC ne semble jamais atteindre une valeur nulle suggère ici que les métabolites ne sont pas restreints dans des structures dont les dimensions sont inférieures ou égales à la distance sondée par les métabolites au cours de l'expérience. La modélisation des données expérimentales par le modèle de « neurites » suggère que les métabolites peuvent librement diffuser le long de fibres cellulaires (axones, neurites, dendrites, processus astrocytaires), et ne sont donc pas majoritairement confinés dans les corps cellulaires ou bien des organelles.

Les valeurs d'ADC mesurées pour les métabolites sont par ailleurs de l'ordre  $\sim 0.1 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ , ce qui correspond au tiers de l'ADC mesuré à  $t_{ds}$  ultracourts. Ce résultat est par conséquent également en faveur d'une diffusion principalement monodirectionnelle, comme par exemple le long d'une fibre. En effet, pour un  $t_d$  suffisamment long, la diffusion est complètement restreinte dans le plan perpendiculaire à la direction principale de la fibre. Dans le cas d'une distribution isotrope des fibres, il est alors attendu que la valeur de l'ADC se stabilise autour de  $D_{\text{intra}}/3$ .

Des simulations de Monte Carlo effectuées dans des cellules synthétiques par Palombo *et al* (118) révèlent que la diffusion des marqueurs gliaux reflète des structures cellulaires exhibant des fibres plus courtes et moins complexes que dans le cas des marqueurs neuronaux (ce qui est cohérent avec les données histologiques). Une différence inter-espèce est également observée, révélant des prolongements cellulaires plus longs et plus complexes chez le macaque que chez la souris (cf **Figure I-10**). Cette approche a été appliquée dans l'étude de Ligneul *et al* (119), dans laquelle des mesures aux longs  $t_{ds}$  ont été effectuées dans un modèle de réactivité astrocytaire. De façon frappante, la diffusion du myo-inositol exhibe des changements significatifs en cas de réactivité astrocytaire, et la confrontation des données expérimentales aux simulations reflète effectivement une altération morphologique des astrocytes se traduisant par un accroissement de la longueur des fibres. Ces données ont été confirmées expérimentalement en effectuant des reconstructions 3D de la morphologie cellulaire à partir de coupes histologiques analysées par microscopie confocale. Les mesures aux longs  $t_{ds}$  ont par conséquent le potentiel de non seulement de collecter de précieuses informations sur la longueur des fibres cellulaires mais aussi d'être sensibles à de possibles altérations de la microstructure des différents types cellulaires en conditions pathologiques.

Pour aller plus loin, Palombo *et al* (102) tentent de modéliser la lente décroissance de l'ADC observée à très longs  $t_{ds}$  en réalisant des simulations de la diffusion prenant en compte la présence de protrusions le long des fibres cellulaires, telles que les épines dendritiques ou les feuilletts astrocytaires. Ces simulations confirment une faible dépendance de l'ADC en fonction de  $t_d$  (pour  $t_d \geq 200$  ms) et révèlent que le comportement asymptotique de l'ADC lorsque  $t_d \rightarrow \infty$  est en effet dominé par la géométrie des protrusions simulées (densité, largeur, longueur). Ces structures semblent par conséquent contribuer de façon majeure à la tortuosité expérimentée à  $t_d$  long par les métabolites diffusant le long des fibres. La diffusion observée à longs  $t_{ds}$  semble donc être majoritairement dominée par 1) la tortuosité imposée par différents aspects

secondaires de la microstructure des fibres cellulaires (embranchements, ondulations, protrusions) et 2) la longueur finie des fibres.

Les mesures d'ADC aux longs temps de diffusion s'avèrent très prometteuses afin de caractériser la microstructure des fibres cellulaires. Cette méthode est en revanche limitée en pratique car elle est très chronophage. De plus, ces mesures peuvent s'avérer très bruitées au-delà d'un  $t_d$  de 1 s tandis que le signal de l'eau a tendance à repousser, compliquant grandement la reconstruction des spectres et par conséquent, la quantification fiable de l'ADC.

*Au cours de ce travail de thèse, les mesures d'ADC aux longs temps de diffusion ont été effectuées dans le cadre de l'étude des propriétés de diffusion du milieu extracellulaire (Chapitre IV).*

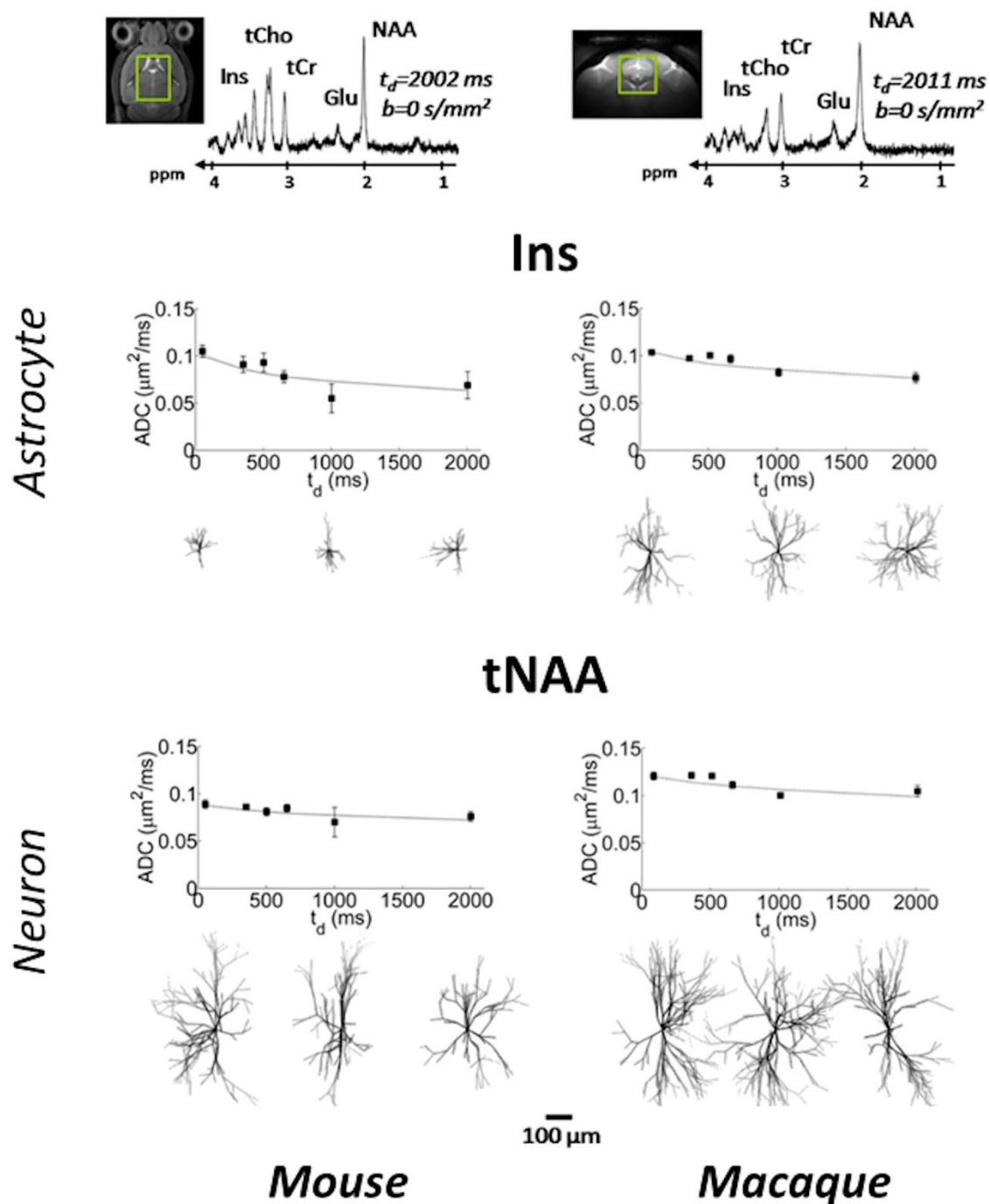


Figure I-10: A) Spectres acquis à long  $t_d$  (jusqu'à  $t_d \sim 2$  s) chez la souris (à gauche) et chez le macaque (à droite). B) Mesures de l'ADC en fonction du  $t_d$  pour Ins (marqueur glial) et tNAA (marqueur neuronal). L'évolution temporelle de l'ADC est ajustée à des données obtenues par simulations de Monte Carlo dans des cellules synthétiques. Les modèles de cellules correspondant au meilleur ajustement des données sont également représentés, dévoilant 1) une différence entre les types cellulaires et 2) une différence inter-espèce. Adapté de Palombo *et al* (116).



## **I.6. AU-DELA DES CELLULES OU L'OBJECTIF DE CE TRAVAIL DE THESE**

Les études de DW-MRS présentées dans la section précédente se sont principalement attelées à caractériser les propriétés de l'ICS et plus précisément, à distinguer les compartiments neuronal et astrocytaire. Nous avons cependant souligné au tout début de ce manuscrit l'importance de caractériser les propriétés de diffusion de l'ECS afin de pouvoir interpréter le signal de diffusion de molécules présentes à la fois dans l'ICS et l'ECS, telles que l'eau ou le lactate. Cette partie décrit donc plus précisément l'ECS en tant que compartiment tissulaire à avant d'exposer en quoi une connaissance plus approfondie de ses propriétés pourraient contribuer à 1) élucider le rôle métabolique du lactate et 2) mieux interpréter les données obtenues en DW-MRI.

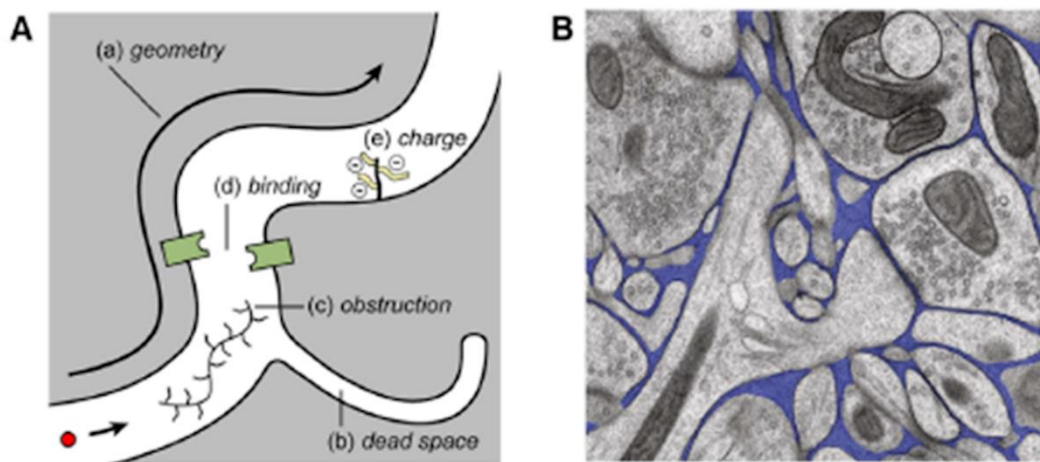
### **I.6.i. L'ECS EN TANT QUE COMPARTIMENT TISSULAIRE**

L'ECS constitue un réseau 3D de communication intercellulaire déployé au travers du cerveau. Il s'agit d'une structure labyrinthique occupant environ 20% du volume cérébral total et dont les dimensions hétérogènes varient de quelques dizaines à plusieurs centaines de nanomètres (120–123). L'ECS est composé du fluide interstitiel rempli des macromolécules – collagène, protéoglycanes, acide hyaluronique, enzymes- qui composent la matrice extracellulaire (ECM). Cette dernière offre un réseau de support indispensable auprès des cellules cérébrales, tant d'un point de vue structural que métabolique (124,125). Le fluide interstitiel est en contact avec le liquide cébrospinal (CSF) au niveau des ventricules via les plexus choroïdes, des capillaires sanguins au travers de la barrière hématoencéphalique, ainsi qu'à la surface des hémisphères cérébraux dans l'espace sous-arachnoïdien (126). Ce contact rapproché permet de veiller au maintien de l'homéostasie dans le fluide interstitiel ainsi que d'apporter des nutriments nécessaires au bon fonctionnement des cellules tout en évacuant les déchets métaboliques.

L'ECS joue un rôle primordial dans l'activité neuronale, car il constitue un réservoir d'ions  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  et  $Na^+$  nécessaires à la formation et au maintien des potentiels membranaires de repos ou d'action. Le terme de transmission volumique a de plus été établi afin de désigner le rôle de l'ECS dans l'activation neuronale extrasynaptique (127,128). Cet espace peut en effet être considéré comme un milieu tortueux et visqueux au travers duquel les molécules peuvent diffuser plus ou moins aisément, permettant ainsi de moduler la formation de réseaux de connexion inter-neuronaux à la fois complexes et relativement étendus (123).

Du point de vue de la microstructure, l'ECS constitue par conséquent un compartiment à part entière et plusieurs aspects de la diffusion extracellulaire doivent être élucidés : la diffusion est-elle plus rapide par rapport au compartiment intracellulaire ? Suit-elle une loi gaussienne, avec des propriétés se rapprochant de la diffusion libre ? Ou au contraire, peut-on être sensible à de la diffusion encombrée ?

Différents facteurs, illustrés dans la **Figure I-12**, viennent en effet perturber la diffusion d'une molécule au sein de l'ECS. Tout d'abord, cet espace est intrinsèquement tortueux du fait de la présence de cellules (a). L'ECS présente également un certain degré de restriction due aux invaginations de la membrane cellulaire qui tend à former des « impasses » (b) ainsi qu'à la présence de macromolécules venant obstruer le processus de diffusion (c). Enfin, de possibles interactions avec des transporteurs transmembranaires (d) ou bien des charges présentes dans la matrice extracellulaire (e) peuvent également interférer avec le phénomène de diffusion.



**Figure I-12 : A) Résumé des différents facteurs venant perturber la diffusion dans l'ECS. B) Image obtenue par microscopie électronique de l'ECS (en bleu) après cryofixation du tissu. Tiré de Nicholson et Hrabetova (121).**

#### I.6.ii. PROBLEME 1 : EVALUATION DE LA BIODISTRIBUTION CEREBRALE DU LACTATE

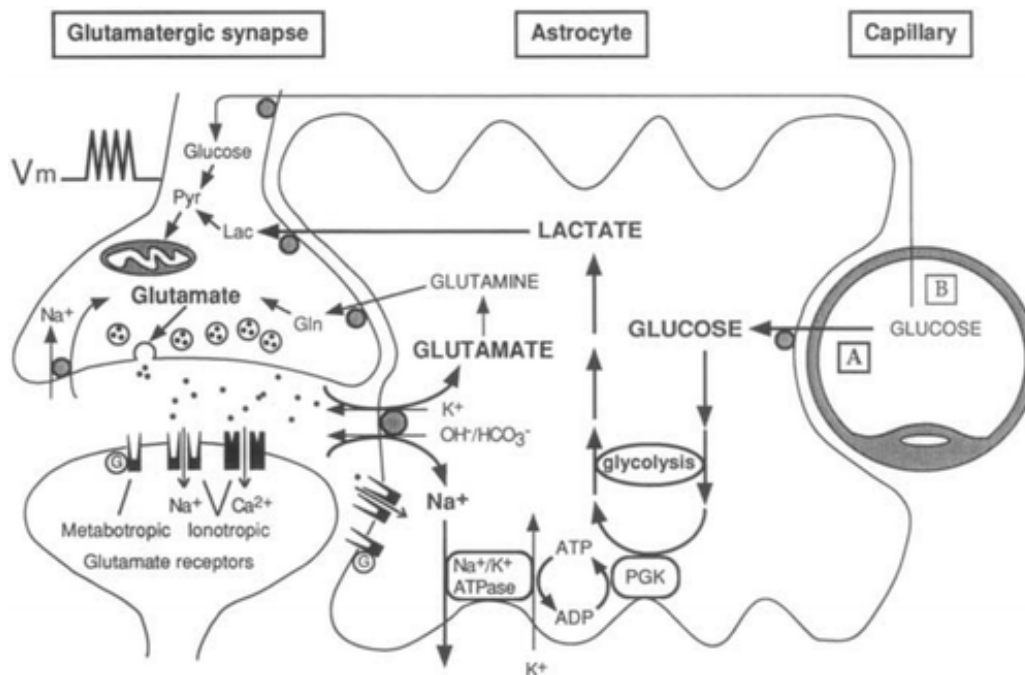
Fox *et al* reportent dès 1988 un écart important entre l'assimilation du glucose et la consommation d'oxygène par les neurones durant l'activité neuronale. Ils suggèrent alors

qu'une voie métabolique autre que la glycolyse oxydative dans les neurones pourrait exister afin de subvenir aux besoins énergétiques de ces derniers (129).

En 1994, Pellerin et Magistretti (46) proposent que le transport du lactate des astrocytes vers les neurones constituerait un mécanisme indispensable à l'activité métabolique (hypothèse de la navette astrocytes-neurones ou ANLS pour astrocytes-to-neurons lactate shuttle en anglais). Plus précisément, le glutamate relargué dans la fente synaptique suite à l'activité neuronale serait recapturé par les astrocytes via des canaux sodiques, entraînant une accumulation de sodium dans l'ICS. Le glutamate serait alors reconverti en glutamine tandis que le sodium accumulé serait expulsé par des pompes sodium-potassium nécessitant la consommation d'adénosine-triphosphate (ATP). Ce processus énergivore entraînerait par la suite l'activation de la glycolyse au sein des astrocytes, menant ainsi à la synthèse de lactate. Ce dernier transiterait alors des astrocytes vers les neurones via des transporteurs monocarboxylates (MCT 2 et MCT 4) afin de prendre part au cycle de Krebs suite à sa conversion en pyruvate, menant ainsi à la production d'ATP dans les mitochondries neuronales. Un résumé schématique de l'hypothèse ANLS est présenté en **Figure I-13** (130).

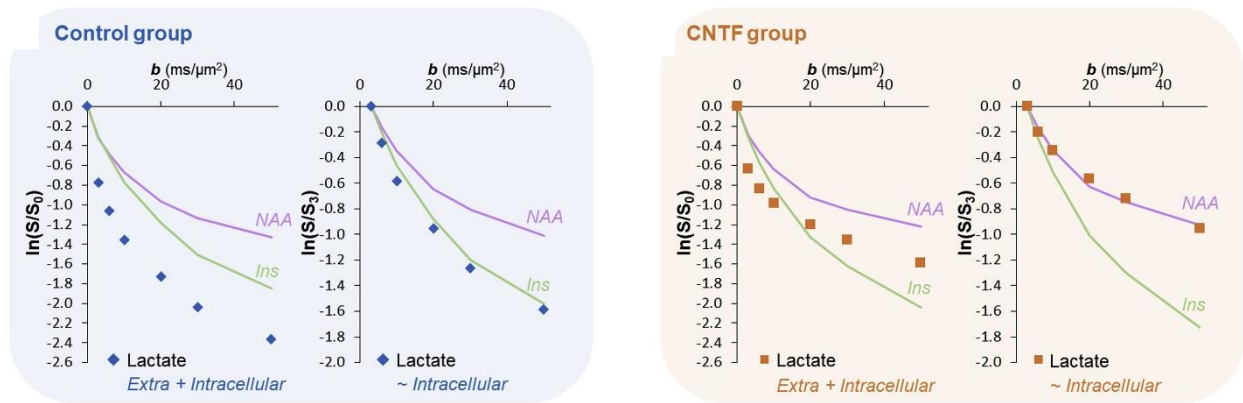
Une telle hypothèse suppose une compartimentation cellulaire spécifique du lactate et plus précisément, l'existence d'un gradient de concentration des astrocytes aux neurones ( $[\text{Lactate}]_{\text{astrocytes}} > [\text{Lactate}]_{\text{extracellulaire}} > [\text{Lactate}]_{\text{neurones}}$ ). Cependant, le manque d'outils non-invasifs permettant de détecter le lactate afin de clarifier sa biodistribution au sein des différents compartiments intracellulaires empêche de confirmer et d'infirmer cette hypothèse qui fait à ce jour toujours l'objet d'intenses débats et de résultats expérimentaux contradictoires (131–134).





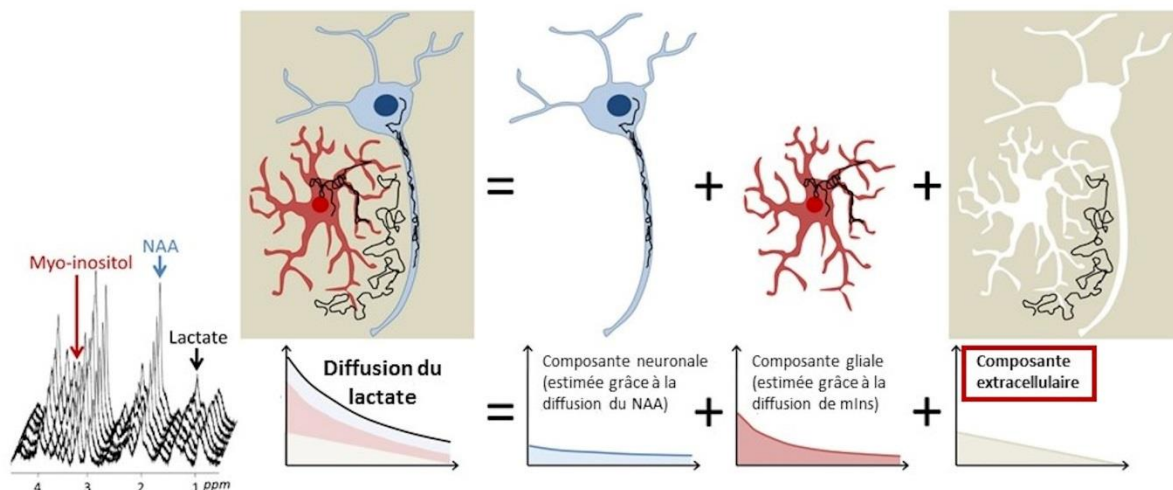
**Figure I-13 : Résumé schématique de l'hypothèse ANLS. Tiré de la référence (128).**

Nous avons montré que la diffusion des métabolites cérébraux telle que mesurée en DW-MRS permet de rendre compte de la microstructure des compartiments glial et neuronal dans lesquels ils sont confinés. Comparer les données de diffusion de métabolites majoritairement neuronal ou glial à la diffusion du lactate nous permettrait donc d'obtenir de précieuses informations sur la compartimentation cellulaire de ce dernier. Cette idée a été pour la première fois mise en œuvre dans l'étude de Ligneul *et al* (119) dans un modèle de réactivité astrocytaire. Elle suggère un changement de la compartimentation du lactate entre souris saines et souris présentant une importante réactivité astrocytaire. Le lactate étant cependant présent à la fois dans l'ECS et l'ICS, il est par conséquent nécessaire de démêler dans un premier temps la contribution de ces deux compartiments au signal total de diffusion avant de pouvoir évaluer la répartition du lactate au sein des différents types cellulaires. Il est généralement admis que la diffusion est plus rapide et moins restreinte dans l'ECS que l'ICS, entraînant une atténuation du signal beaucoup plus marquée aux faibles valeurs de  $b$  par rapport au cas des métabolites purement intracellulaires (135). En « retirant » grossièrement la contribution du pool de lactate extracellulaire (i.e. l'atténuation du signal se produisant pour  $b \leq 3.05 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ), les auteurs montrent que l'atténuation du signal de diffusion du lactate se superpose à celle du myo-inositol dans le cas des souris saines tandis qu'elle se superpose à celle du NAA dans le modèle d'astrocytes réactifs (cf **Figure I-14**). Au regard de l'hypothèse ANLS, ce changement de compartimentation du lactate intracellulaire pourrait par conséquent refléter un dérèglement du métabolisme énergétique.



**Figure I-14** L'atténuation du signal du lactate aux hautes valeurs de  $b$  change de façon significative en condition pathologique (réactivité astrocytaire), reflétant une compartimentation plutôt astrocytaire chez les souris saines et une compartimentation plutôt neuronale chez les souris présentant une réactivité astrocytaire accrue. Tiré de Ligneul *et al* (117).

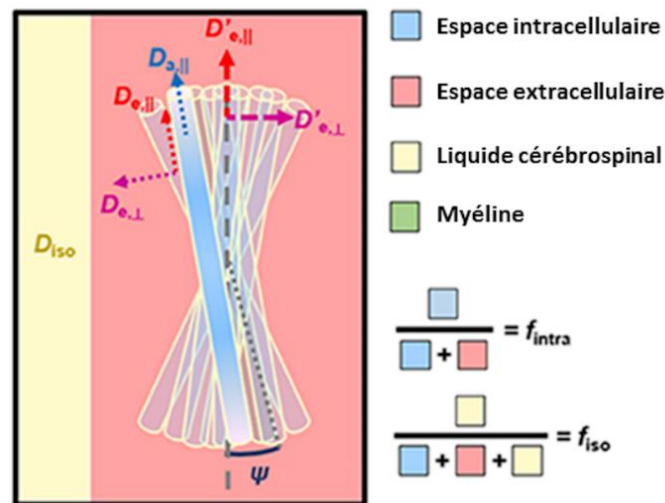
Ces résultats prometteurs laissent à penser que la spectroscopie RMN pondérée en diffusion pourrait constituer un outil non-invasif capable d'élucider la biodistribution du lactate cérébral et de confirmer (ou non) l'existence d'un gradient de concentration des astrocytes aux neurones (cf **Figure I-15**). L'approche utilisée par Ligneul *et al* pour limiter la contribution de l'ECS au signal de diffusion du lactate reste cependant pour le moins approximative. Une caractérisation plus rigoureuse des propriétés de diffusion de l'ECS via des mesures expérimentales additionnelles s'avère par conséquent nécessaire afin de confirmer les observations effectuées par Ligneul *et al* et permettre une modélisation plus précise des compartiments neuronal, glial et extracellulaire.



**Figure I-15 : Décomposition de la biodistribution du lactate au sein des trois compartiments neuronal (caractérisé par la diffusion du NAA), glial (caractérisé par la diffusion du myo-inositol) et extracellulaire. Les propriétés de diffusion de l'ECS doivent être clarifiées expérimentalement afin de pouvoir démêler sa contribution des composantes neuronale et gliale. Crédit J. Valette.**

I.6.iii. PROBLEME 2 : DEGENERESCENCE DES SOLUTIONS EN IRM DE  
DIFFUSION QUANTITATIVE

Il a été fait mention dans la **Partie I.5.iv** de la variété des modèles utilisés afin de modéliser la microstructure et la caractériser par des paramètres quantitatifs. A titre d'exemple, la **Figure I-16** propose un modèle de la substance blanche (136) dont il sera en partie question dans le **Chapitre V** de ce manuscrit. Ce modèle décompose la substance blanche en trois composantes (diffusivités axiale et radiale extra-axonale, diffusivité axiale intra-axonale) auxquelles vient s'ajouter un compartiment aux propriétés de diffusion isotropes correspondant au CSF.



**Figure I-16 : Exemple de modélisation de la substance blanche par des cylindres décrivant une distribution d'angles  $\psi$  par rapport à un axe vertical. La diffusion de l'eau est décomposée en composantes intra-axonale (parallèle aux fibres), extra-axonale (parallèle et radiale) et extracellulaire (diffusion libre correspondant au CSF). Tiré de Kunz *et al* (134).**

L'adoption d'un tel modèle suppose que les différents compartiments tissulaires présentés ici exhibent des propriétés de diffusion bien distinctes et connues au préalable. La modélisation des données est en pratique compliquée par le fait que le signal de diffusion est relativement peu « remarquable », i.e. le signal de diffusion offre une signature malheureusement assez peu spécifique de la microstructure. Par conséquent, la modélisation des données expérimentales donne souvent lieu à plusieurs scénarios vraisemblables et on parle alors de dégénérescence des solutions. La fonction d'optimisation du modèle ne présente pas de minimum marqué mais plutôt toute une série de minima locaux peu « profonds » décrivant des estimations biologiquement plausibles des différents paramètres du modèle (136,137). Ce phénomène rend

donc l'analyse très peu robuste face au bruit expérimental qui est alors susceptible de favoriser de manière aléatoire un minimum local plutôt qu'un autre (137,138). Afin de lever cette dégénérescence, il est souvent nécessaire de trancher arbitrairement en posant *a priori* des hypothèses fortes sur les propriétés de diffusion du modèle étudié. Dans ce contexte, deux scénarios sont par exemple souvent étudiés dans le cadre du modèle présenté dans la **Figure I-16**, à savoir une diffusivité axiale extra-axonale supérieure à la diffusivité axiale intra-axonale ou bien l'inverse. Ces deux scénarios permettent en effet de modéliser tout aussi bien le signal de diffusion observé dans la substance blanche. Une approche expérimentale mesurant spécifiquement la diffusion dans les espaces intra- et extra-axonaux s'avère par conséquent nécessaire afin d'affiner les hypothèses de départ sur lesquelles reposent ce modèle de la microstructure.

#### I.6.iv. APPORTS DE CE TRAVAIL DE THESE

Ce manuscrit de thèse a pour but de clarifier la contribution de l'ECS au signal de diffusion, avec un intérêt particulier mais non exclusif pour le lactate. Nous apportons ici un nouveau regard sur les propriétés de diffusion de l'ECS en allant au-delà de la seule estimation de l'ADC et en remettant en cause l'idée d'une diffusion libre dans ce compartiment.

Dans un premier temps, nous nous sommes attelés à l'implémentation et la caractérisation d'une séquence permettant le double encodage en diffusion (DDE) des métabolites (**Chapitre III**). Cette séquence permet d'obtenir une sensibilité inégalée à l'anisotropie microscopique et nos données suggèrent que le « signal » DDE des métabolites endogènes purement intracellulaires reflète non seulement la diffusion dans les fibres, mais aussi vraisemblablement la présence d'embranchements le long des prolongements cellulaires. De façon intéressante, le signal DDE obtenu pour le lactate est singulièrement différent des autres métabolites, ce qui semble indiquer une sensibilité particulière de la DDE au pool de lactate extracellulaire.

Nous avons ensuite déployé dans le **Chapitre IV** la panoplie d'outils DW-MRS à notre disposition (mesures à hautes valeurs de  $b$ , ADC aux longs  $t_{ds}$ , DDE) afin de caractériser les propriétés de diffusion de l'ECS grâce à l'injection stéréotaxique d'un marqueur exogène de cet espace, le sucrose. Les données expérimentales révèlent que, bien que la diffusion dans l'ECS semble plus rapide, elle est également non-gaussienne et tortueuse. Cette étude a également mis en avant la capacité des mesures DDE à discriminer l'ECS de l'ICS.

Nous proposons dans le **Chapitre V** une méthode originale et complémentaire permettant de comparer qualitativement les ADCs des milieux intra- et extracellulaire grâce à la combinaison

d'un contraste glutamate CEST (chemical exchange saturation transfer) et d'un contraste en diffusion. Cette approche permet de « filtrer » la contribution de l'espace intraneuronal : lorsque ce dernier est en partie saturé via l'effet gluCEST, l'ADC augmente significativement, suggérant que la diffusivité axiale intra-neuronale est inférieure à la diffusivité axiale extra-neuronale.

Pour conclure, nous évoquons comment des expériences de  $^{13}\text{C}$  hyperpolarisé pourraient permettre d'affiner la connaissance des propriétés de diffusion du lactate dans les différents compartiments.

---

# CHAPITRE II. LA SPECTROSCOPIE RMN

## PONDEREE EN DIFFUSION EN PRATIQUE

### II.1. SETUP EXPERIMENTAL

#### II.1.i. IRM 11.7 T ET ANTENNES UTILISEES

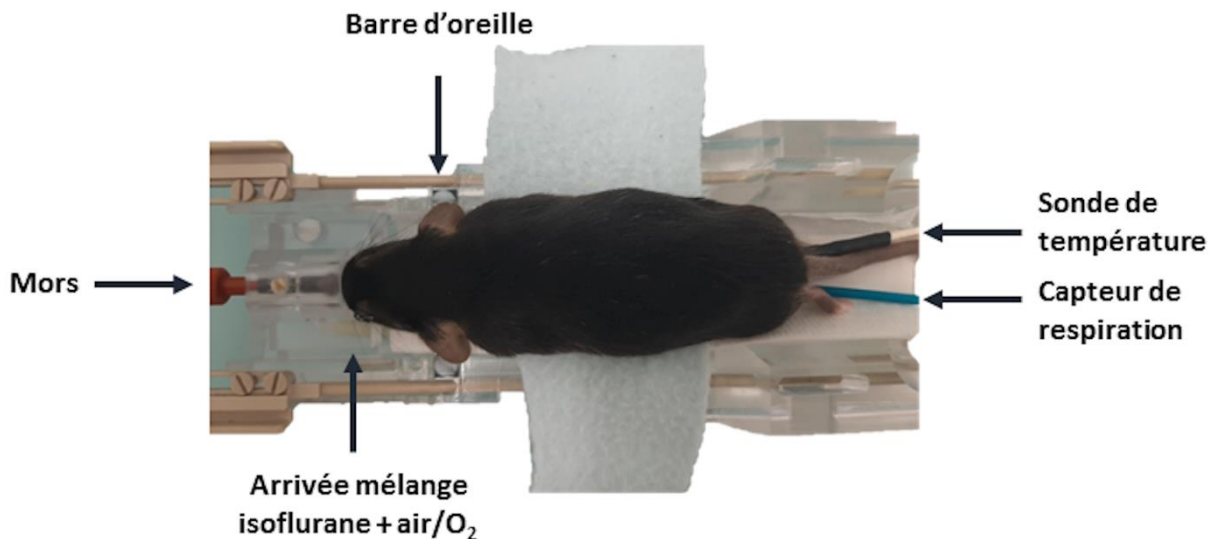
Nous disposons au sein du laboratoire MIRCen d'un IRM 11.7 T (BioSpec 117/16 USR, Bruker, Ettlingen, Allemagne) dédié à l'imagerie du petit animal (diamètre utile de 160 mm). Le scanner est également équipé de gradients (diamètre interne de 90 mm) très favorables aux mesures de diffusion car dotés d'une amplitude de 752 mT/m combinée à un temps de montée de 6660 T/m/s.

Différentes antennes ont été utilisées dans le cadre de nos travaux. Pour nos mesures de diffusion chez la souris, une antenne  $^1\text{H}$  cryogénique en quadrature de phase en transmission et en réception a été privilégiée en raison du gain important de signal obtenu en raison de la diminution du bruit thermique de l'antenne grâce au refroidissement à l'hélium liquide (amélioration d'un facteur  $\sim 2.5$  du rapport signal à bruit (SNR) par rapport à une antenne opérant à température ambiante). Il s'agit en revanche d'une sonde de surface, ce qui induit par conséquent un champ  $B_1$  inhomogène peu propice à l'imagerie de structures cérébrales profondes. Il est donc nécessaire de calibrer précisément la puissance délivrée par l'antenne en fonction de la profondeur du voxel, ou d'utiliser des impulsions adiabatiques.

Chez le rat, et plus particulièrement pour les mesures gluCEST, nous avons utilisé une antenne  $^1\text{H}$  volumique en transmission (diamètre interne et externe de 72 et 89 mm respectivement) associée à une antenne  $^1\text{H}$  surfacique en réception. L'homogénéité du champ  $B_1$  obtenue grâce à l'emploi d'une antenne volumique est particulièrement intéressante dans le cadre des mesures gluCEST. En effet, ces mesures reposent sur l'application d'impulsions de saturation pour un temps de saturation et une amplitude de  $B_1$  donnés. Elles requièrent par conséquent l'application d'un champ  $B_1$  homogène afin de garantir une saturation CEST équivalente sur tout le cerveau.

### II.1.ii. MISE EN PLACE DE L'ANIMAL

L'animal vigile est placé dans une cage d'induction afin d'être préalablement anesthésié par inhalation d'isoflurane à 3% combiné à un mélange gazeux air/O<sub>2</sub>. Une fois inconscient, l'animal est positionné dans un lit adapté ; la tête est alors immobilisée par trois points fixes (un mors ainsi que deux barres d'oreille insérées dans chaque conduit auditif) dans le but d'éviter tout artefact de mouvement au cours de la mesure tout en maintenant la tête au plus près de l'antenne surfacique. Le gaz anesthésiant continue d'être acheminé tout au long de l'expérience par l'intermédiaire d'un tuyau relié à un masque dans lequel respire l'animal. La concentration d'isoflurane est progressivement diminuée en-deçà de 1.5 %. Une photographie (**Figure II-1**) de l'animal prêt à scanner est disponible ci-dessous :



**Figure II-1 : Photographie d'une souris installée dans un lit compatible avec la cryosonde.**

Le lit est ensuite positionné dans le scanner en prenant soin à ce que le cerveau soit correctement positionné en dessous du centre de l'antenne. Il est ensuite immobilisé avec des mousses afin de minimiser de possibles mouvements induits par des vibrations mécaniques lors de l'acquisition.

Tout au long de l'expérience, la température de l'animal est maintenue à 37°C grâce à un système de chauffage faisant circuler de l'eau chaude. La respiration de l'animal est également constamment surveillée au moyen d'un capteur mécanique positionné sous l'abdomen. Elle est maintenue entre 50 et 100 respirations par minute pour la souris et entre 30 et 70 respirations par minute chez le rat. Le logiciel PC SAM est utilisé pour l'observation en temps réel de la température et de la respiration de l'animal (Small Animal Instruments, Inc., Stony Brook, NY).



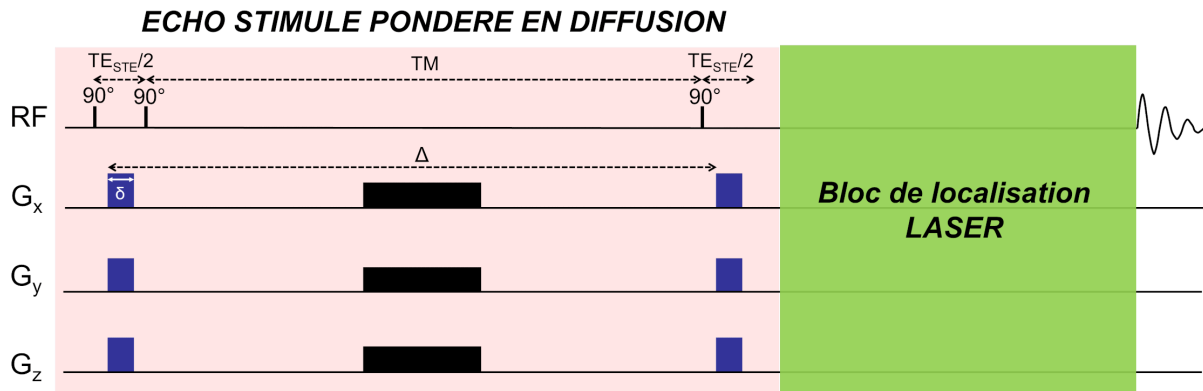
## II.2. SEQUENCES UTILISEES

### II.2.i. SUPPRESSION DE L'EAU GRACE AU MODULE VAPOR

Les métabolites étant présents en bien moindre quantité que l'eau dans le cerveau, un module efficace de suppression de l'eau est nécessaire afin de pouvoir les détecter tout en évitant des distorsions de la ligne de base des spectres. Nous utilisons ici un module VAPOR (pour Variable Power radiofrequency pulses with Optimized Relaxation delays) initialement implémenté par Tkac et collègues (139). Dans cette séquence, on applique une série d'impulsions  $90^\circ$  sélectives sur quelques ppm et centrées sur l'eau (impulsions CHESS (140)) suivies de gradients de déphasage entraînant une dispersion systématique de l'aimantation dans le plan transversal. Plus précisément, le module VAPOR est composé d'une succession de sept impulsions CHESS dont les angles de bascule et les délais entre chaque impulsion ont été optimisés afin de maximiser la suppression de l'eau pour une large gamme de  $B_1$ , ce qui est ainsi compatible avec l'utilisation d'une antenne surfacique.

### II.2.ii. ECHO STIMULE PONDERE EN DIFFUSION

La séquence DW-MRS sur laquelle se base ce travail a été précédemment développée et caractérisée dans notre équipe par Ligneul *et al* (101). Cette séquence, illustrée en **Figure II-2**, repose sur l'utilisation d'un écho stimulé permettant de varier  $\Delta$ , et par conséquent le  $t_d$ , tout en gardant un  $TE_{STE}$  fixe et minimal de 8 ms. L'écho stimulé permet donc d'effectuer des mesures aux longs  $t_d$  tout en gardant le même TE. L'utilisation de l'écho stimulé se fait cependant au prix d'une perte de signal d'un facteur 2 par rapport à l'écho de spin car seule la moitié de l'aimantation initiale est rephasée dans ce cas (141). Après une première bascule de l'aimantation dans le plan transversal, une paire de gradients est appliquée de part et d'autre de deux impulsions  $90^\circ$ . On peut noter ici que les gradients de diffusion servent également de spoilers supplémentaires pour l'impulsion  $90^\circ$ . Un crusher est également appliqué durant le TM. Les trois impulsions  $90^\circ$  utilisées ici sont des impulsions créneau de très courte durée (0.1 ms).



**Figure II-2 : Représentation schématique de la séquence STE-LASER.**

La biodistribution de certains métabolites peut soulever la question d'un potentiel biais dû aux propriétés de relaxation des différents compartiments. En effet, le  $T_2$  des métabolites peut varier en fonction de leur potentielle restriction dans des organelles spécifiques telles que la myéline ou les mitochondries. En outre, l'insertion de gradients de diffusion séparés d'un temps de diffusion qui doit être suffisamment long afin de rendre compte de la microstructure induit inévitablement une augmentation du temps d'écho, et donc à une pondération de la mesure en  $T_2$ .

Cet effet potentiel du  $T_2$  sur les données pondérées en diffusion a été exploré par Ligneul *et al* (101). La séquence STE-LASER permet en effet de modifier aisément le TE et le  $t_d$  de manière indépendante, rendant ainsi possible l'obtention de jeux de données pour différentes combinaisons de TE et  $t_d$ . Bien que la gamme des TE mesurables soit en pratique limitée par le SNR, aucune corrélation n'a été observée entre les données de diffusion et les différentes combinaisons de TE/ $t_d$ . Nous considérons par conséquent que les propriétés de relaxation des métabolites n'interfèrent pas avec les données de diffusion, et que ces dernières peuvent donc être expliquées uniquement en fonction de la microstructure.

## II.2.iii. LOCALISATION DU VOXEL EN SPECTROSCOPIE

### a. PRINCIPE DE LOCALISATION

Il est courant de moyenner le signal dans un large voxel d'acquisition en raison de la faible concentration des métabolites cérébraux (et ce au détriment de la résolution spatiale). Pour ce faire, des gradients de sélections de coupes sont appliqués simultanément à des impulsions d'excitation/refocalisation dans les trois directions de l'espace. Les spins sont alors encodés spatialement en fonction de leur position  $r$  dans une direction donnée de la façon suivante:

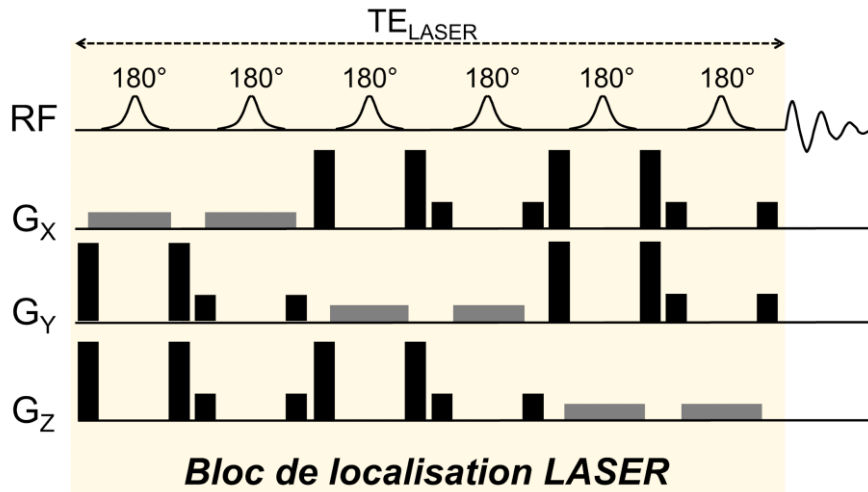
$$\omega(r) = \gamma(B_0 + G_r \cdot r) \quad (\text{II.2.1})$$

Pour une bande passante  $\Delta\Omega$  et une épaisseur de coupe  $\Delta r$  données, l'intensité de  $G_r$  doit alors être :

$$G_r = \frac{\Delta\Omega}{\gamma\Delta r} \quad (\text{II.2.2})$$

### b. BLOC DE LOCALISATION LASER ET ABSENCE DE TERMES CROISES

Contrairement à la séquence STEAM (142), dont les gradients de localisation sont appliqués à chaque impulsion  $90^\circ$  de l'écho stimulé, nous utilisons ici un module de localisation LASER (cf **Figure II-3**) qui intervient après le bloc de pondération en diffusion, ainsi qu'initialement proposé par Shemesh *et al* (143).



**Figure II-3 : Représentation schématique du bloc LASER.**

Ce choix de séquence, i.e. bloc de pondération en diffusion suivi du bloc de localisation, permet de s'affranchir des termes croisés entre gradients de diffusion et gradients de localisation. En effet, dans une séquence STEAM, l'utilisation de gradients de spoilers, de localisation ainsi que la présence d'un gradient de « fond » dû à la présence d'inhomogénéités du champ  $B_0$  induisent autant de contributions « parasites » aux gradients de pondération en diffusion.

En regroupant la contribution des gradients de diffusion  $G_{diff}(t)$  d'une part et de tous les autres gradients  $G_s(t)$  de sélection d'autre part, on peut écrire  $G(t)=G_{diff}(t) + G_s(t)$  et la valeur de  $b$  s'écrit alors :

$$b = \int_0^{TE} [k_{diff}(t) + k_s(t)]^2 dt \quad (\text{II.2.3})$$

La valeur de  $b$  est alors non seulement fonction de  $G_{\text{diff}}^2(t)$  mais également de  $G_s^2(t)$  ainsi que d'un terme croisé  $G_{\text{diff}}(t)G_s(t)$  dont la contribution augmente significativement avec  $G_{\text{diff}}(t)$ , venant ainsi biaiser la mesure de l'atténuation du signal aux hautes valeurs de  $b$ . Dans le cas de la séquence STE-LASER, ce terme croisé est minimal voir nul (seule la contribution du « background gradient », lié à l'inhomogénéité spatiale de  $B_0$ , subsiste). Le bloc LASER ajoute une pondération  $b_{\text{LASER}}$  constante mais négligeable devant  $b$  égale à  $\sim 0.07 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  (pour un voxel de  $7 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$ ).

### c. IMPULSIONS ADIABATIQUES

Les impulsions adiabatiques, employées dans la séquence LASER, consistent en des impulsions dont l'intensité  $B_1$  et la fréquence  $\omega$  sont modulées au cours du temps (144,145). Une large gamme de fréquences autour de la fréquence de résonance  $\omega_0$  est ainsi balayée au cours de la durée d'application de l'impulsion, permettant alors de s'affranchir des inhomogénéités de champ  $B_1$ . Cette propriété est particulièrement intéressante lorsqu'une antenne surfacique est utilisée.

Dans notre cas, nous avons opté pour des impulsions dont les modulations de  $B_1$  et  $\omega$  sont définies par des fonctions sécante et tangente hyperboliques:

$$B_1(t) = B_{1\text{max}} \operatorname{sech}\left(\beta \left(1 - \frac{2t}{T}\right)\right) \quad (\text{II.2.4a})$$

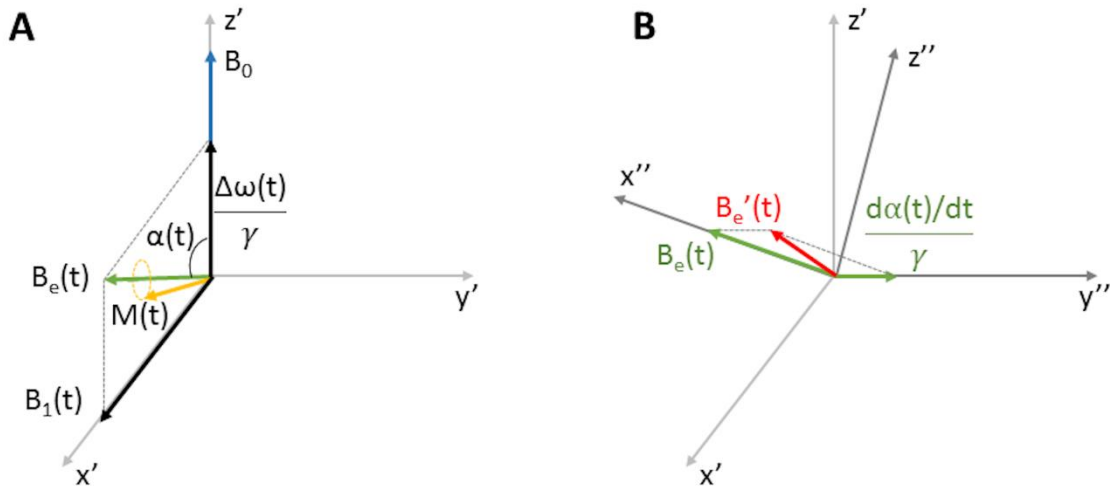
$$\omega(t) = \omega_{\text{max}} \tanh\left(\beta \left(1 - \frac{2t}{T}\right)\right) \quad (\text{II.2.4b})$$

$\beta$  étant une constante réelle définie telle que  $\operatorname{sech}(\beta)=0.01$ .

Dans le référentiel tournant  $(x', y', z')$  précessant autour de l'axe  $z$  à la fréquence  $\omega$ , un champ effectif  $B_e(t)$  est généré lors de l'application de l'impulsion. Son intensité dépend alors directement de  $B_1(t)$  ainsi que de  $\Delta\omega(t)=\omega(t)-\omega_0$  et varie donc au cours de la durée de l'impulsion :

$$B_e(t) = \sqrt{(B_1(t))^2 + \left(\frac{\Delta\omega(t)}{\gamma}\right)^2}, \text{ avec } \Delta\omega(t) = \omega(t) - \omega_0 \quad (\text{II.2.5})$$

L'angle de bascule  $\alpha$  de  $B_e(t)$  par rapport à  $z$  est défini par  $\tan^{-1}\left(\frac{\gamma B_1(t)}{\Delta\omega(t)}\right)$ . L'aimantation macroscopique  $M$  suit quant à elle la bascule du champ effectif  $B_e(t)$ , décrivant un cône autour de ce dernier (cf **Figure II-4.A**).



**Figure II-4: A) Représentation du champ effectif  $B_e$  dans le référentiel tournant. La bascule de l'aimantation  $M$  suit  $B_e(t)$  et décrit un cône autour de ce dernier. B) Apparition d'une troisième composante pour le champ effectif lorsque la vitesse de bascule de  $B_e(t)$  est prise en compte. Adapté de (143).**

En pratique, la bascule progressive de  $B_e(t)$ , caractérisée par la quantité  $\frac{d\alpha(t)}{dt}$ , doit être suffisamment lente par rapport à la précession de  $M(t)$  autour de  $B_e(t)$ . Afin de comprendre ce phénomène, considérons un second référentiel tournant ( $x''$ ,  $y''$ ,  $z''$ ) décrivant une rotation autour de l'axe  $y''$  à la vitesse de rotation  $\frac{d\alpha(t)}{dt}$  (cf **Figure II-4.B**). Dans ce nouveau repère, une nouvelle composante apparaît en  $y''$  et on définit alors  $B_e'(t)$  :

$$B_e'(t) = \sqrt{B_e(t)^2 + \left(\frac{d\alpha/dt}{\gamma}\right)^2} \quad (\text{II.2.6})$$

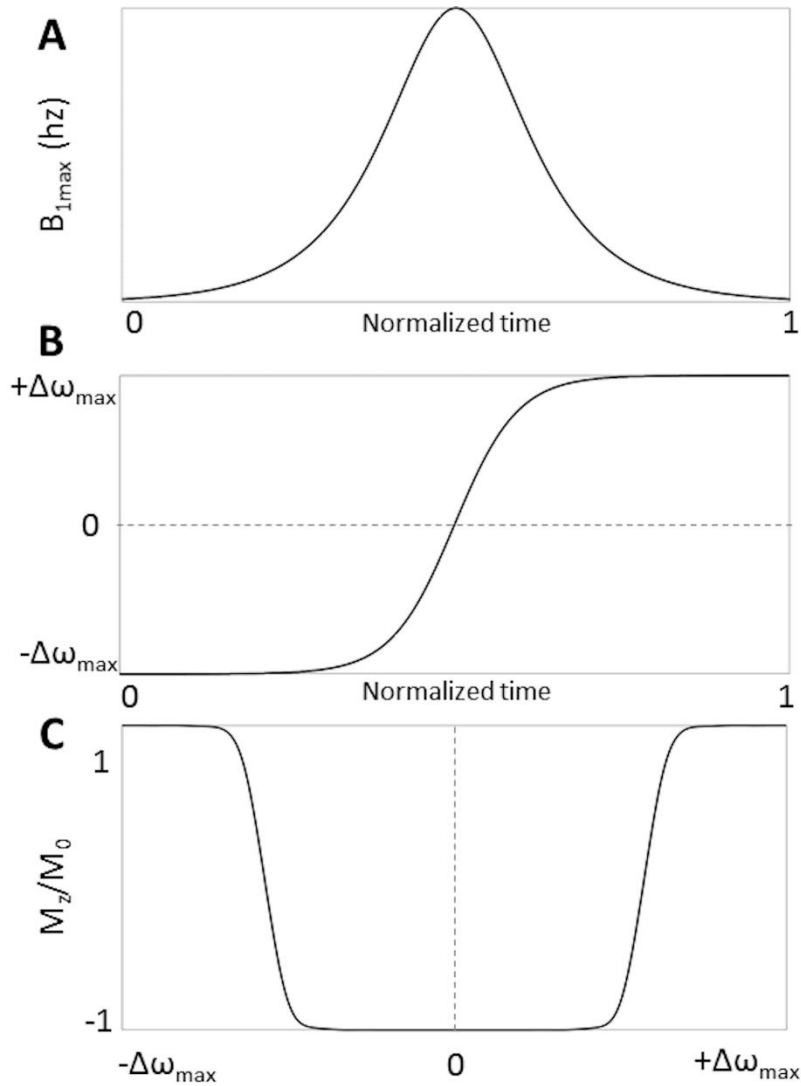
Dans le cas où la quantité  $\left(\frac{d\alpha/dt}{\gamma}\right)$  est élevée,  $B_e'(t)$  dévie fortement de  $B_e(t)$  et la trajectoire décrite par  $M(t)$  dans l'espace devient instable, empêchant la bascule complète de l'aimantation. Il apparaît en revanche que  $B_e'(t) \approx B_e(t)$  lorsque  $\left|\frac{d\alpha}{dt}\right| \ll |\gamma B_e(t)|$ . Dans ce cas, la variation de l'orientation de  $B_e(t)$  au cours du temps est suffisamment faible pour que la cohérence entre les deux référentiels soit maintenue. La trajectoire de  $M(t)$  reste alors quasi-colinéaire à celle de  $B_e(t)$  durant toute la durée d'application de l'impulsion et il est alors possible de basculer l'aimantation de façon contrôlée. Cette condition sur  $\left|\frac{d\alpha}{dt}\right|$  est appelée condition d'adiabaticité. Elle est en pratique remplie en augmentant la valeur de  $B_{1\max}$  de façon à atteindre une valeur seuil pour laquelle  $B_1(t) \gg \frac{\Delta\omega(t)}{\gamma}$  et au-delà de laquelle la bascule de l'aimantation ne dépend

plus de l'intensité de l'impulsion. On peut noter que cette valeur seuil est aisément atteinte par notre antenne cryogénique.

On distingue les impulsions adiabatiques d'excitation « half passage » (AHP) des impulsions adiabatiques de refocalisation « full passage » (AFP). A titre d'exemple, la modulation d'une impulsion AFP en intensité et en fréquence est représentée dans les **Figures II-5.A** et **II-5.B**. Dans ce cas, seule l'aimantation des spins de fréquence  $\omega$  comprise entre  $\pm \frac{\Delta\omega_{max}}{\gamma}$  est inversée (cf **Figure II-5.C**). Expliquons ce phénomène. Au début de l'impulsion,  $\omega = -\Delta\omega_{max}$ , l'angle de bascule  $\alpha(t)$  est proche de zéro et  $\left| \frac{\Delta\omega}{\gamma} \right| \gg |B_1|$ . A mesure que l'impulsion est jouée, l'intensité de  $B_1(t)$  augmente tandis que la fréquence  $\omega$  de l'impulsion se rapproche de  $\omega_0$ , entraînant une bascule progressive de  $B_e(t)$  et de  $M(t)$ . Lorsque  $\omega \approx \omega_0$ , on a  $\left| \frac{\Delta\omega}{\gamma} \right| \ll |B_1|$ ,  $B_e \approx B_1$  et  $\alpha(t) \approx 90^\circ$ . On assiste alors à l'inversion  $B_e(t)$ . Après résonance, l'angle  $\alpha(t)$  continue d'augmenter tandis que l'amplitude de  $B_1(t)$  diminue progressivement et que la fréquence  $\omega$  se rapproche de  $+\Delta\omega_{max}$ . A la fin de l'impulsion,  $\alpha(t) \approx 180^\circ$  et  $B_e(t)$  et  $M(t)$  sont alors complètement inversés. Finalement, si on considère l'évolution temporelle de  $\alpha(t) = \arctan\left(\frac{\gamma B_1(t)}{\Delta\omega(t)}\right)$ , on remarque que  $\alpha(t)$  passe très rapidement de  $0$  à  $180^\circ$  pour des valeurs de  $\omega(t)$  proches de la fréquence de Larmor  $\omega_0$ .

On peut noter ici que contrairement à des impulsions classiques, la bascule de l'aimantation n'a pas lieu au même moment pour toutes les résonances au cours de l'application d'une impulsion AFP. Il en résulte un déphasage non linéaire supplémentaire dans le plan  $(x'y')$ , dépendant à la fois de  $B_1(t)$  et  $\Delta\omega(t)$ . Ce déphasage ne peut être compensé que par l'application d'une deuxième impulsion, d'où la nécessité d'employer les AFP de refocalisation par paire.

Dans le cas d'une AHP, la bascule de l'aimantation s'effectue de manière similaire à ceci près que l'impulsion s'achève lorsque  $B_e(t)$  se retrouve dans le plan transversal. Par ailleurs, lors d'une impulsion AHP, la totalité de l'aimantation n'est basculée dans le plan transverse qu'à la fin de l'impulsion, et non en son milieu, ce qui doit être pris en compte dans le calcul du TE.



**Figure II-5 : A) Modulation de l'amplitude de  $B_1(t)$  d'une impulsion AFP hyperbolique sécante (HS1). B) Modulation de la fréquence  $\omega(t)$  pour cette même impulsion AFP. C) Inversion de  $M_z$  obtenue en simulant les équations de Bloch sous Matlab.**

#### **d. ERREUR DE DEPLACEMENT CHIMIQUE**

En spectroscopie, nous nous intéressons à des métabolites dont les fréquences de résonance sont comprises 0.5 et 4.5 ppm, ce qui correspond à une plage de fréquences d'environ 2000 Hz à 11.7 T. L'encodage spatial des différents groupes de spins diffère alors légèrement pour un même gradient de sélection de coupe, ce qui a pour effet d'inclure du signal provenant hors du voxel d'intérêt pour certaines résonances. Ce phénomène est appelé artefact de déplacement chimique.

Pour une impulsion de bande passante  $\Delta\Omega$  et une largeur de coupe  $\Delta r$ , l'erreur de localisation  $\Delta l$  en fonction du déplacement chimique  $\Delta\omega$  est gouvernée par la relation suivante :

$$\frac{\Delta l}{\Delta r} = \frac{\Delta \omega}{\Delta \Omega} \quad (\text{II.2.7})$$

Afin de minimiser l'erreur liée au déplacement chimique, les impulsions du bloc LASER sont donc centrées autour de 3 ppm tandis que leur bande-passante est réglée à une valeur élevée de 10 kHz, ce qui correspond ainsi à une erreur d'environ 10% pour un déplacement chimique de 2 ppm par rapport au centre de la plage de résonances excitées par les impulsions LASER (correspondant à la résonance de la créatine à 3 ppm). Si augmenter la bande-passante constitue un bon moyen de réduire l'artefact de déplacement chimique, cette approche nécessite l'utilisation d'un B<sub>1</sub> plus élevé et sera par conséquent limitée par le B<sub>1</sub> maximal délivré par l'antenne. On peut néanmoins souligner que cet aspect n'est pas particulièrement limitant dans le cas d'utilisation de notre antenne cryogénique.

#### II.2.iv. ACQUISITION DES MACROMOLECULES

Les macromolécules (MM) est un terme générique désignant des molécules de haut poids moléculaires (protéines, lipides) dont le T<sub>2</sub> court induit de larges résonances peu intenses venant se superposer au signal des métabolites. La contribution des MM au spectre RMN peut par conséquent empêcher une quantification précise des métabolites d'intérêt. En raison de leur taille, les MM diffusent par ailleurs moins vite que les métabolites de plus petit poids moléculaire (diffusivité de 0.006 ms/μm<sup>2</sup> d'après (135)). La contribution relative des MM tend donc à augmenter avec la valeur de pondération en diffusion.

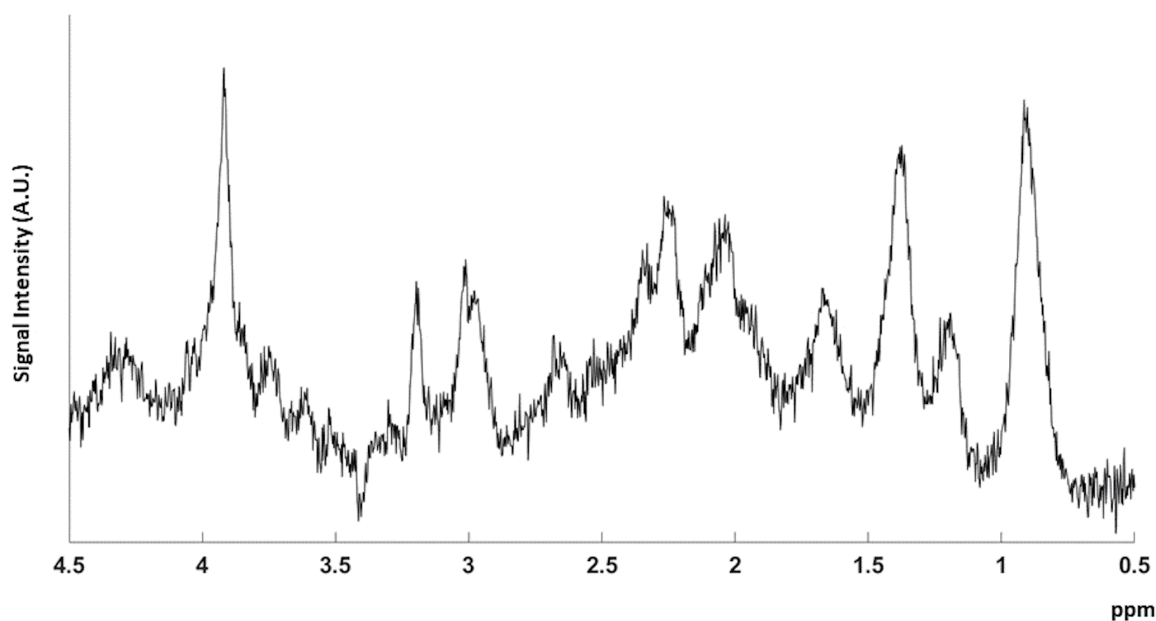
Afin de contourner ce problème, une base de MM est acquise expérimentalement grâce à une séquence d' « inversion recovery » (IR) (146). Ce type d'approche repose sur la différence de T<sub>1</sub> entre les métabolites (T<sub>1</sub>>1400 ms sauf pour la tCr à 4 ppm dont le T<sub>1</sub> vaut 1156 ms) et les MM (T<sub>1</sub>=630-750 ms à 11.7 T). L'aimantation est inversée par une impulsion 180° préalablement au lancement de la séquence STE-LASER avec des paramètres Δ/δ identiques à ceux utilisés lors d'une expérience de diffusion classique. Le temps de repousse des MM étant bien plus court que celui des métabolites, l'inversion a pour effet de supprimer la contribution des métabolites au spectre final. Un exemple de spectre de MM est disponible en **Figure II-6**.

En pratique, une contribution de la tCr à 4 ppm peut être toujours visible dans le cas d'une simple IR. Nous utilisons par conséquent une double IR (147,148) dont les temps d'inversion ont été optimisés afin de minimiser la contribution de tCr (T<sub>1</sub>/T<sub>2</sub> = 2200/ 730 ms). De plus, le signal des métabolites est atténué par l'ajout d'une pondération en diffusion supplémentaire de



10 ms/ $\mu\text{m}^2$ . Le signal des MM étant peu intense, le temps d'acquisition est relativement long (17 min pour 256 scans moyennés).

Enfin, on peut relever ici que la « bosse » des MM à 0.9 ppm constitue un bon contrôle expérimental lors d'une expérience de diffusion. En effet, en raison de la faible diffusivité des MM et en l'absence de tout artefact, il est attendu que son intensité reste relativement stable en fonction de  $b$  contrairement à ce qui est attendu pour les résonances des métabolites.



**Figure II-6 : Exemple d'un spectre de macromolécules obtenu à partir de cinq acquisitions chez la souris dans un voxel positionné dans l'hippocampe de dimensions  $4 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$ .**

#### II.2.v. DEROULE D'UNE EXPERIENCE EN PRATIQUE

Afin d'obtenir la meilleure résolution spectrale possible, l'homogénéité du champ  $B_0$  est maximisée, d'abord par l'acquisition d'une carte de  $B_0$  permettant le réglage des shims de premier et second ordres, puis par un réglage itératif des shims de premier ordre dans le voxel d'intérêt. La largeur à mi-hauteur du pic de l'eau obtenue dans ces conditions est inférieure à 20 Hz. En raison d'une dérive fréquentielle du scanner au cours de l'expérience, les gradients de shim sont régulièrement réajustés au cours d'une session (toutes les 15 à 30 min environ). De plus, afin de pallier cette dérive, un navigateur fréquentiel, dont la résolution temporelle est égale au TR, est activé. Un dummy scan est systématiquement acquis afin de s'assurer que  $M_z$  soit toujours à l'état d'équilibre avant chaque acquisition.

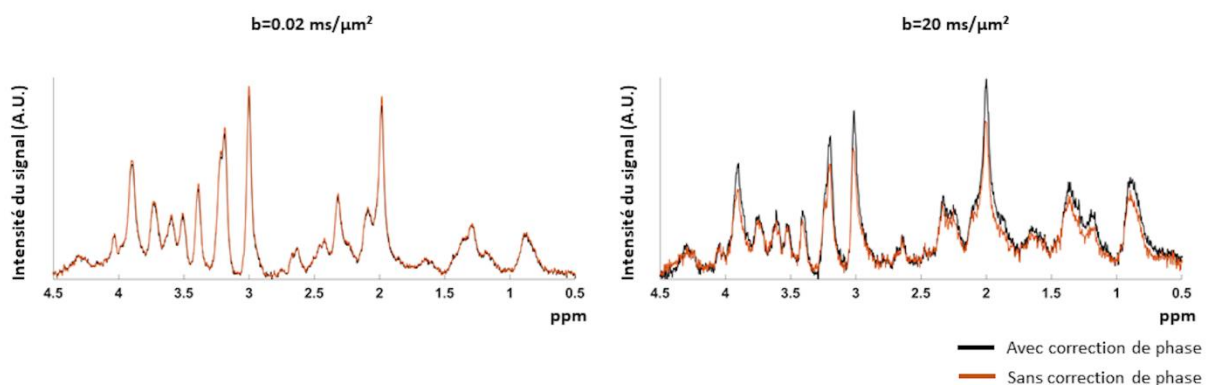
Les spectres sont acquis en quatre séries de 32 répétitions individuelles, soit un total de 128 acquisitions, pour chaque valeur de paramètres de diffusion ( $b$ ,  $t_d$ , etc...). Afin d'éviter tout biais temporel lié à une possible dégradation du signal au cours du temps, l'ordre d'acquisition des paramètres est modifié de façon aléatoire au sein de chaque série.

## II.3. ETAPES DE TRAITEMENT DU SIGNAL

### II.3.i. ETAPES DE POST-TRAITEMENT

Afin de compenser l'apparition d'une phase éventuelle survenant d'une acquisition à l'autre à cause du mouvement (149), les scans individuels sont rephasés entre eux avant d'être sommés, permettant ainsi de maximiser le signal. Le déphasage d'une répétition à l'autre augmente d'autant plus avec l'application d'une valeur de  $b$  élevée. Par conséquent, un biais important sur l'atténuation du signal est induit si le rephasage des spectres n'est pas correctement effectué (cf **Figure II-7**).

Pour chaque série de 32 répétitions, le rephasage ainsi que le recalage en fréquence des spectres sont réalisés sous Matlab en minimisant une fonction de coût correspondant à la différence entre chaque répétition et un signal de référence pris autour de la résonance du NAA à 2 ppm. Le bruit présent sur chaque répétition individuelle est artificiellement réduit par l'application d'un facteur d'élargissement de raie égal à 8 Hz (1b). Ce facteur est appliqué uniquement pour les opérations de recalage en phase et en fréquence et n'est pas conservé dans le spectre final. Les quatre séries sont à nouveau recalées en phase et en fréquence avant d'être sommées entre elles, permettant ainsi d'obtenir le spectre final.



**Figure II-7 : Exemple de spectres reconstruits à partir de 128 répétitions à  $b=0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  et  $b=20 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  avec (noir) et sans (orange) recalage en phase.**

Une étape de post-traitement supplémentaire peut être appliquée afin de supprimer la contribution en effectuant une décomposition en valeurs singulières (SVD), ainsi qu'initialement proposé par (150,151). En pratique, cette étape n'est nécessaire que pour les

mesures aux longs  $t_{ds}$  (pour  $t_d \geq 1$  ms) au cours desquelles l'aimantation de l'eau a le temps de repousser durant  $\Delta$  tandis que le signal des métabolites est d'autant plus atténué par la diffusion.

### II.3.ii. QUANTIFICATION DES METABOLITES SOUS LCMODEL

LCModel est un logiciel développé par Provencher (152,153) permettant de quantifier la contribution des différents métabolites dans un spectre *in vivo*. Pour ce faire, LCModel réalise une combinaison linéaire de spectres individuels acquis pour chaque métabolite. Cette approche permet de prendre en compte la totalité de l'information spectrale pour chaque métabolite, au lieu de simples résonances individuelles, offrant ainsi une analyse plus riche des spectres.

Préalablement à toute analyse, une base de métabolites est constituée pour une séquence donnée pour chaque valeur de TE et TM. Cette base peut être acquise expérimentalement *in vitro* pour chaque métabolite. Une approche plus rapide consiste cependant à simuler le signal de chaque métabolite grâce au formalisme de l'opérateur densité. Nous avons privilégié cette approche pour tous les métabolites dont les constantes de couplage et les déplacements chimiques sont déjà bien caractérisés (154,155).

Les métabolites inclus dans la base LCModel sont les suivants : acétate (Ace), alanine (Ala), aspartate (Asp), choline (Cho), créatine (Cr), acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), glutamine (Gln), glutamate (Glu), glycerophosphorylcholine (GPC), glutathion (GSH), myo-inositol (Ins), scyllo-inositol (sIns), lactate (Lac), N-acétylaspartate (NAA), acide N-acétylaspartylglutamique (NAAg), phosphorylcholine (pCho), phosphocréatine (PCr), taurine (Tau).

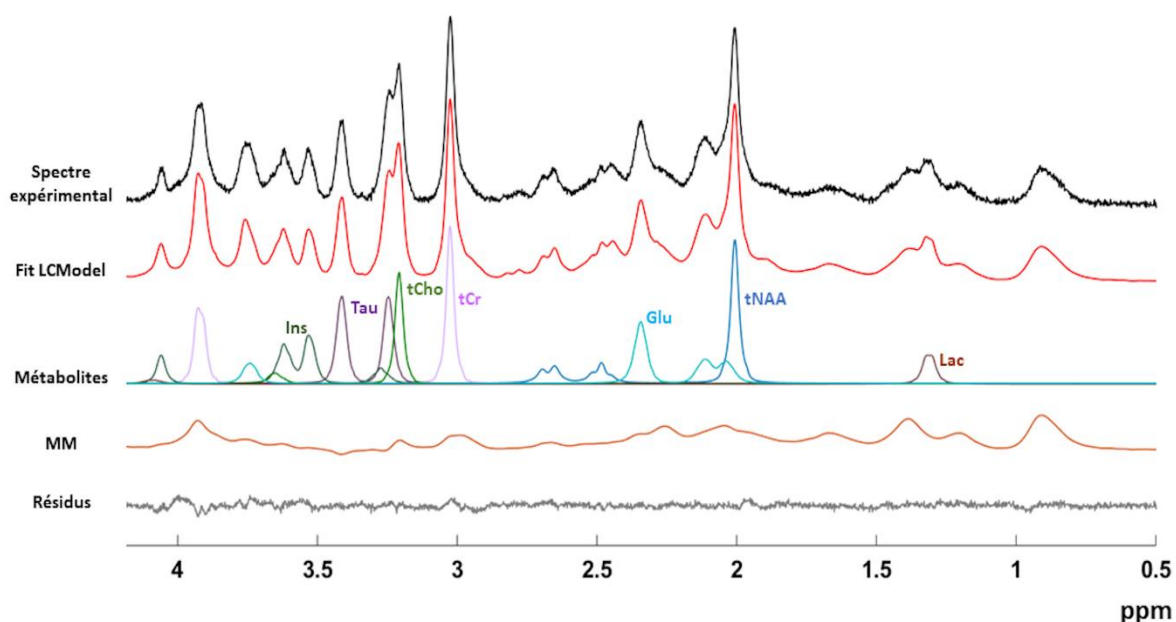
En raison de leur faible concentration, la glycine (gly), le glucose (glc) et le phosphatidyléthanolamine (PE) sont omis de l'analyse afin d'éviter des résultats peu réalistes. Dans le cas de l'étude sur le sucrose (cf **Chapitre IV**), le GSH est également exclu de l'analyse car il se superpose avec les résonances du sucrose vers 3.8 ppm. L'analyse est le plus souvent effectuée en 0.4 et 4.3 ppm. Dans le cas de l'étude sur le sucrose, une portion du spectre comprise entre 5.1 et 5.5 ppm est également analysée afin de prendre en compte la résonance du sucrose à 5.4 ppm.

En pratique, certains métabolites sont regroupés ensemble. C'est le cas de tNAA (NAA+NAAg), tCr (Cr + PCr), tCho (GPC+ PCho + Cho). De plus, des contraintes peuvent être appliquées sur les concentrations relatives de certains métabolites, comme ici à titre d'exemple pour l'étude du **Chapitre III** :

- Cho/GPC=  $0 \pm 0.01$
- PCho/GPC=  $0.5 \pm 0.01$

Bien que LCModel soit un outil très performant, il est primordial d'inspecter visuellement les résultats afin de s'assurer que le fit pour chaque métabolite est cohérent avec le spectre expérimental. Les bornes de Cramér-Rao (Cramér-Rao lower bounds, CRLB) retournées par LCModel pour chaque métabolite constituent également un bon indicateur de la fiabilité du fit effectué. Nous considérons ici que la quantification d'un métabolite est correcte pour une valeur de CRLB inférieure à 5%.

A titre d'exemple, la **Figure II-8** montre l'analyse d'un jeu de données sous LCModel.



**Figure II-8:** Ajustement des données obtenu sous LCModel et décomposition spectrale correspondant aux principaux métabolites. Un spectre expérimental de MM est également inclus dans la base LCModel.

---

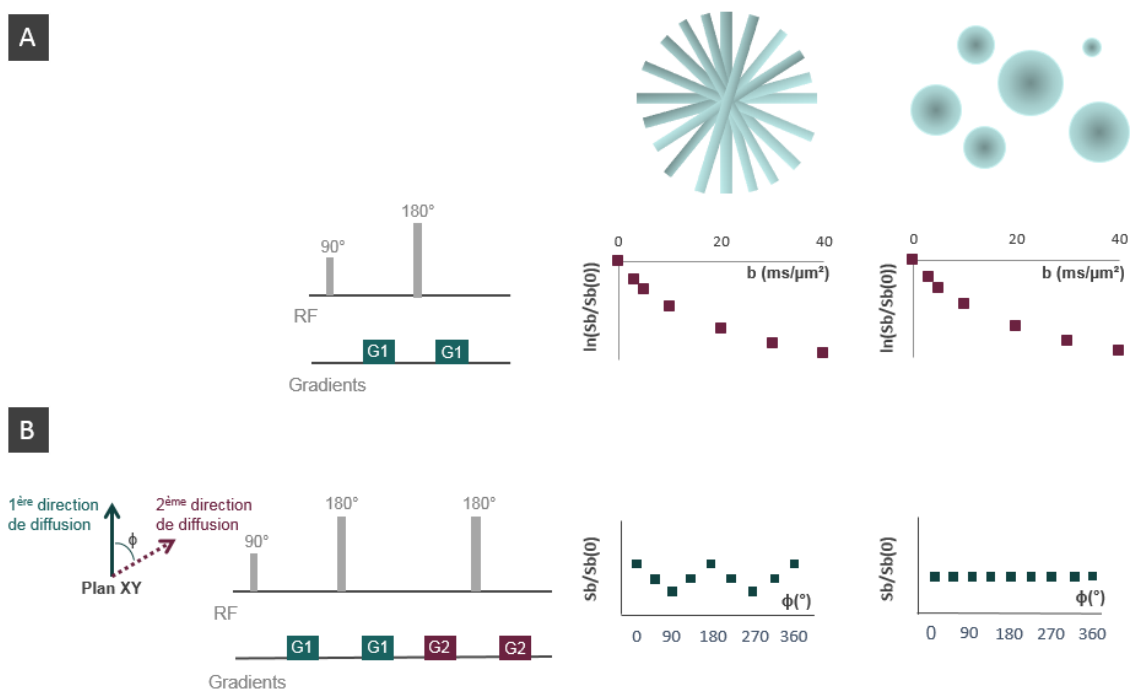
# CHAPITRE III. DOUBLE ENCODAGE EN DIFFUSION DANS LE CERVEAU DE SOURIS A 11.7 T: A QUELS PARAMETRES DE LA MICROSTRUCTURE SOMMES-NOUS SENSIBLES ?

## III.1. INTRODUCTION

Les méthodes de mesure exposées jusqu'ici présentent toutes le même inconvénient : le signal mesuré est dit « remarquablement peu remarquable ». Un même signal de diffusion peut en effet être interprété de façon satisfaisante par plusieurs modèles biophysiques et on parle alors de dégénérescence des solutions (137,156). A titre d'exemple, l'atténuation du signal aux hautes valeurs de  $b$  peut tout aussi bien être expliquée par des cylindres orientés de façon isotrope dans l'espace ou bien par une collection de sphères exhibant différents diamètres (**Figure III-1.A**).

Une façon de lever cette ambiguïté est de se tourner vers des schémas de séquence plus complexes tels que le double encodage en diffusion (157). Dans ce cas, deux blocs de diffusion sont appliqués successivement dans différentes directions et sont séparés par un temps de mélange TM. Les directions relatives entre chaque paire de gradient décrivent un angle  $\phi$  qui varie au cours de l'expérience entre  $0^\circ$  et  $360^\circ$ . Contrairement à l'approche plus conventionnelle de simple encodage en diffusion (SDE), cette approche permet d'être sensible à l'anisotropie microscopique ( $\mu A$ ) générée par la présence de barrières restrictives anisotropes rencontrées par les molécules au cours de la mesure de diffusion (158–160). En effet, une première analyse théorique proposée par Mitra examine deux régimes, à savoir un TM nul ou ultra-court vs un TM long (160). Il met ainsi en évidence que les expériences à longs TM sont particulièrement intéressantes afin de différencier les compartiments de forme isotrope (tels que les sphères ou un milieu tortueux défini par des pores de taille bien inférieure à la distance de diffusion) de compartiments de forme anisotrope (pores ellipsoïdes ou cylindres). Dans ce cas, Mitra

démontre qu'il existe une dépendance angulaire de l'intensité du signal RMN dans le cas de pores ellipsoïdes, mais pas dans le cas de pores sphériques. Dans ce régime, un maximum du signal est attendu pour les configurations parallèles et antiparallèles ( $\varphi=0$  et  $180^\circ$ ) tandis qu'un minimum de signal est attendu pour une configuration perpendiculaire ( $\varphi=90$  et  $270^\circ$ ). Cela permet donc de lever en partie la dégénérescence des solutions du point de vue de la modélisation des données (**Figure III-1.B**). Les mesures DDE peuvent de plus s'effectuer à des valeurs de  $b$  relativement faibles, ce qui est un avantage pour l'implémentation de cette approche sur des scanners cliniques dont l'intensité maximale des gradients est souvent limitée.



**Figure III-1 : Illustration du problème de dégénérescence des solutions. A) L'atténuation du signal aux hautes valeurs de  $b$  avec une seule direction d'encodage en diffusion peut aussi bien être expliquée par un modèle de cylindres orientés de façon isotrope dans l'espace et ou bien par des sphères de différents diamètres. B) L'ajout d'un deuxième bloc de diffusion dans une seconde direction d'encodage permet de lever l'ambiguïté décrite ci-dessus.**

Des mesures pionnières de DDE ont été effectuées avec succès *in vivo* par Shemesh *et al* afin de suivre de façon non invasive les altérations de la microstructure dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat (143). La modulation du signal en fonction de  $\varphi$  indique que les métabolites diffusent dans des compartiments allongés. De plus, les auteurs rapportent une augmentation importante de l'amplitude de la dépendance angulaire du signal RMN 24 heures après le début de l'ischémie pour tNAA, tCho et tCr, ce qui semble refléter une augmentation de la  $\mu\text{A}$ .

Shemesh et collègues tentent ensuite d'extraire quantitativement le diamètre des fibres cellulaires  $d_{\text{fibre}}$  à partir de la modulation angulaire du signal. Cette approche leur permet de distinguer les compartiments neuronal et glial (161) tandis que la valeur de  $d_{\text{fibre}}$  estimée pour le NAA ( $d_{\text{fibre}}=0.04 \mu\text{m}$ ) est plus faible que celle du myo-inositol ( $d_{\text{fibre}}=3.1 \mu\text{m}$ ). Ces résultats sont cohérents avec les valeurs de  $d_{\text{fibre}}$  déduites de mesures à hautes valeurs de  $b$  dans l'étude de Palombo et collègues (100).

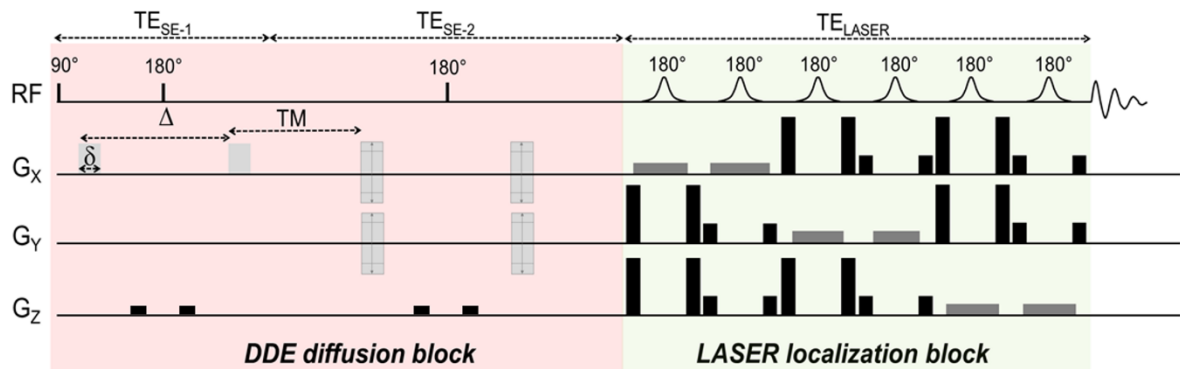
Dans cette étude, nous nous basons sur les travaux de Shemesh *et al* afin de revisiter les mesures de DDE avec deux différences méthodologiques principales : 1) des impulsions RF conventionnelles sont utilisées afin de détecter plus de métabolites au lieu des impulsions polychromatiques employées par Shemesh *et al* (impulsions de Shinar Le Roux ne sélectionnant que quelques résonances d'intérêt) et 2) des étapes de post-traitement des données telles que décrites dans le **Chapitre II** sont effectuées afin d'obtenir une quantification plus fiable du signal. Nous parvenons ainsi à quantifier six métabolites. L'analyse des données expérimentales avec un modèle de cylindres infinis orientés de façon isotrope, ainsi qu'employé par Shemesh *et al* (161), ne permet en revanche pas de décrire nos données de façon satisfaisante. Il semble par conséquent nécessaire de prendre en compte d'autres aspects de la microstructure afin de modéliser de façon plus précise les données DDE.



## III.2. METHODES SPECIFIQUES

### III.2.i. ACQUISITIONS EXPERIMENTALES

Les mesures DDE sont effectuées chez quatre souris sauvages C57BL/6J dans un voxel de 63  $\mu\text{L}$  positionné autour de l'hippocampe grâce à une séquence composée d'un double écho de spin comprenant les deux blocs de diffusion suivi d'un module de localisation LASER (TE<sub>SE</sub>/TE<sub>LASER</sub>=119/25 ms,  $\Delta/\delta/\text{TM}$ =30/4.5/29.5 ms). Cette séquence, dont une illustration est proposée en **Figure III-2**, est similaire à celle utilisée dans l'étude de Shemesh *et al* (143). L'utilisation d'une paire d'impulsions de refocalisation adiabatiques pour le double écho de spin entraîne un gain important du signal, notamment par rapport à l'utilisation d'un double écho stimulé.



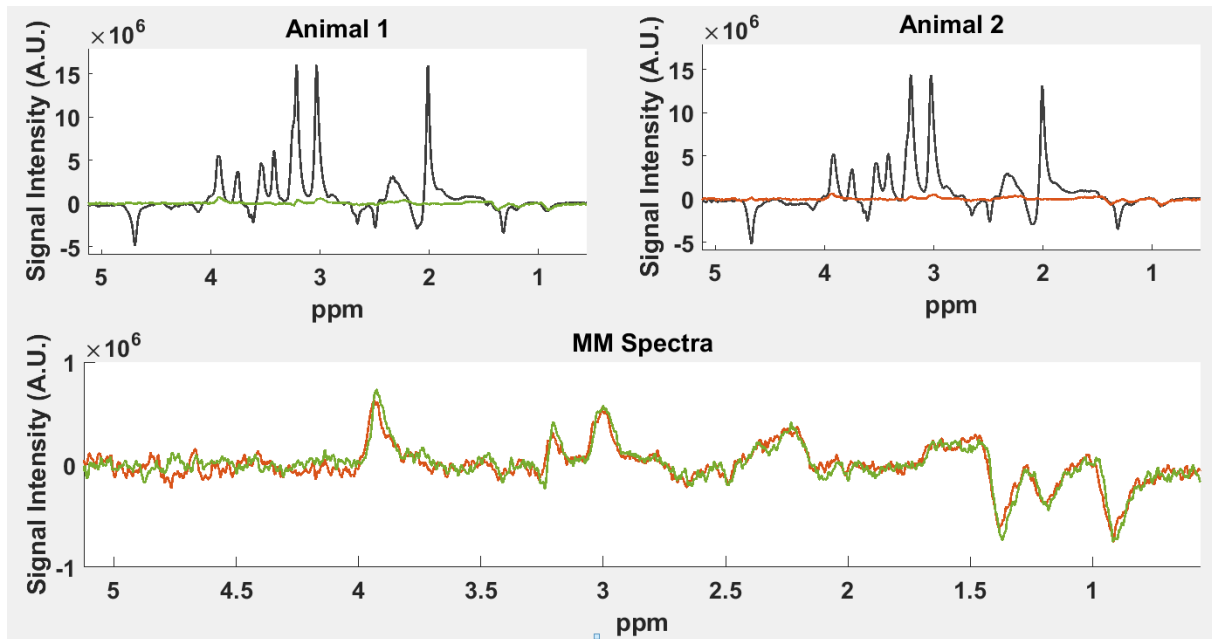
**Figure III-2** : Schéma de la séquence DDE-LASER. L'encodage DDE est effectué grâce à l'application de deux paires de gradients de diffusion de durée  $\delta$  et séparés par un temps de mélange TM. Le temps de diffusion  $t_d$  au sein de chaque bloc est défini par  $\Delta - \frac{\delta}{3}$  (ici égal à 28.5 ms). Le premier bloc de diffusion est appliqué le long de la direction x tandis que la direction d'application du second bloc de diffusion varie dans le plan XY, décrivant un angle  $\varphi$  allant de 0 à 360° par rapport à l'axe x. Un bloc de localisation LASER est ensuite appliqué, permettant ainsi d'éviter de possibles termes croisés entre les gradients de diffusion et ceux de sélection. Ici, TE<sub>SE-1</sub> est plus court que TE<sub>SE-2</sub> car il est nécessaire d'ajouter un délai supplémentaire au sein du deuxième bloc de diffusion afin de prendre en compte la durée du TM.

Une pondération en diffusion totale de 20 ms/ $\mu\text{m}^2$  ( $b=10$  ms/ $\mu\text{m}^2$  sur chaque bloc) est appliquée. La première paire de gradients de diffusion est appliquée selon X tandis que la direction d'application des gradients du second bloc varie dans le plan XY de façon à former un angle  $\varphi$  allant de 0 à 360° par incrément de 45°. Pour chaque valeur de  $\varphi$ , un total de 128 répétitions (réparties en quatre blocs de 32 répétitions entrelacées avec les autres valeurs de  $\varphi$ ) sont

acquises. L'atténuation du signal reportée dans ce travail correspond au rapport

$$\frac{S_{\varphi,b=20 \text{ ms}/\mu\text{m}^2}}{S_{\varphi=0,b=0.04 \text{ ms}/\mu\text{m}^2}}$$

Deux spectres de MM sont acquis et sommés avant inclusion dans la base LCModel, montrant une reproductibilité satisfaisante de la mesure (cf **Figure III-3**).



**Figure III-3 : En haut : Spectres de macromolécules obtenus par inversion-récupération chez deux animaux épousant parfaitement le spectre de métabolites correspondant. Certaines résonances de macromolécules sont en antiphase à cause de la J-modulation. Ligne du bas : Zoom sur les deux spectres de macromolécules. Le profil de MM apparaît similaire chez les deux sujets.**

Les scripts Matlab permettant d'effectuer le post-traitement des données ainsi que la base LCModel et fichier .CONTROL permettant d'effectuer l'analyse sont disponibles dans un répertoire github : <https://github.com/Meli64/DDE-data-processing>. Un jeu de données est également téléchargeable à titre d'exemple.

### III.2.ii. MODELISATION DES DONNEES

Les données expérimentales pour chaque métabolite sont ajustées à l'équation phénoménologique  $A + B \times \cos(2\varphi)$  de façon similaire à (143) grâce à une approche de Monte Carlo. La somme des carrés résiduels obtenue lors du premier ajustement est utilisée en tant qu'écart-type afin d'induire aléatoirement du bruit gaussien dans nos données expérimentales dans le but de répéter le processus d'ajustement des données. Ce procédé est effectué 10000 fois et les coefficients A et B ainsi obtenus correspondent donc à la valeur moyenne obtenue

sur tous les jeux de données générés. Le rapport  $\frac{B}{A}$  est ensuite utilisé pour quantifier l'amplitude de la modulation angulaire du signal par rapport à l'atténuation globale du signal RMN.

De plus, des simulations de signaux DDE basées sur le formalisme matriciel développé par Callaghan (162) sont effectuées dans des cylindres infinis orientés de manière isotrope dans l'espace. Ces simulations sont réalisées grâce à la boîte à outils MISST disponible sous Matlab et développée par l'équipe de I. Drobnjak basée au University College London (163–165). Les simulations sont effectuées pour des valeurs de coefficients de diffusion libre ( $D_{\text{free}}$ ) allant de 0.1 à 0.5  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$  et pour  $d_{\text{fibre}}$  compris entre 0.1 et 5  $\mu\text{m}$ . Cette librairie de signaux générées pour les différentes combinaisons de valeurs de  $d_{\text{fibre}}/D_{\text{free}}$  est ensuite comparée aux données expérimentales de façon similaire à (161). Le calcul des résidus des moindres carrés est utilisé comme fonction de coût. Les erreurs sur les paramètres estimés sont calculées grâce à des simulations de Monte Carlo, ainsi que décrit précédemment.

## III.3. RESULTATS

### III.3.i. MODULATION DU SIGNAL DDE POUR LES METABOLITES

#### CEREBRAUX

La **Figure III-4.A** montre une série de spectres DDE acquis chez une souris tandis que la **Figure III-4.B** propose une décomposition spectrale obtenue sous LCModel pour  $\varphi=0^\circ$ . L'atténuation du signal peut être quantifiée de façon fiable pour tNAA, tCr, Ins, tCho et Tau avec des valeurs de CRLB inférieure à 3% pour toutes les valeurs de  $\varphi$ . Bien que le signal du tNAA comprenne à la fois le NAA et le NAAG, il est raisonnable de considérer que la diffusion de tNAA reflète majoritairement la compartimentation du NAA car le NAAG ne représente que 8 à 11% du signal tNAA. La résonance de lactate vers 1.35 ppm est également quantifiée, mais avec une précision plus faible (valeurs de CRLB d'environ 10%).

La **Figure III-5** expose la dépendance angulaire du signal pour un TM égal à 29.5 ms pour les six métabolites ainsi que les MM. Dans cette figure, les points expérimentaux sont ajustés à la fonction  $A + B \times \cos(2\varphi)$  apparaissant en gris clair. Les valeurs très basses des écart-types obtenus sur nos quatre jeux de données peuvent également être appréciées. Les résultats sont cohérents avec les avancées d'Özarslan qui confirme le travail de Mitra et propose une expansion de Taylor de l'atténuation du signal RMN jusqu'au quatrième ordre, montrant ainsi que la dépendance angulaire du signal de diffusion dans des cylindres finis peut être caractérisée par la fonction  $A + B \times \cos(2\varphi)$  dont les coefficients peuvent être reliés au diamètre et à la longueur des fibres (159).

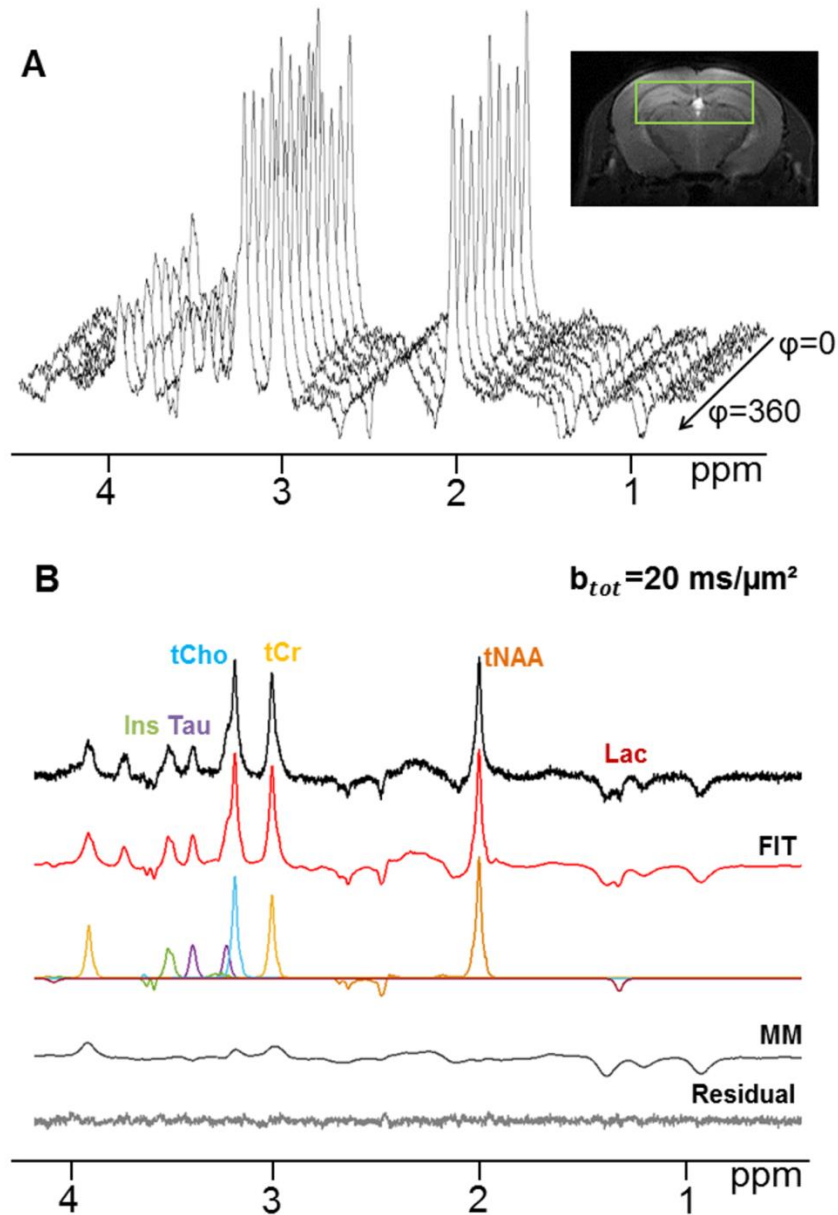
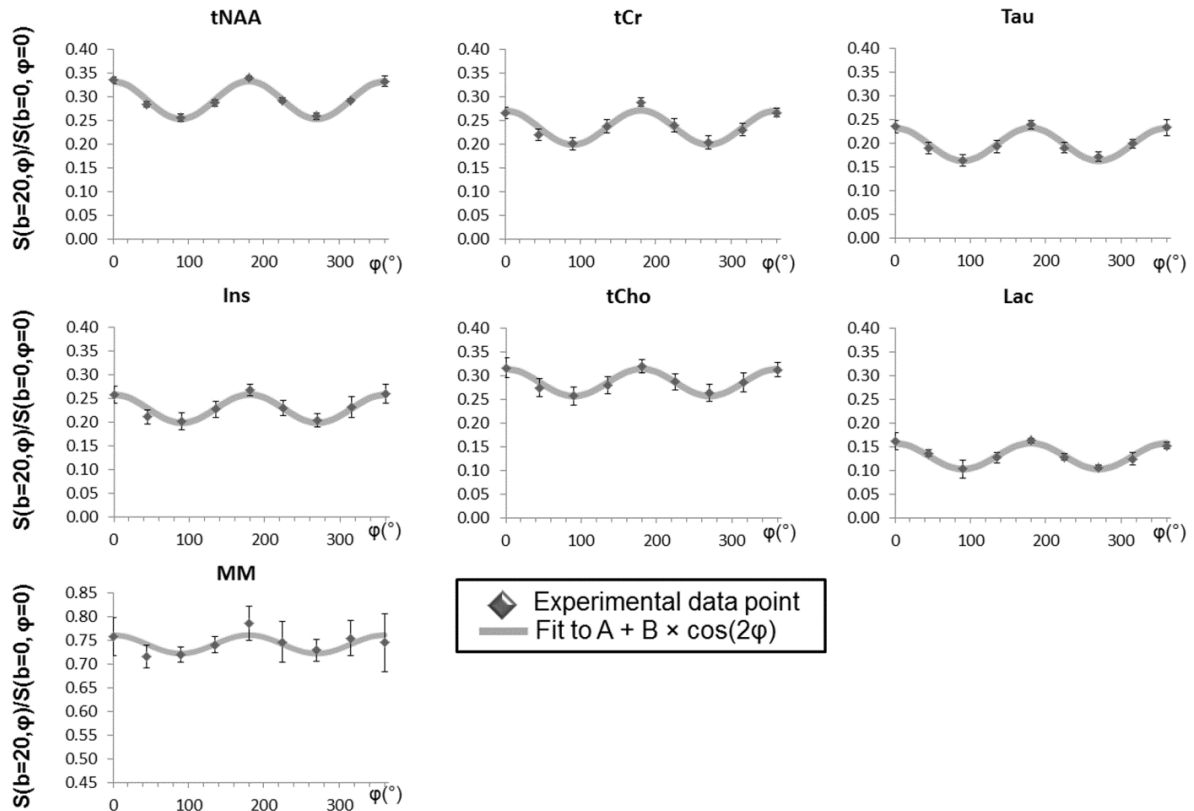


Figure III-4 : Exemple de données expérimentales. A) Jeu de données DDE sur lequel la modulation angulaire de l'amplitude du signal en fonction de  $\phi$  est clairement visible. L'encart en haut à droite montre une image anatomique (coupe coronale) avec le voxel de  $63 \mu\text{L}$  positionné au niveau de l'hippocampe. B) Décomposition spectrale sous LCModel d'un spectre pondéré en diffusion (seuls les six métabolites quantifiés dans cette étude ainsi que les MM sont montrés). Le fit LCModel global (en rouge) est également présenté. Ce dernier est obtenu grâce une base comprenant un spectre de MM expérimental ainsi que 18 métabolites générés grâce à des routines de simulation s'appuyant sur le formalisme de la matrice densité.



**Figure III-5 : Modulation de l'intensité du signal en fonction de  $\varphi$  pour les six métabolites d'intérêt ainsi que les MM moyennée sur les 4 animaux. Chaque point expérimental correspond au rapport de l'intensité du signal obtenu pour  $b=20 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  pour une valeur donnée de  $\varphi$  sur l'intensité du signal pour  $b=0.04 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  et  $\varphi=0^\circ$ . La ligne grise correspond à la fonction  $A+B \times \cos(2\varphi)$  ajustée aux données expérimentales. Les données sont acquises sur quatre souris. Les barres d'erreur correspondent aux valeurs d'écart type.**

Les coefficients A et B sont reportés dans la partie supérieure de la **Table III-1**. On peut remarquer que l'amplitude de la modulation du signal DDE –réflétée ici par B- est plus importante pour tNAA (compartiment neuronal) que pour les marqueurs non-spécifiques (tCr, Tau) ou gliaux (tCho, Ins). Cette observation peut être interprétée de prime abord par des fibres neuronales plus fines, exhibant par conséquent une  $\mu\text{A}$  plus importante, que les fibres gliales (100,161). Cette vision simplifiée sera cependant remise en question par la suite.

<b>METABOLITES</b>							
	<b>tNAA (neuronal marker)</b>	<b>tCr</b>	<b>Tau</b>	<b>Ins (glial marker)</b>	<b>tCho (glial marker)</b>	<b>Lac</b>	<b>MM</b>
<b>Ajustement à <math>A + B \times \cos(2\varphi)</math></b>							
<b>Offset (A)</b>	0.293±0.004	0.235±0.012	0.197±0.011	0.228±0.016	0.286±0.018	0.130±0.004	0.742±0.030
<b>Modulation d'amplitude (B)</b>	0.040±0.004	0.036±0.004	0.035±0.005	0.030±0.003	0.029±0.003	0.028±0.006	0.020±0.012
<b>Rapport B/A</b>	<b>0.137±0.014</b>	<b>0.155±0.020</b>	<b>0.177±0.024</b>	<b>0.132±0.015</b>	<b>0.101±0.014</b>	<b>0.212±0.051</b>	<b>0.026±0.016</b>
<b>Fonction de coût</b>	<b>0.018±0.006</b>	<b>0.027±0.004</b>	<b>0.020±0.004</b>	<b>0.024±0.006</b>	<b>0.017±0.006</b>	<b>0.029±0.002</b>	<b>0.055±0.019</b>
<b>Ajustement au modèle des cylindres infinis</b>							
<b>D<sub>free</sub> (μm<sup>2</sup>/ms)</b>	0.20±0.02	0.22±0.04	0.25±0.03	0.21±0.03	0.17±0.02	0.34±0.06	/
<b>d<sub>fibre</sub> (μm)</b>	3.22±0.29	3.89±0.43	4.20±0.26	4.14±0.15	3.76±0.30	4.80±0.27	/

**Table III-1 : Partie supérieure : Coefficients A et B obtenus pour chaque métabolite après ajustement à la fonction  $A+B \times \cos(2\varphi)$  (valeurs moyennes  $\pm$  s.d.). Le coefficient B est plus élevé pour les marqueurs neuronaux que gliaux. La fonction de coût est calculée selon  $c = \sqrt{\sum_{\varphi} (x_{\varphi} - y_{\varphi})^2}$ ,  $x_{\varphi}$  et  $y_{\varphi}$  correspondant respectivement aux données ajustées et expérimentales. Ici, la moyenne et l'écart-type de c augmentent clairement pour les MM, soulignant une mauvaise qualité de l'ajustement due à une faible modulation du signal. *Partie inférieure : Valeurs de  $D_{free}$  et  $d_{fibre}$  correspondant au meilleur ajustement pour chaque métabolite à la base de signaux simulées dans un modèle de cylindres infinis. L'erreur sur  $D_{free}$  et  $d_{fibre}$  est estimée par simulations de Monte Carlo. De manière générale,  $D_{free}$  apparaît sous-estimé et  $d_{fibre}$  surestimé.***

Il est intéressant de noter que le lactate présente une atténuation du signal plus prononcée par rapport aux autres métabolites. Ce phénomène peut s'expliquer par une diffusion du lactate intrinsèquement plus rapide (car il s'agit d'une petite molécule), mais suggère également la

contribution significative d'un potentiel pool de lactate extracellulaire exhibant des propriétés de diffusion plus rapide, proches de la diffusion libre (135). En accord avec cette idée, on peut remarquer que la modulation angulaire du lactate est moins prononcée que pour les autres métabolites, ce qui pourrait indiquer que, contrairement à l'intérieur des fibres, les corrélations spatiales entre des directions de diffusion consécutives seraient plus rapidement perdues dans l'ECS.

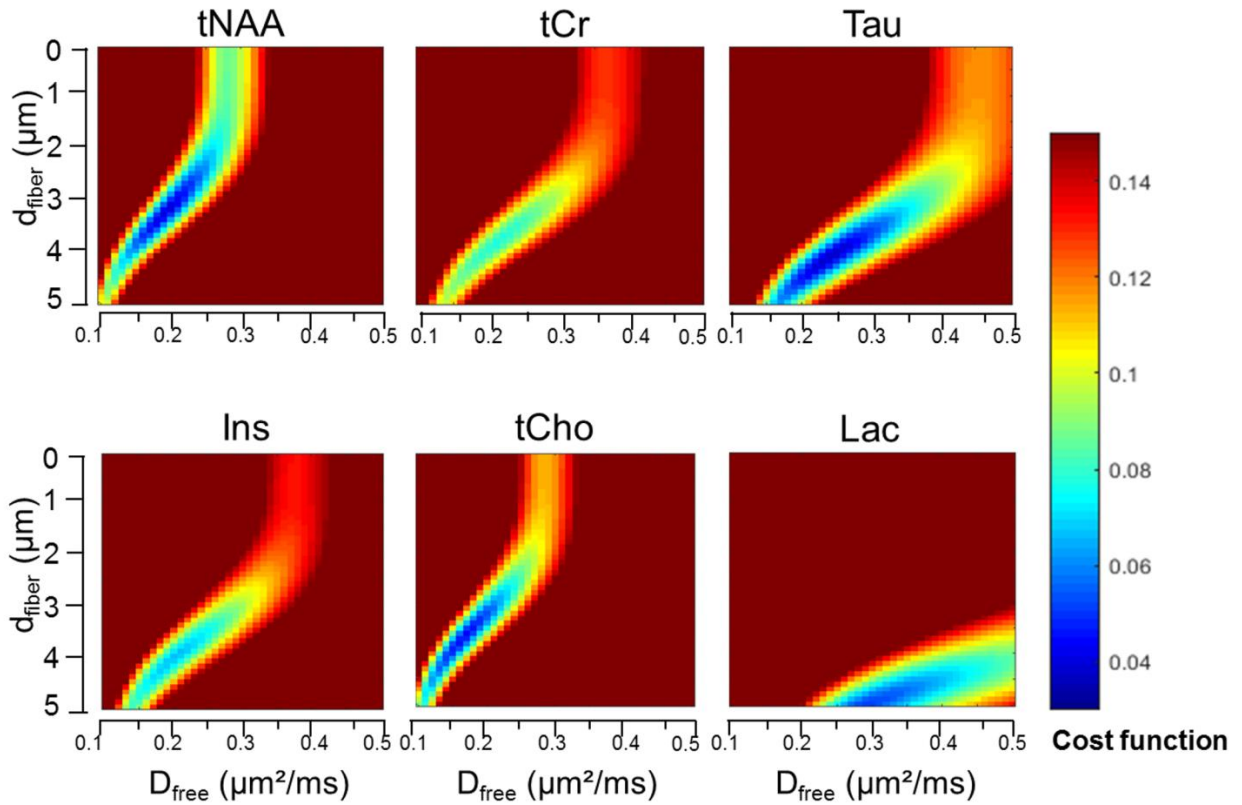
Enfin, il peut être observé que le signal des MM est peu atténué tandis que la modulation angulaire du signal reste très modérée. Ce phénomène est cohérent avec le fait que le signal des MM provient d'un pool de molécule diffusant lentement.

La modulation normalisée  $\frac{B}{A}$  est également rapportée pour chaque métabolite dans la **Table III-1** et sera utilisée par la suite afin de comparer les résultats expérimentaux aux simulations.

### III.3.ii. ESTIMATION DE $D_{\text{FIBRE}}$ : SIMULATIONS DANS DES CYLINDRES INFINIS SOUS MISST

Des cartes de chaleur calculées à partir des résidus de moindres carrés entre les données expérimentales pour chaque métabolite et les simulations DDE effectuées sous MISST sont présentées dans la **Figure III-6** en fonction  $D_{\text{free}}$  et  $d_{\text{fibre}}$ . Ces cartes révèlent un aspect similaire pour tous les métabolites, excepté le lactate. Les valeurs de  $D_{\text{free}}$  et  $d_{\text{fibre}}$  correspondant au meilleur ajustement des données pour chaque métabolite sont rapportées dans la partie inférieure de la **Table III-1**. Les valeurs de  $d_{\text{fibre}}$  sont comprises entre 3 et 5  $\mu\text{m}$  tandis que  $D_{\text{free}}$  est estimé aux alentours de  $\sim 0.2 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ . Ces valeurs ne sont guère en accord avec celles précédemment publiées dans la littérature. Des mesures effectuées aux hautes valeurs de  $b$  ou à  $t_d$  ultra-court rapportent plutôt des valeurs en-deçà de 3  $\mu\text{m}$  pour  $d_{\text{fibre}}$  (100,101,104,166), ce qui concorde également avec les estimations histologiques réalisées pour les axones et les dendrites, ainsi que les prolongements astrocytaires (119). Enfin, bien qu'il soit bien plus difficile de comparer  $D_{\text{free}}$  à sa valeur biologique réelle, la plupart des précédents travaux estiment ce paramètre comme étant supérieur à  $0.3 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  (jusque  $\sim 0.6 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  dans certains cas) (100,101,104,118,166,167).

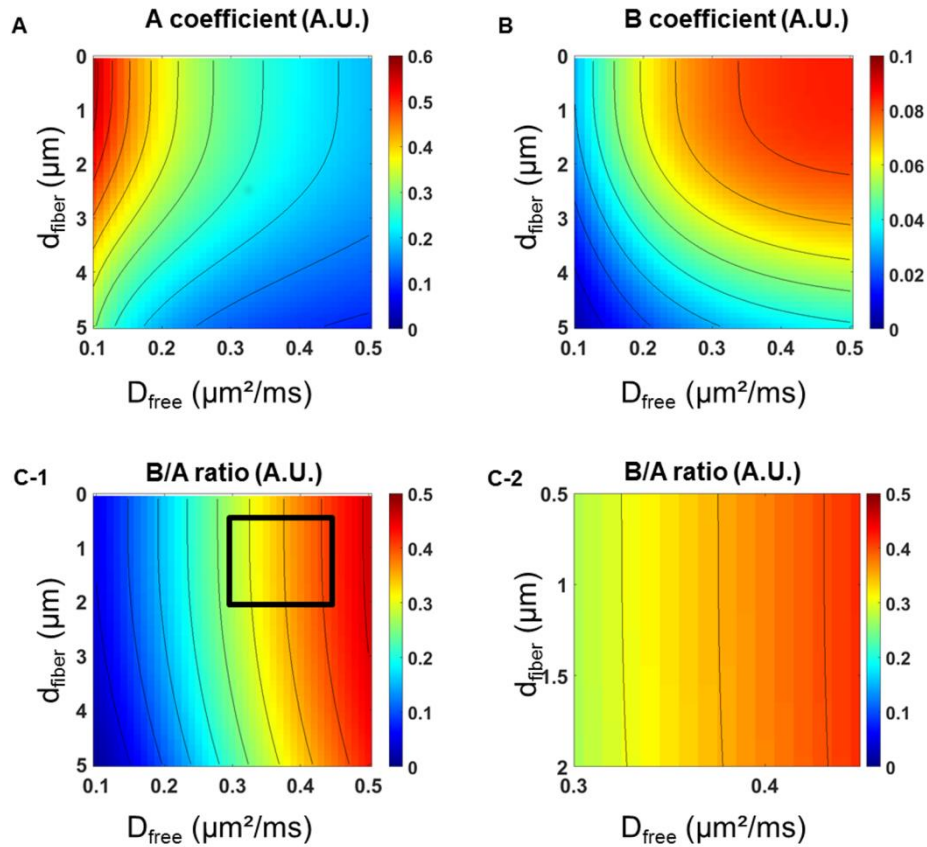




**Figure III-6:** Cartes de chaleur de la fonction de coût estimée pour chaque valeur de  $D_{\text{free}}$  (0.1-0.5  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ ) et  $d_{\text{fibre}}$  (0.1-5  $\mu\text{m}$ ) pour chaque métabolite en utilisant un modèle (simulé sous MISST) de cylindres infinis orientés de façon isotrope dans l'espace. La fonction de coût est calculée chez chaque sujet selon  $c = \sqrt{\sum_{\varphi} (x_{\varphi} - y_{\varphi})^2}$ ,  $x_{\varphi}$  et  $y_{\varphi}$  correspondant respectivement aux données ajustées et expérimentales.

Ces résultats inattendus nous amènent à explorer plus en détails l'effet de  $d_{\text{fibre}}$  sur l'amplitude de la modulation angulaire du signal. Par conséquent, nous avons réexaminés avec soin les simulations faites sous MISST, en particulier pour des  $D_{\text{free}}$  allant de 0.3 à 0.45  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$  et des  $d_{\text{fibre}}$  compris entre 0.5 et 2  $\mu\text{m}$ . Plus précisément, chaque signal de la base est ajusté à la fonction  $A + B \times \cos(2\varphi)$ , ainsi qu'effectué pour les métabolites. La **Figure III-7** montre les valeurs de  $A$ ,  $B$  et  $\frac{B}{A}$  pour chaque combinaison de  $D_{\text{free}}/d_{\text{fibre}}$ . Ces résultats révèlent qu'aucune variation du rapport  $\frac{B}{A}$  n'est obtenue en faisant varier  $d_{\text{fibre}}$ , tandis que  $D_{\text{free}}$  semble avoir un effet

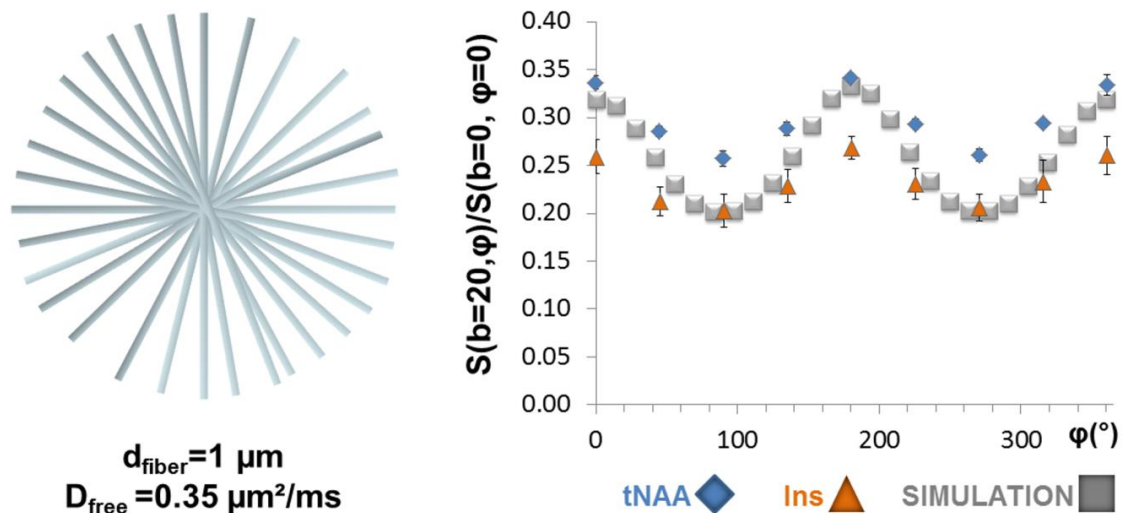
plus important sur la modulation angulaire du signal. Ces résultats illustrent donc la faible sensibilité à  $d_{\text{fibre}}$  des mesures DDE pour des valeurs de  $d_{\text{fibre}}$  inférieures à 2  $\mu\text{m}$ .



**Figure III-7 : Coefficients A et B obtenus en ajustant les données simulées sous MISST à la fonction  $A+B \times \cos(2\phi)$ . A) Variation du coefficient A en fonction de  $D_{\text{free}}$  et  $d_{\text{fibre}}$ . Comme attendu, l'atténuation globale du signal augmente avec  $D_{\text{free}}$  ainsi que dans des fibres plus larges. B) Variation du coefficient B en fonction de  $D_{\text{free}}$  et  $d_{\text{fibre}}$ . L'amplitude de modulation angulaire de l'intensité du signal est impactée à la fois par  $D_{\text{free}}$  et  $d_{\text{fibre}}$ , ce qui rend l'utilisation de ce paramètre pour l'estimation de  $d_{\text{fibre}}$  pour le moins délicate. La sensibilité de B à des valeurs de  $d_{\text{fibre}}$  inférieures à 3  $\mu\text{m}$  pour un  $D_{\text{free}}$  donné apparaît limitée. C-1) Rapports  $\frac{B}{A}$  en fonction de  $D_{\text{free}}$  et  $d_{\text{fibre}}$ . C-2) Zoom sur une plage de données réalistes d'un point de vue biologique (délimitée par le carré noir en C-1) avec  $D_{\text{free}}$  compris entre 0.3 et 0.45  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$  et  $d_{\text{fibre}}$  entre 0.5 et 2  $\mu\text{m}$ . Les rapports  $\frac{B}{A}$  ne varient pas en fonction de  $d_{\text{fibre}}$ , ce qui confirme la faible sensibilité de la DDE pour ce paramètre.**

De façon frappante, les valeurs obtenues pour le rapport  $\frac{B}{A}$  sont par ailleurs bien plus élevées pour les signaux simulés (0.26-0.42) que pour les métabolites (0.101-0.212). Ces résultats sont

en accord avec ceux de la **Figure III-8** qui montre la superposition des données expérimentales obtenues pour tNAA et Ins avec celle du signal simulé pour un modèle de cylindres infinis de  $1\ \mu\text{m}$  de diamètre ( $D_{\text{free}}=0.35\ \mu\text{m}^2/\text{ms}$ ). Il apparaît clairement que la modulation angulaire du signal de nos données expérimentales (quantifiée ici par le ratio  $\frac{B}{A}$ ) est bien moindre que celle attendue si l'on s'en réfère à des simulations basées sur des paramètres réalistes de la microstructure dans un modèle de cylindres infinis orientés de façon isotrope dans l'espace.



**Figure III-8 : Représentation du modèle de cylindres infinis orientés de façon isotrope dans l'espace sous MISST. Le signal simulé pour  $d_{\text{fibre}}=1\ \mu\text{m}$  et  $D_{\text{free}}=0.35\ \mu\text{m}^2/\text{ms}$  (carrés gris) est superposé aux données expérimentales obtenues pour tNAA (diamants bleus) et Ins (triangles oranges). L'amplitude de la modulation du signal est nettement plus prononcée dans le cas de la simulation que pour les métabolites.**

## III.4. DISCUSSION

### III.4.i. SENSIBILITE LIMITEE AU DIAMETRE DES FIBRES CELLULAIRES

Les cartes de chaleur de la fonction de coût présentées en **Figure III. 6** montrent qu'un minimum global est atteint pour des valeurs non réalistes de  $d_{\text{fibre}}$  et  $D_{\text{free}}$  pour tous les métabolites. Dans leur étude, Shemesh *et al* sont capables d'inférer des valeurs biologiquement plausibles pour ces deux paramètres (161). Nous sommes au contraire incapables de reproduire de tels résultats. Nous pouvons malgré tout noter ici des différences expérimentales entre les deux mesures pouvant partiellement expliquer ce constat :

- Shemesh *et al* ont utilisé des temps de diffusion bien plus longs de 60 ms pour chaque bloc de diffusion combinés à des valeurs de  $b$  plus faibles environ égales à la moitié de celles utilisées dans notre étude ;
- Les acquisitions sont réalisées à ultra-haut champ (21.1 T) tandis que le TE se retrouve fortement rallongé en raison du  $t_d$  plus long, induisant par conséquent une pondération  $T_2$  importante (et non comparable avec l'étude de Ligneul *et al* montrant l'absence de corrélation entre pondération  $T_2$  et mesures de diffusion (101)) pouvant potentiellement filtrer la contribution de pools de molécules moins mobiles ;
- Shemesh *et al* quantifient les métabolites par intégration des pics correspondants, justifiant cette approche par l'emploi d'impulsions de refocalisation sélectives qui offrent une suppression de l'eau très satisfaisante (ligne de base spectrale relativement plate) et simplifient le spectre en excitant seulement quelques résonances (nous considérons néanmoins cette méthode de quantification beaucoup moins fiable que LCModel).

Pour cette étude, nous avons travaillé à plus bas champ mais bénéficié de la remarquable sensibilité d'une antenne cryogénique. Nous avons privilégié des impulsions large-bande permettant d'exciter toute la gamme de 0.5 à 4.5 ppm afin de détecter plus de métabolites. Nous avons par ailleurs minimisé les potentiels biais de quantification grâce à l'application d'une correction en phase et en fréquence d'une répétition à l'autre lors de la reconstruction du signal, la prise en compte des MM ainsi que l'utilisation de LCModel. Par conséquent, les écarts types obtenus sur nos quatre jeux de données sont très faibles, ce qui est plus favorable à la détection de potentielles différences entre données expérimentales et simulées.

Notre étude est en revanche limitée par le fait que nos mesures de diffusion n'ont pas été effectuées dans différents plans (nous nous sommes limités au plan XY pour le balayage DDE). Nous n'avons donc pas évalué en quoi l'orientation du plan pourrait possiblement affecter la modulation du signal. Néanmoins, une précédente étude de Ligneul *et al* montre que les propriétés de diffusion mesurées en SDE dans un grand voxel de spectroscopie similaire à celui que nous avons employé ne semblent pas refléter d'anisotropie à l'échelle macroscopique (101). Il n'est pas déraisonnable de postuler ici que cette observation est toujours valide dans le contexte des mesures DDE. Ce point a également été vérifié chez le rat par Shemesh et collègues, aboutissant à la même conclusion (161).

Les résultats montrés en **Figure III-7** suggèrent fortement que les mesures DDE offrent une sensibilité limitée à  $d_{\text{fibre}}$ , et ce en dépit de l'utilisation d'une valeur de  $b$  relativement élevée de  $20 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ . On pourrait argumenter en rappelant que le signal de diffusion est intrinsèquement moins sensible aux fibres de plus petit diamètre, ainsi que souligné par Burcaw *et al* (168). Cela est néanmoins toujours valable dans le cas des mesures SDE pour lesquelles Ligneul *et al* n'ont pas extrait de valeurs si peu réalistes pour  $d_{\text{fibre}}$  (101). Il est par conséquent peu probable qu'un biais dû à une sensibilité supérieure aux fibres plus larges puisse complètement expliquer nos données.

Une meilleure sensibilité à  $d_{\text{fibre}}$  peut être obtenue en optimisant la forme des gradients. Cette approche, proposée par Drobnjak et collègues, s'est montré prometteuse pour distinguer de plus petits axones de rayon inférieur à  $5 \mu\text{m}$  grâce à l'utilisation de gradients de fréquence croissante (163). Shemesh a également exploré le potentiel de la DDE couplée à des gradients oscillants (DODE) dans la moelle épinière à 16.4 T. Il montre ainsi une sensibilité supérieure au diamètre axonal grâce à ce type de mesure. Ces résultats sont en accord avec l'idée que les gradients oscillants, qui permettent d'atteindre un  $t_d$  plus court, sont d'avantage sensibles aux déplacements des spins se produisant perpendiculairement à l'axe principal de diffusion (169).

Une étude réalisée par Ianus *et al* en imagerie DDE et DODE suggère que des modèles géométriques simples tels que les cylindres infinis seraient insuffisants pour estimer précisément l'anisotropie des propriétés de diffusion à l'échelle microscopique. La nécessité de prendre en considération des structures secondaires le long de l'axe des fibres cellulaires est par ailleurs soulignée (170). Les paramètres expérimentaux, tels que la valeur de  $b$  ou encore  $t_d$  et  $TM$ , sont également désignés comme des sources de biais potentiels interférant avec la quantification de la  $\mu A$  cellulaire.

Les valeurs de paramètres irréalistes extraites par la modélisation des données, ainsi que l'écart important entre les données expérimentales et simulées (cf **Figure III-8**), indiquent clairement que le modèle des cylindres infinis ne semble pas décrire nos données de façon satisfaisante pour des valeurs de  $D_{\text{free}}$  et  $d_{\text{fibre}}$  réalistes d'un point de vue biologique. En particulier, la modulation angulaire de l'intensité du signal mesurée expérimentalement apparaît trop faible. Cela suggère que la signature DDE des métabolites pourrait contenir une information plus complexe reflétant la contribution de plusieurs aspects de la microstructure autres que  $d_{\text{fibre}}$ .

#### III.4.ii. A QUEL ASPECT DE LA MICROSTRUCTURE CELLULAIRE SOMMES-NOUS SENSIBLES ?

Afin d'identifier le ou les aspects de la morphologie cellulaire pouvant expliquer au mieux la modulation angulaire du signal observée, nous considérons des modèles cellulaires 3D avec des degrés additionnels de complexité. Notre hypothèse de départ est que l'amplitude relativement faible de la modulation angulaire est due à une perte de la corrélation spatiale entre les directions des mesures de diffusion successives. Deux scénarios pourraient expliquer ce phénomène :

- une fraction non-négligeable de métabolites diffusant dans un compartiment isotrope restreint tel que le corps cellulaire ;
- la présence d'embranchements le long des fibres cellulaires entraînant un changement brusque de trajectoire pour les métabolites passant d'une fibre à l'autre.

Afin d'explorer la validité de ces hypothèses, des simulations de Monte Carlo sont réalisées dans des cellules cérébrales de morphologie réaliste obtenue grâce à un modèle génératif récemment introduit par Palombo et collègues (171). Ces simulations ont d'ailleurs été effectuées par Marco Palombo. Brièvement, le modèle permet de générer des modèles 3D de cellules réalistes de façon contrôlée et flexible à partir d'un choix de 12 caractéristiques de la microstructure telles que le rayon du soma, le rayon des fibres, le nombre d'embranchement, l'angle de bifurcation d'une branche à l'autre, etc. Cinquante cellules synthétiques sont ainsi générées et la diffusion de 3000 particules est ensuite simulée dans Camino (172) pour une valeur de  $D_{\text{free}}$  donnée et un pas de temps de 20  $\mu\text{s}$ . D'après les trajectoires de spins résultantes, le signal DDE est calculé numériquement par une approche d'accumulation de phase en utilisant les mêmes paramètres de séquence que ceux utilisés expérimentalement.

Pour toutes les simulations décrites par la suite, huit fibres de longueur finie sont connectées à un soma central. Etant donné que nous ayons déjà vu que ce paramètre a peu d'impact sur la

modulation DDE,  $d_{\text{fibre}}$  est fixé à une valeur réaliste ( $d_{\text{fibre}}=1 \mu\text{m}$ ).  $D_{\text{free}}$  est également fixé à une valeur plausible de  $0.35 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  (100,166). A partir de ces simulations, nous étudions l'effet de la microstructure (nombre de ramifications successives  $N_{\text{branche}}$ , longueur des segments entre deux embranchements  $L_{\text{seg}}$  et diamètre du soma  $d_{\text{soma}}$ ) sur le comportement des mesures DDE. Au lieu d'une étude systématique, nous avons décidé de nous concentrer sur quatre cas précis (décrits ci-dessous), que nous estimons refléter un bon nombre de scénarios. Afin de pouvoir comparer plus facilement les données expérimentales aux données simulées, ces dernières sont également ajustées à la fonction  $A + B \times \cos(2\phi)$  afin d'en déduire les paramètres  $A$ ,  $B$  et  $\frac{B}{A}$  (rapportés dans la **Table III-2**).

*Cas 1 : Segments courts, sans embranchement ni soma*

Ce premier cas a pour but d'évaluer l'effet de segments courts sur le signal DDE ( $L_{\text{seg}}=30 \mu\text{m}$ ), sans embranchement ( $N_{\text{branche}}=1$ ) et avec un soma réduit à un simple point ( $d_{\text{soma}}=0$ ) (**Figure III-9.A**). Ce modèle constitue notre référence pour le cas simple de fibres connectées en un point et orientées aléatoirement dans l'espace. Pour les mêmes valeurs de  $D_{\text{free}}$  et  $d_{\text{fibre}}$ , une légère diminution de  $B$  et  $\frac{B}{A}$  peut être observée par rapport au modèle des cylindres infinis non connectés simulé sous MISST.

*Cas 2 : Segments courts, quelques embranchements mais pas de soma*

Ce second cas vise à déterminer si l'introduction de quelques embranchements entraîne un effet sur le signal DDE. Dans ce cas  $N_{\text{branche}}=4$  tandis que  $L_{\text{seg}}$  et  $d_{\text{soma}}$  conservent leurs valeurs respectives de  $30 \mu\text{m}$  et  $0 \mu\text{m}$  (cf **Figure III-9.B**). Nous observons un effet est assez marqué avec une augmentation importante de  $A$  (qui devient légèrement plus élevé que pour les données expérimentales) tandis que  $B$  diminue. Il en résulte un rapport  $\frac{B}{A}$  de valeur plutôt basse  $\sim 0.16$ , ce qui est deux fois inférieur à la valeur obtenue dans le cas de référence et bien plus proche de nos valeurs expérimentales.

*Cas 3 : Longs segments, pas d'embranchement et large soma*

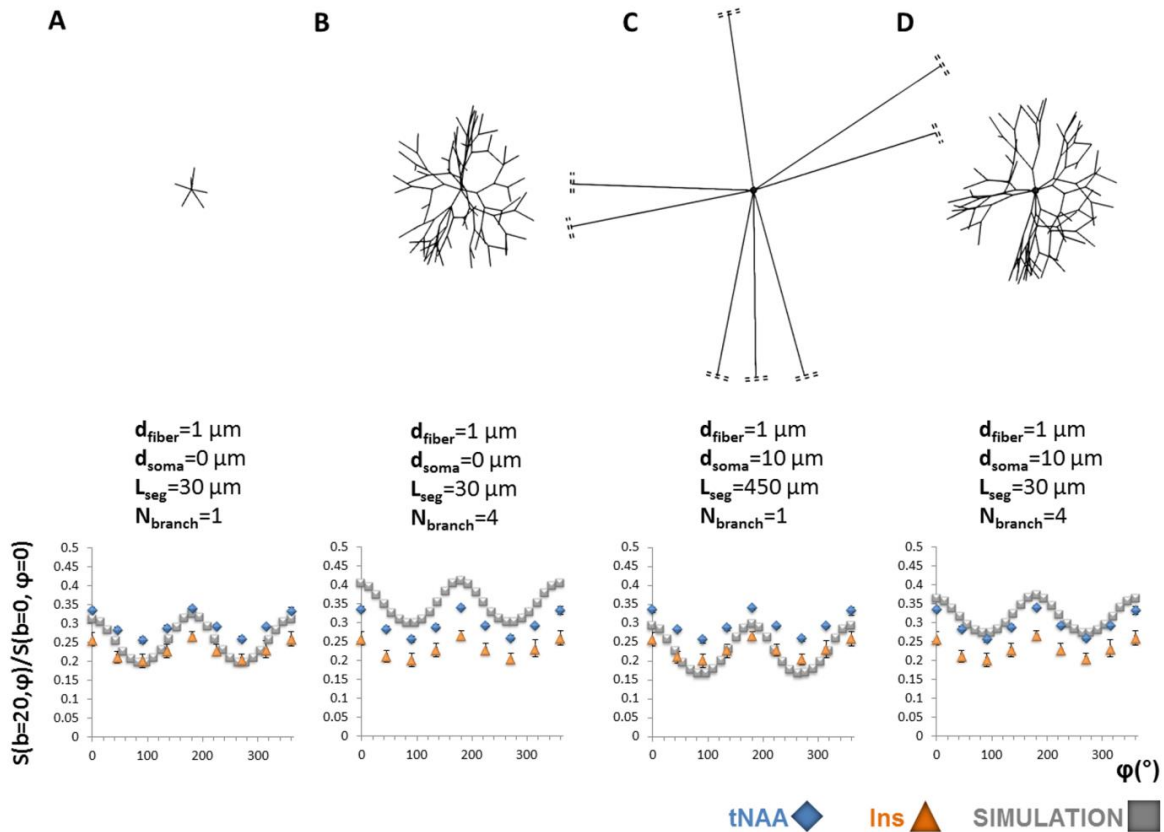
Nous nous sommes par la suite demandé si la présence d'un soma de taille réaliste, plutôt que les embranchements, pouvait également expliquer le comportement de nos données DDE. Par conséquent,  $d_{\text{soma}}$  est fixé à  $10 \mu\text{m}$  tandis que nous imposons une structure simplifiée de l'organisation des fibres, avec  $N_{\text{branche}}=1$  et  $L_{\text{seg}}=450 \mu\text{m}$  (**Figure III-9.C**). Ce dernier paramètre est choisi de façon à ce que les fibres apparaissent comme « presque » infinies et que le soma

occupe ~16% du volume cellulaire total, ce qui correspond à une fraction volumique réaliste à la fois pour les neurones et les astrocytes (119,173–175). Une baisse importante est observée pour A, tandis que B est légèrement supérieur à la valeur obtenue dans le cas 1. Par conséquent, le rapport  $\frac{B}{A}$  est très élevé (presque autant que dans le cas de cylindres infinis non connectés). Ce phénomène ne correspond pas à ce qui est observé dans le cas des données expérimentales.

*Cas 4 : Segments courts, quelques embranchements et soma large*

Le dernier cas étudié correspond au scénario le plus réaliste et combine la présence d'embranchements comme dans le cas 2 ( $N_{\text{branche}}=4$ ,  $L_{\text{seg}}=30 \mu\text{m}$ ) avec un soma de taille réaliste comme dans le cas 3 ( $d_{\text{soma}}=10 \mu\text{m}$ ) (voir **Figure III-9.D**). Le soma occupe toujours ~16% du volume cellulaire total. Le comportement du signal DDE simulé dans ce cas ne diffère que très légèrement du cas 2 et s'avère même être encore plus proche de nos données expérimentales (l'écart entre les données expérimentales moyennées sur les métabolites intracérébraux et les données simulées étant inférieur à 25% pour les paramètres A, B et  $\frac{B}{A}$ ).





**Figure III-9 : Jeux de données simulés pour les quatre scénarios envisagés superposés aux données expérimentales du tNAA et Ins. A) Signal DDE pour un modèle de fibres courtes et interconnectées. B) Signal DDE pour un modèle de fibres courtes et interconnectées présentant des embranchements ( $N_{\text{branche}}=4$ ). C) Signal DDE pour un modèle comprenant un soma de  $10 \mu\text{m}$  de diamètre connecté à de très longues fibres. La fraction volumique du soma est de  $\sim 16\%$ . Les fibres « quasi-infinies » sont coupées sur la figure par des double-lignes en pointillé. D) Signal DDE pour un modèle plus « complet » composé d'un soma de  $10 \mu\text{m}$  de diamètre connecté à des fibres courtes présentant des embranchements ( $N_{\text{branche}}=4$ ). La succession de segments courts au travers des embranchements successifs apparaît comme étant le modèle expliquant le mieux nos données expérimentales d'après la comparaison des rapports  $\frac{B}{A}$  (cf Table III.2). L'ajout du corps cellulaire dans notre modèle n'a qu'un impact limité sur le rapport  $\frac{B}{A}$  mais modifie l'atténuation globale du signal ( $\sim A$ ) vers des valeurs plus faibles (de façon similaire à l'effet qu'aurait une valeur de  $D_{\text{free}}$  plus élevée).**

METABOLITES		GEOMETRIES				
Moyenne sur tNAA, tCr, Tau, Ins and tCho	Cylindres infinis	Fibres courtes, sans soma	Embranchements, sans soma	Fibres longues, avec soma	Embranchements et soma	
<b>AJUSTEMENT A LA FONCTION <math>A + B \times \cos(2\phi)</math></b>						
<b>Offset (A)</b>	0.248±0.041	0.247±0.008	0.256±0.004	0.350±0.004	0.225±0.004	0.317±0.004
<b>Modulation d'amplitude (B)</b>	0.033±0.005	0.081±0.011	0.061±0.006	0.054±0.005	0.065±0.006	0.048±0.005
<b>Rapport B/A</b>	0.152±0.039	0.326±0.045	0.239±0.025	0.155±0.015	0.289±0.026	0.150±0.017
<b>AJUSTEMENT AU MODELE DES CYLINDRES INFINIS</b>						
<b>D<sub>free</sub> (<math>\mu\text{m}^2/\text{ms}</math>)</b>	0.21±0.03	0.35±0.00	0.27±0.02	0.20±0.01	0.33±0.03	0.20±0.02
<b>d<sub>fiber</sub> (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	4.00±0.52	1.00±0.00	2.65±0.39	1.89±0.54	3.69±0.26	3.19±0.29

**Table III-2 : Partie supérieure : Valeurs de A, B et  $\frac{B}{A}$  obtenues pour chaque modèle (cylindres infinis et simulations dans des cellules 3D) après ajustement à la fonction  $A + B \times \cos(2\phi)$ . Ces valeurs peuvent être comparées à la colonne de gauche (grisée) indiquant les valeurs moyennes de A, B et  $\frac{B}{A}$  calculées à partir des cinq métabolites intracellulaires (moyenne  $\pm$  s.d.). L'erreur sur les paramètres extraits à partir de modèles géométriques ( $D_{\text{free}}$ ,  $d_{\text{fiber}}$ ) est estimée grâce à des simulations de Monte Carlo. Les modèles exhibant des embranchements donnent des valeurs plus faibles pour  $\frac{B}{A}$ , ce qui correspond mieux à nos données expérimentales. Partie inférieure : Ajustement des données simulées dans les cellules 3D synthétiques au modèle des cylindres infinis. Le modèle échoue à retourner les vraies valeurs attendues pour  $D_{\text{free}}$  et  $d_{\text{fiber}}$  (à savoir  $0.35 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  et  $1 \mu\text{m}$ , respectivement). De façon très frappante, les valeurs sont proches des valeurs moyennes de  $D_{\text{free}}$  et  $d_{\text{fiber}}$  obtenues pour les métabolites intracellulaires (moyenne  $\pm$  s.d.). Cette observation confirme le fait que le modèle des cylindres infinis ne décrit pas nos données expérimentales de manière satisfaisante.**

Réciproquement, nous nous sommes posés la question de savoir comment ces données DDE simulées se traduiraient en terme de  $D_{\text{free}}$  et  $d_{\text{fibre}}$  si elles étaient naïvement analysées au moyen du modèle des cylindres infinis, ainsi qu'effectué précédemment pour les métabolites. Les résultats obtenus sont rapportés dans la partie inférieure de la **Table III.2**. Il apparaît clairement que l'ajout d'embranchements dans le modèle résulte en une sous-estimation importante de  $D_{\text{free}}$  ainsi qu'une surestimation prononcée de  $d_{\text{fibre}}$ . Finalement, les données simulées dans le modèle « complet » (cas 4) et ajustées au modèle des cylindres infinis donnent  $D_{\text{free}} \sim 0.20 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  et  $d_{\text{fibre}} \sim 3.2 \mu\text{m}$ , ce qui est de façon frappante en bon accord avec les valeurs obtenues pour les métabolites intracellulaires (valeurs moyennées sur les métabolites intracellulaires :  $D_{\text{free}} \sim 0.20 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  et  $d_{\text{fibre}} \sim 3.8 \mu\text{m}$ ).

De façon générale, ces données suggèrent que la prise en compte des embranchements dans le modèle semble primordiale afin d'obtenir une interprétation pertinente de nos données DDE. Dans de telles structures, et en considérant que  $L_{\text{SEG}}$  est comparable à la distance parcourue sous l'effet de la diffusion durant le TM, une portion non-négligeable de l'ensemble des métabolites voit en effet l'orientation des fibres dans lesquels ils sont confinés changer durant le TM du fait du passage d'une branche à l'autre. Il en résulte alors une perte des corrélations spatiales, ce qui a pour effet de réduire l'amplitude de la modulation du signal. L'ajout d'un soma dans le cas 4 diminue quant à lui la valeur de  $A$  ce qui correspond mieux à l'atténuation globale du signal observée pour les métabolites.

On peut relever ici que les embranchements ne sont probablement pas les seuls éléments structurels secondaires pouvant expliquer nos données expérimentales. Bien que cela n'ait pas été examiné dans la présente étude, d'autres aspects, tels que des ondulations ou des gonflements locaux (176,177), pourraient également résulter en un effet similaire à la présence d'embranchements, car les corrélations spatiales des trajectoires de diffusion entre les deux blocs seraient également perdues dans ce cas (178). Dans cet esprit, d'autres caractéristiques secondaires de la microstructure, telles que les épines dendritiques ou les feuillettes d'astrocytaires, pourraient également avoir un effet important sur la modulation du signal. Cette hypothèse va dans le sens du travail de Palombo *et al* qui présente des simulations de la diffusion dans des modèles de cellules incluant épines et feuillettes, indiquant que ces structures plus fines auraient un effet important sur les mesures SDE des métabolites intracellulaires (102).

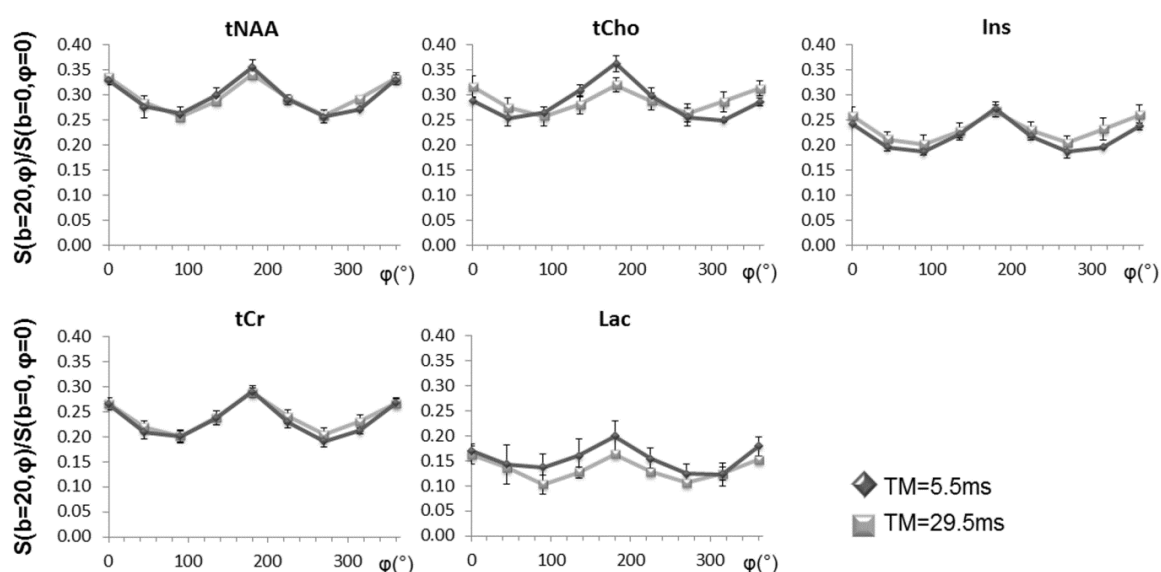
### III.4.iii. IMPACT DU TM SUR L'INFORMATION MICROSTRUCTURALE COLLECTEE

Les données expérimentales et simulées semblent indiquer une sensibilité limitée à la présence de corps cellulaires. Cette observation est cohérente avec la théorie développée par Mitra qui prédit que les expériences DDE ne peuvent être sensibles à la  $\mu A$  résultant des parois de compartiments sphériques qu'à des TM courts voire nuls (160). Dans ce cas, la modulation angulaire de l'intensité du signal DDE en fonction de  $\varphi$  prend la forme d'une cloche, avec un maximum global observé pour  $\varphi=180^\circ$ . Cette prédiction a été expérimentalement confirmée par Koch et Finsterbusch qui ont utilisé la DDE afin d'estimer la taille des corps cellulaires chez l'Homme à 3 T (179).

Nous avons par conséquent postulé qu'une certaine sensibilité à la taille du soma pourrait être récupérée en diminuant le TM. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé une autre série d'acquisitions pour  $TM=5.5$  ms tout en gardant les autres paramètres inchangés ( $\Delta/\delta=30/4.5$  ms,  $b=10 \mu m^2/ms$  sur chaque bloc de diffusion). Dans ce cas, cinq métabolites sont quantifiés de manière fiable (tNAA, tCr, Ins, tCho, Lac) avec des valeurs de CRLB de 1% pour tNAA, tCr et tCho, de 3% pour Ins et 10% pour Lac. La **Figure III-10** montre la modulation angulaire du signal obtenue pour ces métabolites à  $TM=5.5$  ms tandis que les données à  $TM=29.5$  ms sont également présentées à titre de comparaison. La modulation angulaire du signal est toujours observée en dépit d'un TM plus court. Il est intéressant de remarquer qu'une valeur maximale du signal est obtenue pour le cas antiparallèle ( $\varphi=180^\circ$ ) tandis que l'atténuation du signal est légèrement plus prononcée pour le cas parallèle ( $\varphi=0/360^\circ$ ). Cette tendance est particulièrement remarquable dans le cas de tCho et peut également être appréciée pour tNAA, Ins et Lac.

Ce phénomène pourrait traduire un état intermédiaire entre le régime à long TM et le régime à TM nul prédit par Mitra. Nous émettons par conséquent l'idée qu'une augmentation du rapport  $\frac{S_{\varphi=180^\circ}}{S_{\varphi=0^\circ}}$  pourrait potentiellement refléter une sensibilité accrue aux corps cellulaires lorsque l'on raccourcit le TM. Ce rapport est rapporté pour les cinq métabolites pour chaque TM dans la **Table III.3**, révélant systématiquement des valeurs supérieures pour  $TM=5.5$  ms par rapport à  $TM=29.5$  ms. Ces résultats doivent cependant être interprétés avec prudence, car les écarts observés entre les deux TM n'ont abouti à une différence significative que dans le cas de tCho (d'après un test de Kruskal-Wallis).

Nous avons néanmoins approfondi notre étude en réalisant des simulations à  $TM=5.5$  ms dans les quatre modèles présentés dans la section précédente en **Figure III-9**. L'évolution du rapport  $\frac{S_{\varphi=180^\circ}}{S_{\varphi=0^\circ}}$  pour les deux valeurs de TM sont reportées dans la **Table III-3** et révèlent que l'augmentation la plus marquée pour ce paramètre est associée à l'incorporation d'un compartiment sphérique dans le modèle. La présence d'embranchements semble avoir en revanche un effet négligeable sur la dépendance au TM pour ce paramètre. Ces observations sont donc en accord avec l'idée d'une sensibilité plus prononcée aux corps cellulaires pour un TM ultra-court.



**Figure III-10** : Comparaison de l'atténuation du signal (moyenne  $\pm$  s.d. sur 4 animaux dans chaque groupe) observée à  $TM=5.5$  ms et  $TM=29.5$  ms pour cinq métabolites (Tau n'a pas pu être quantifié de façon fiable à  $TM=5.5$  ms). La diminution du TM entraîne pour la plupart des métabolites l'apparition d'un maximum global de l'intensité signal pour  $\varphi=180^\circ$ .

$\frac{S(\varphi = 180^\circ)}{S(\varphi = 0^\circ)}$	METABOLITES					GEOMETRIES			
	tNAA (neuronal marker)	tCr	Ins (glial marker)	tCho (glial marker) **	Lac	Short Fibers	Branching	Soma	All features
TM=5.5 ms	1.08±0.04	1.09±0.06	1.14±0.07	1.26±0.05	1.14±0.12	1.07	1.03	1.10	1.10
TM=29.5 ms	1.02±0.01	1.08±0.01	1.03±0.02	1.02±0.01	1.04±0.07	1.04	1.02	1.01	1.03

**Table III-3 : Partie gauche : Rapports  $\frac{S_{\varphi=180^\circ}}{S_{\varphi=0^\circ}}$  obtenus pour cinq métabolites à TM=5.5/19.5 ms. Ce rapport tend à augmenter à TM court. Cette augmentation n'est statistiquement significative que dans le cas de tCho. Les barres d'erreur correspondent à la s.d. calculée sur quatre animaux. \*\* :  $p < 0.05$  d'après un test de Kruskal-Wallis. Partie droite : Rapport  $\frac{S_{\varphi=180^\circ}}{S_{\varphi=0^\circ}}$  obtenus pour les signaux DDE simulés dans les modèles de cellules 3D présentés dans la Figure III.9. Ce rapport augmente de façon importante lorsqu'un soma est inclus dans le modèle, suggérant une sensibilité plus prononcée à la présence de corps cellulaires lorsque le TM est raccourci.**

### III.5. CONCLUSION

Les mesures DDE des métabolites cérébraux reflètent de façon à la fois spécifique et inégale la  $\mu A$  des cellules neuronales et gliales tout en opérant à des valeurs de  $b$  relativement faibles. Nos données suggèrent que le signal DDE, tel que mesuré dans le cerveau de rongeur majoritairement constitué de substance grise, contient une information complexe sensible à plusieurs aspects de la microstructure cellulaire, tels que  $L_{SEG}$ ,  $N_{branche}$ ,  $d_{soma}$  ou  $d_{fibre}$ . Des modèles basés sur des géométries simples pour lesquels une solution analytique peut être déduite, tels que le modèle des cylindres infinis, apparaissent par ailleurs comme insuffisants pour expliquer les données de manière satisfaisante. Notre travail suggère fortement qu'une interprétation pertinente et fiable du signal DDE doit passer par des simulations de la diffusion dans des modèles complexes et réalistes de cellules 3D. Au-delà des aspects de la microstructure pris en compte dans cette étude, à savoir la présence de corps cellulaires et d'embranchements, il serait tout à fait judicieux de prendre en considération des structures plus fines à l'échelle subcellulaire telle que des variations de diamètre le long de l'axe axonal ou encore la présence d'épines dendritiques et de feuilletts astrocytaires (102,178). L'analyse quantitative des données DDE par modélisation pourrait par conséquent nécessiter une prise en compte plus exhaustive des différents paramètres de la microstructure, notamment en ayant recours à de dictionnaires de signaux générés à partir de simulations de Monte Carlo (118,119,180). Enfin, la relation entre la sensibilité à un aspect donné de la microstructure (tel que  $d_{fibre}$ ,  $d_{soma}$ ,  $N_{branche}$ ,...) et les paramètres expérimentaux de la séquence (i.e.  $b$ ,  $t_d$ ,  $TM$  ou encore la forme des gradients de diffusion) doit faire l'objet d'une étude plus approfondie.

---

# CHAPITRE IV. ETUDE DES PROPRIÉTÉS DE DIFFUSION DU MILIEU EXTRACELLULAIRE PAR INJECTION STÉRÉOTAXIQUE DE SUCROSE<sup>1</sup> DANS LE CERVEAU DE SOURIS

## IV.1. INTRODUCTION

L'ECS occupe 20% du volume cérébral total et joue un rôle majeur tant sur le plan structural grâce à la matrice extracellulaire que fonctionnel (réservoir ionique pour la formation de potentiels d'action, maintien de l'homéostasie cérébrale et extraction des déchets métaboliques). L'ECS constitue par conséquent un compartiment à part entière dans le cerveau (128). Malgré cela, cette structure demeure encore un territoire peu exploré et l'impact de la microstructure de l'ECS sur la diffusion reste à clarifier. Ce manque d'information rend difficile l'interprétation des données de diffusion obtenues par imagerie en termes de microstructure. En effet, bien que l'imagerie de diffusion permette de mesurer les propriétés de diffusion de l'eau sur des distances allant de 2 à 20  $\mu\text{m}$ , cette information se retrouve moyennée à l'échelle macroscopique sur un voxel dont les dimensions minimales sont limitées par le SNR. Comme évoqué précédemment, de nombreux efforts ont été dédiés à l'élaboration de modèles permettant d'inférer des paramètres quantitatifs de la microstructure tels que l'orientation et la densité des fibres, le diamètre axonal, etc... Malgré tout, la nature ubiquitaire de l'eau impose de s'en remettre à des *a priori* forts concernant la microstructure des différents compartiments composant le tissu. Une de ces hypothèses de départ concerne les propriétés de diffusion de l'eau dans l'ECS versus l'ICS. Une étape de validation expérimentale afin de fixer ces suppositions au plus près de la vérité biologique est donc nécessaire. En particulier, la diffusion de l'eau dans l'ECS est-elle plus rapide que dans l'ICS ? La diffusion dans l'ECS peut-elle être décrite par un compartiment gaussien, c'est-à-dire gouverné par de la diffusion libre ?

En imagerie de diffusion, de nombreuses études ont tenté de répondre à ces questions dans la substance blanche en utilisant une source de contraste supplémentaire combinée aux mesures

---

<sup>1</sup> Dans ce chapitre, l'anglicisme « sucrose » est utilisé au lieu de terme français « saccharose ».



de DTI ou DKI. Ces stratégies permettent de moduler les contributions relatives de l'ECS et de l'ICS au signal de diffusion puis d'analyser en quoi les métriques de diffusion s'en trouvent affectées. Ces approches originales utilisent notamment des infusions de gadolinium (136), la DDE (181), des méthodes de filtrage dans le plan (182) ou encore des mesures aux longs  $t_{ds}$  (183). Ces études suggèrent que la diffusivité axiale de l'eau intra-axonale est soit supérieure ou similaire à la diffusivité axiale de l'eau extra-axonale. Toutefois, bien que ces résultats permettent d'affiner la modélisation des données d'imagerie de diffusion, ces études ne s'intéressent qu'à la diffusion de l'eau dans la substance blanche et n'apportent qu'une vision partielle des propriétés de diffusion de l'ECS (par exemple, la question de la nature gaussienne de ce compartiment n'est pas abordée dans ces travaux).

Contrairement à l'imagerie, nous avons vu que les outils de DW-MRS offrent des possibilités d'exploration plus spécifique grâce au traçage de métabolites confinés dans l'ICS, plus précisément dans les neurones et les cellules gliales. Certains métabolites, tels que le glucose ou le lactate, sont au contraire présents à la fois dans l'ECS et l'ICS. Pfeuffer et collègues (135) ont montré que ces métabolites possèdent des propriétés de diffusion très différentes des métabolites purement intracellulaires, avec une atténuation du signal plus rapide en fonction de la pondération en diffusion  $b$ . Plus récemment, un comportement similaire a été observé pour l'acétate lors de l'infusion de cette molécule par voie intraveineuse (184). Ces résultats suggèrent que la contribution de l'ECS disparaît rapidement avec  $b$  en raison d'une diffusion plus rapide. Les auteurs se sont ensuite basés sur l'hypothèse d'une atténuation monoexponentielle du signal de diffusion dans l'ECS afin d'en déduire la fraction extracellulaire de ces métabolites. Cette approche non-invasive est très prometteuse pour l'étude de la compartimentation du lactate, dont le relargage dans l'ECS pourrait être crucial pour le bon fonctionnement du métabolisme cérébral lors de l'activation neuronale d'après l'hypothèse ANLS (46,185). Comme pour l'imagerie de diffusion, il est cependant nécessaire de s'appuyer sur une connaissance *a priori* des propriétés de diffusion dans l'ECS pour évaluer la contribution de ce compartiment au signal de diffusion.

Malheureusement, il n'existe pas de métabolite ou ion endogène détectable par spectroscopie RMN résidant uniquement dans l'ECS. Il est donc nécessaire de se tourner vers l'utilisation d'une sonde de marquage exogène injectable afin de caractériser expérimentalement les propriétés de diffusion de ce milieu. Cette sonde moléculaire doit rester strictement confinée dans l'ECS tout en possédant un rayon hydrodynamique similaire à celui des métabolites intracellulaires afin de permettre une comparaison directe entre ces différentes molécules. En

outre, une telle sonde ne doit pas perturber l'équilibre osmotique du milieu ni induire de processus métaboliques délétères. Si ces conditions sont respectées, le suivi d'un tel marqueur peut être utile afin de collecter des informations sur la conformation microstructurale de l'ECS à la fois en conditions normales et pathologiques. Cette approche a d'ailleurs été largement employée avec des molécules non-déTECTABLES en spectroscopie RMN (186–188). Plusieurs études utilisant des radiotraceurs (189–191) ou des techniques telles que l'iontophorèse en temps réel (187,192–197), la microscopie par balayage électronique et la microscopie de super-résolution (120,121,198–204) ont permis de quantifier le coefficient de diffusion apparent (ADC) et la tortuosité ( $\lambda$ ) dans l'ECS, où:

$$\lambda = \sqrt{\frac{D_{free}}{ADC}}, \quad (IV.1.1)$$

$D_{free}$  étant le coefficient de diffusion libre de la molécule d'intérêt. La plupart des valeurs de  $\lambda$  reportées dans l'ECS se situent autour de  $\sim 1.6$  et reflètent une diffusion entravée par une variété de contraintes imposées par la microstructure telles que l'organisation cellulaire ou les invaginations de la membrane cellulaire entraînant la formation d'un volume mort constitué d'un grand nombre d'espaces de taille micrométrique. Pour certaines sondes, les interactions électrostatiques avec les nombreuses charges négatives présentes dans la matrice extracellulaire, ou encore le possible attachement sur des sites actifs localisés dans la membrane cellulaire, peuvent également contraindre le phénomène de diffusion (205–209).

Dans le domaine de la résonance magnétique *in vivo*, une série d'expérimentations pionnières en DW-MRS a été proposée par l'équipe de Neil et Ackerman afin d'estimer l'ADC et  $\lambda$  dans l'ECS (109,210–212). Ils ont employé à cet effet une large gamme de modalités spectroscopiques ( $^1H$ ,  $^{23}Na$ ,  $^{19}F$ ) et de marqueurs de l'ECS afin de comparer les propriétés de diffusion de l'ECS et de l'ICS, à la fois en condition saine et ischémique. Bien que ces études originales aient apporté un riche aperçu des propriétés de diffusion dans l'ECS, elles ont abouti à des résultats quelque peu contradictoires : tandis que les valeurs d'ADC obtenues par DW-MRS du  $^{19}F$  ou du  $^1H$  ne permettent pas de trancher en faveur d'une différence significative des propriétés de diffusion entre ECS et ICS, les données basées sur la détection du sodium suggèrent une diffusion deux fois plus rapide dans l'ECS que l'ICS. Le manque de spécificité de certains des marqueurs exogènes de l'ECS employés dans ces études a été proposé comme explication principale à ces résultats peu concluants (210). En outre, ces études ont été effectuées pour un  $t_d$  fixe ainsi qu'à des valeurs de  $b$  relativement faibles, permettant seulement

l'estimation de l'ADC et de  $\lambda$ . Ces mesures ne reflètent donc pas le large éventail de propriétés de diffusion mesurables (et potentiellement modélisables) avec des expériences plus modernes d'imagerie ou de DW-MRS.

Le travail développé dans ce chapitre a donc pour but de revisiter les mesures des propriétés de diffusion dans l'ECS et plus particulièrement d'aller au-delà de la seule évaluation de l'ADC et de  $\lambda$ . Nous proposons ici une analyse approfondie grâce à des outils de DW-MRS à la pointe de l'état de l'art (déjà détaillés dans les **Chapitres 1 à 3** de ce manuscrit). Pour ce faire, nous injectons par chirurgie stéréotaxique une solution de sucrose, un marqueur bien connu de l'ECS en raison de l'absence de transporteur transmembranaire pour cette molécule dans le cerveau de mammifère (189). L'infusion de sucrose est effectuée lentement dans le cerveau de souris, soit dans l'hippocampe, soit directement dans le cortex préfrontal. Trois types d'acquisition DW-MRS sont par la suite réalisées afin d'obtenir des informations complémentaires sur différents aspects de la microstructure dans l'ECS: 1) la restriction sur de courtes distances grâce à des mesures aux hautes valeurs de  $b$  jusqu'à  $30 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ , 2) l'évolution de l'ADC, et donc de la tortuosité, en fonction du  $t\Delta$  jusqu'à 1 s et 3) l'anisotropie microstructurale telle que révélée par double encodage en diffusion. Enfin, nous confirmons que le sucrose reste majoritairement dans l'ECS grâce à un protocole de dissociation cellulaire.

## IV.2. MATÉRIEL & MÉTHODES SPÉCIFIQUES

### IV.2.i. CHIRURGIE STÉRÉOTAXIQUE

Une solution de sucrose de concentration égale à 1 M est injectée dans le cerveau par chirurgie stéréotaxique. Pour ce faire, des souris saines (C57BL/6J) sont anesthésiées à l'isoflurane (1.5%) et maintenues dans un cadre stéréotaxique grâce à des barres d'oreille et un mors. La peau est rasée, localement anesthésiée avec de la lidocaïne puis incisée à l'aide d'un scalpel. Le crâne est ensuite perforé au niveau des coordonnées stéréotaxiques correspondant au site d'injection désiré. Deux canules ( $\phi=160 \mu\text{m}$ ) sont positionnées au niveau de la dure-mère puis progressivement introduites dans les tissus jusqu'à atteindre la profondeur voulue.

Deux sites d'injection ont été investigués dans le cadre de cette étude :

- Les ventricules latéraux (de coordonnées antéropostérieure (AP) /médiolatérale (ML) /dorsiventrals (DV) par rapport au bregma AP/ML/DV= $\pm 1/-0.2/-2.1$  mm) avec un débit d'injection de  $0.5 \mu\text{L}/\text{min}$  pendant 30 minutes ;
- Le cortex préfrontal (de coordonnées AP/ML/DV=  $\pm 1.5/+2/-1.2$  mm) avec un débit d'injection de  $0.1 \mu\text{L}/\text{min}$  pendant 30 minutes (on peut noter ici un volume total injecté plus faible car l'injection s'effectue directement dans les tissus).

Dans les deux cas, un débit d'injection le plus lent possible a été privilégié afin de permettre une diffusion progressive du sucrose dans les tissus depuis le site d'injection. A la fin de l'injection, les canules de stéréotaxie sont maintenues en place pendant 10 minutes afin d'éviter toute aspiration de la solution de sucrose par succion capillaire. Enfin, l'animal est suturé (sans réparation de la dure-mère) et transféré en salle d'IRM.

### IV.2.ii. PARAMÈTRES D'ACQUISITION POUR LES PROTOCOLES DE DW-MRS

#### *IN VIVO*

#### **a. PARAMÈTRES COMMUNS À TOUTES LES MESURES**

En raison du temps incompressible nécessaire pour le transfert de l'animal, son installation dans l'aimant ainsi que pour effectuer les différents réglages préliminaires (accord de l'antenne et ajustement du shim), les acquisitions de DW-MRS débutent 45 à 60 minutes après la fin de l'injection de sucrose.

Chaque mesure de DW-MRS a été réalisée chez quatre souris, et ce pour les deux sites d'injection. Lorsque le site d'injection se trouve dans les ventricules latéraux, un voxel de dimensions  $7 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$  est positionné de façon à englober l'hippocampe. Bien que le voxel ait été positionné de façon à limiter la contribution des ventricules, ces derniers occupent malgré tout  $\sim 3$  à  $5\%$  du volume total du voxel. Afin de s'assurer que le liquide cébrospinal (CSF) des ventricules ne biaisent pas nos résultats, deux mesures contrôles ont été effectuées dans un petit voxel de  $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$  dépourvu de tout ventricule. Lorsque le sucrose est injecté dans le cortex préfrontal, un voxel de dimensions  $4 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$  ne contenant presque pas de CSF est positionné entre les sites d'injection. Dans ce cas, il n'est pas possible d'exclure complètement les sites d'injection et quelques acquisitions contrôles excluant ces derniers ont été réalisées dans un plus petit voxel de  $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ . Ces paramètres sont récapitulés dans la **Table IV.1**.

Site d'injection	Volume total injecté ( $\mu\text{L}$ )	Localisation voxel	Dimensions voxel ( $\text{mm}^3$ )	Volume de ventricules (%)	Présence des sites d'injection
Ventricules latéraux	15	Hippocampe	$7 \times 3 \times 3$	$\sim 3-5$	Non
Cortex préfrontal (tissu)	3	Cortex préfrontal	$4 \times 2 \times 2$	$<1$	Oui

**Table IV-1 : Résumé des paramètres d'injection et de positionnement du voxel**

Un total de 128 répétitions est acquis pour chaque valeur de  $b$ ,  $t_d$  et angle  $\varphi$ . Plus précisément, pour chaque protocole d'acquisition, le nombre total de répétitions est divisé en 4 blocs de 32 répétitions entrelacées avec d'autres valeurs de  $b$ ,  $t_d$  ou angle  $\varphi$ . Toutes les acquisitions sont réalisées dans un ordre aléatoire afin d'exclure tout biais résultant de la dégradation du shim ou la diminution de la concentration du sucrose au cours du temps.

Des spectres acquis dans une solution fantôme de sucrose concentrée à 50 mM ont également été rajoutés dans la base LCModel pour toutes les mesures DW-MRS utilisées dans cette étude.

Dans le cas des expériences contrôles dans le plus petit voxel, le signal est accumulé sur un total de 512 acquisitions divisées en 16 blocs de 32 répétitions pour  $b=0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  et  $b=20 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ .

## b. MESURES AUX HAUTES VALEURS DE B & ADC AUX LONGS

$T_{DS}$

Les mesures sont réalisées grâce à la séquence STE-LASER (101) décrite dans le **Chapitre II** de ce manuscrit (TE\_STE / TE\_LASER = 8 / 25 ms). La durée des gradients de diffusion  $\delta$  est fixée à 3 ms et les gradients sont appliqués simultanément le long des trois directions de l'espace avec la même intensité.

Dans le cas des mesures aux hautes valeurs de  $b$ , le temps de mélange (TM) est égal à 50 ms, correspondant ainsi à un  $t_d$  de 53.2 ms. Les valeurs maximales de  $b$  utilisées dans cette étude s'élèvent à 20 ms/ $\mu\text{m}^2$  dans le voxel hippocampal et 30 ms/ $\mu\text{m}^2$  dans le cortex préfrontal. L'atténuation du signal reportée pour les mesures aux hautes valeurs de  $b$  correspond à  $\ln\left(\frac{S_b}{S_{b=0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2}}\right)$ , avec  $b=0.02, 3.02, 5, 10, 20$  et  $30 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ .

Les valeurs d'ADC sont acquises pour des valeurs de  $t_{ds}=53.2, 253.2, 503.2$  et  $1003.2$  ms en variant le TM tout en gardant un TE fixe. Dans ce cas, le signal de diffusion est acquis pour  $b=0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  et  $b=3.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  pour chaque  $t_d$  et l'ADC est calculé selon la formule suivante :

$$ADC = \frac{-1}{\Delta b} \times \ln\left(\frac{S_{b=3.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2}}{S_{b=0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2}}\right) \quad (\text{IV. 2.1})$$

### c. DOUBLE ENCODAGE EN DIFFUSION (DDE)

Les mesures DDE sont réalisées grâce à la séquence décrite dans le **Chapitre III** (TE\_SE / TE\_LASER= 71.2 / 25 ms). Afin d'obtenir un SNR suffisamment important pour les résonances du sucrose, le  $t_d$  est fixé à 28.5 ms pour chaque bloc de diffusion tandis que le temps de mélange est réduit à une valeur minimale, à savoir 5.5 ms. La durée des gradients est de 4.5 ms. Une valeur totale de pondération en diffusion de 5 ms/ $\mu\text{m}^2$  est appliquée, c'est-à-dire 2.5 ms/ $\mu\text{m}^2$  par bloc de diffusion. De façon similaire au **Chapitre III**, le premier bloc de diffusion est systématiquement appliqué selon X tandis que la direction du second bloc de diffusion varie dans le plan XY de façon à décrire un angle  $\varphi$  variant de  $0^\circ$  à  $360^\circ$  par incrément de  $45^\circ$ . L'atténuation du signal correspond ici au ratio suivant :

$$\frac{S_{\varphi, b=5 \text{ ms}/\mu\text{m}^2}}{S_{\varphi=0, b=0.04 \text{ ms}/\mu\text{m}^2}} \quad (\text{IV.2.2})$$

Les paramètres d'acquisition pour les trois modalités de DW-MRS sont reportés dans la **Table IV-2**.

<b>Modalité de DW-MRS</b>	<b>TE (ms)</b>	<b>b (ms/μm<sup>2</sup>)</b>	<b>t<sub>a</sub> (ms)</b>	<b>φ (°)</b>
Hautes valeurs de b	8	0.02- 20 (hippocampe) 0.02- 30 (cortex)	53.2	N.A.
Longs temps de diffusion	8	0.02 & 3.02	53.2- 1003.2	N.A.
Double encodage en diffusion	71.2 ms	0.04 & 5	28.5	0- 360

**Table IV-2 : Résumé des principaux paramètres d'acquisition pour les trois modalités de DW-MRS utilisées.**

#### **d. MESURE DU COEFFICIENT DE DIFFUSION LIBRE DU SUCROSE**

La valeur de  $D_{\text{free}}$  du sucrose à 37°C est mesurée dans une solution fantôme de sucrose (50 mM, pH 7). Un circuit de chauffage à eau est utilisé afin de maintenir le fantôme à 37°C. La température de l'échantillon est contrôlée tout au long de l'expérience grâce à une sonde de température positionnée sur le fantôme de façon à éviter d'établir un contact direct avec les tuyaux du système de chauffage. Le signal de diffusion est mesuré trois fois pour  $b=0.01$  et  $b=1.01$  ms/μm<sup>2</sup>. La valeur de  $D_{\text{free}}$  est ensuite calculée pour chaque acquisition selon l'**Equation IV.2.1**. La valeur finale de  $D_{\text{free}}$  correspond à la moyenne des trois mesures, à savoir  $0.66 \pm 0.05$  μm<sup>2</sup>/ms.

#### **e. PROTOCOLE DE DISSOCIATION CELLULAIRE**

Le but de cette expérience est de déterminer la distribution du sucrose entre l'ECS et l'ICS afin de confirmer qu'il reste majoritairement hors des cellules. Pour ce faire, nous avons mis au point un protocole de dissociation cellulaire permettant de collecter aux différentes étapes des échantillons correspondants aux fractions intracellulaire, extracellulaire et membranaire.

Plus précisément, quatre souris (2 par site d'injection) sont sacrifiées 45 min post-injection par dislocation des cervicales. Le cerveau est ensuite collecté et disséqué de façon à obtenir une coupe de 2 mm d'épaisseur excluant les sites d'injection mais comprenant une part du voxel utilisé pour les acquisitions de DW-MRS. Cette coupe est collectée 45 minutes après la fin de l'injection puis plongée dans une solution saline équilibrée de Hank (HBSS) pendant 15 min. Le liquide de rinçage est ensuite prélevé afin de constituer un premier échantillon du milieu

extracellulaire « ECS 1 ». La matrice extracellulaire du tissu prélevé est dégradée par digestion enzymatique (papaine). Les cellules sont mécaniquement dissociées à l'aide de pipettes pasteurs de diamètres décroissants. La suspension cellulaire ainsi obtenue est diluée dans 7 mL de HBSS avant d'être filtrée dans un tamis de 50  $\mu\text{m}$ . L'échantillon est ensuite centrifugé à 300 g pendant 10 min à température ambiante. Le surnageant d'environ 6 mL est collecté, correspondant à un deuxième échantillon extracellulaire « ECS 2 ». Les cellules ayant précipité au fond du tube de centrifugation sont resuspendues avec précaution dans une solution d'acide perchlorique (PCA) à 0.11 M dans le but d'induire la lyse des membranes cellulaires. L'échantillon est à nouveau centrifugé à 14,000 g pendant 15 min à 4°C. Les débris membranaires précipitent tandis que le surnageant correspond au contenu du milieu intracellulaire. Ce dernier est neutralisé avec une solution diluée d'hydroxyde de potassium avant d'être centrifugé à nouveau, donnant environ 400  $\mu\text{L}$  de contenu intracellulaire. Afin de compenser les différences de volume entre les échantillons et permettre la quantification du sucrose par mesure HR-MAS, toutes les fractions sont lyophilisées et si nécessaire, regroupées ensemble, avant d'être solubilisées dans de l'eau lourde.

## **f. SPECTROSCOPIE HR-MAS**

*Ces mesures ont été gracieusement effectuées par Dr. Lucas-Torres et Dr. Wong du laboratoire NIMBE basé sur le centre CEA du plateau de Saclay.*

Les échantillons lyophilisés sont solubilisés dans du  $\text{D}_2\text{O}$  (0.05 wt% TSP) puis pipetés dans un insert Kel-F jetable de 30  $\mu\text{L}$  placé dans un rotor pour les acquisitions RMN. Les mesures  $^1\text{H}$  HR-MAS sont réalisées sur une machine Bruker Avance II de fréquence opératoire de 499.16 MHz. L'échantillon est mis en rotation à une fréquence de 4000 Hz à une température de  $23 \pm 2$  °C. Les spectres sont acquis avec une séquence Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) ayant un TE de 80 ms (accumulation de 200 inter-échos). Une impulsion de pré-saturation de l'eau (1 s) est utilisé en tant que délai de recyclage. La bande passante est fixée à 20 ppm sur 32 K points d'acquisition. Le doublet d'alanine à 1.48 ppm a été utilisé comme référence de déplacement chimique.



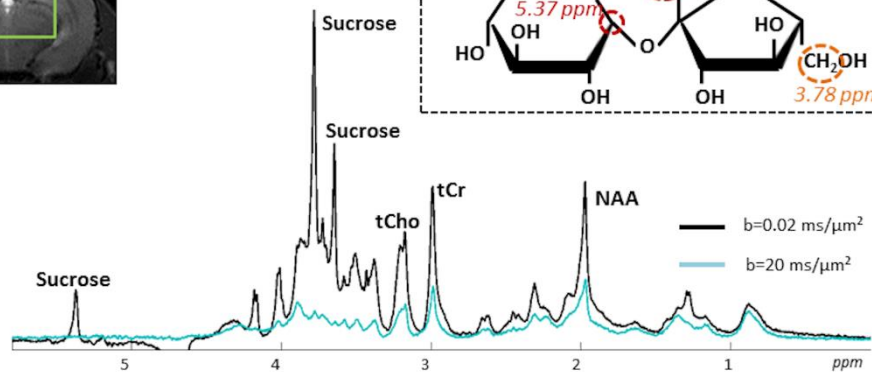
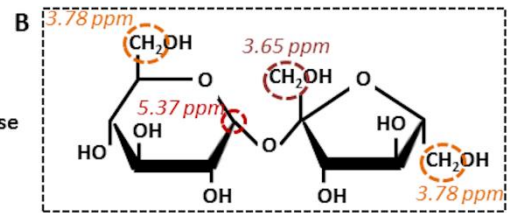
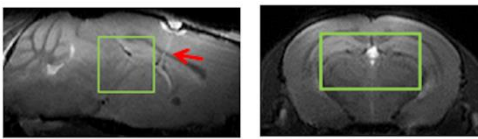
## IV.3. RÉSULTATS

### IV.3.i. INJECTION DANS LES VENTRICULES : DISTRIBUTION SATISFAISANTE DU SUCROSE ET CONTAMINATION LIMITÉE EN PROVENANCE DU CSF DANS NOTRE VOXEL D'INTÉRÊT

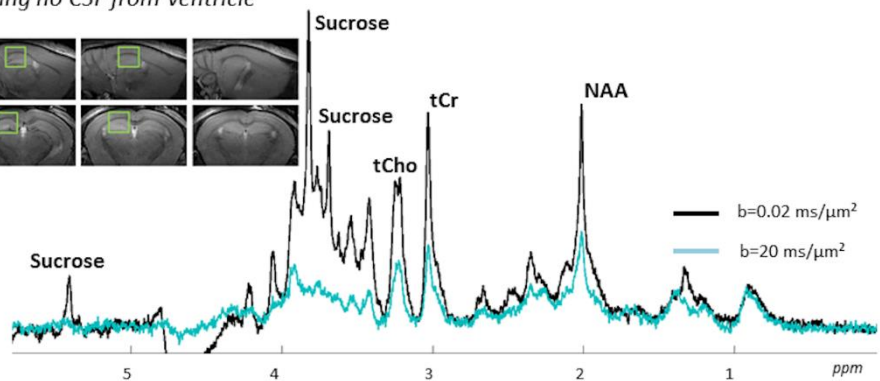
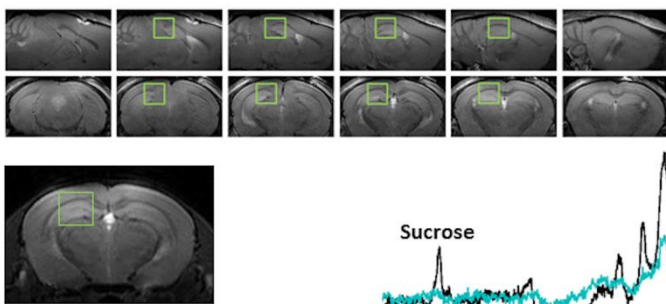
La présence de sucrose dans les tissus est confirmée par l'apparition de trois résonances intenses observables à 3.65, 3.78 et 5.37 ppm sur le spectre présenté dans la **Figure IV-1.A**. Les images anatomiques sagittale et coronale insérées en haut à gauche de la **Figure IV-1.A** montrent le positionnement du voxel d'intérêt autour de l'hippocampe (délimité en vert). Le trajet emprunté par les canules stéréotaxiques apparaît également en hyper signal sur l'image sagittale (flèche rouge). L'ajout d'une valeur de pondération en diffusion élevée de 20 ms/ $\mu\text{m}^2$  (spectre bleu sur la figure) entraîne la disparition des pics du sucrose tandis que les résonances des métabolites endogènes sont toujours détectées. Ce phénomène suggère donc de prime abord que le sucrose tend à diffuser plus vite que les métabolites cérébraux.

Avant d'aller plus loin, nous avons vérifié la capacité du sucrose à diffuser profondément dans les tissus ainsi que l'absence d'un biais potentiel sur nos données de diffusion induit par la présence de CSF dans notre voxel d'intérêt. Nous avons donc reproduit la mesure précédente dans un plus petit voxel de  $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$  ne contenant pas de CSF des ventricules et positionné de façon à être le plus éloigné possible de ces derniers (ce qui correspond en pratique à une distance de  $\sim 1 \text{ mm}$  entre les sites d'injection et la face du voxel la plus proche). Les spectres DW-MRS acquis dans ce voxel contrôle sont présentés dans le **Figure IV-1.C**. L'intensité relative des résonances correspondant au sucrose par rapport aux métabolites est similaire à ce qui est observé dans le plus gros voxel, suggérant par conséquent une pénétration satisfaisante de la molécule au sein des tissus. L'application d'une valeur de  $b$  égale à 20 ms/ $\mu\text{m}^2$  révèle une tendance similaire à celle observée en **Figure IV-1.A**, à savoir une diffusion apparemment plus rapide pour le sucrose par rapport aux métabolites endogènes. Ces données laissent donc à penser que le comportement diffusif du sucrose observé dans le plus gros voxel n'est pas majoritairement dominé par la diffusion du sucrose dans le CSF des ventricules mais reflète au contraire la diffusion du sucrose dans les tissus. Bien que des acquisitions dans le petit voxel sans ventricule puissent paraître plus pertinentes en raison de l'absence de toute contamination potentielle du CSF, le faible SNR dû à la réduction de la taille du voxel nous a malgré tout incités à poursuivre nos mesures dans le plus gros voxel pour les trois modalités de DW-MRS.

**A** Large  $7 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$  voxel centered around the hippocampus



**C** Small  $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$  voxel containing no CSF from ventricle



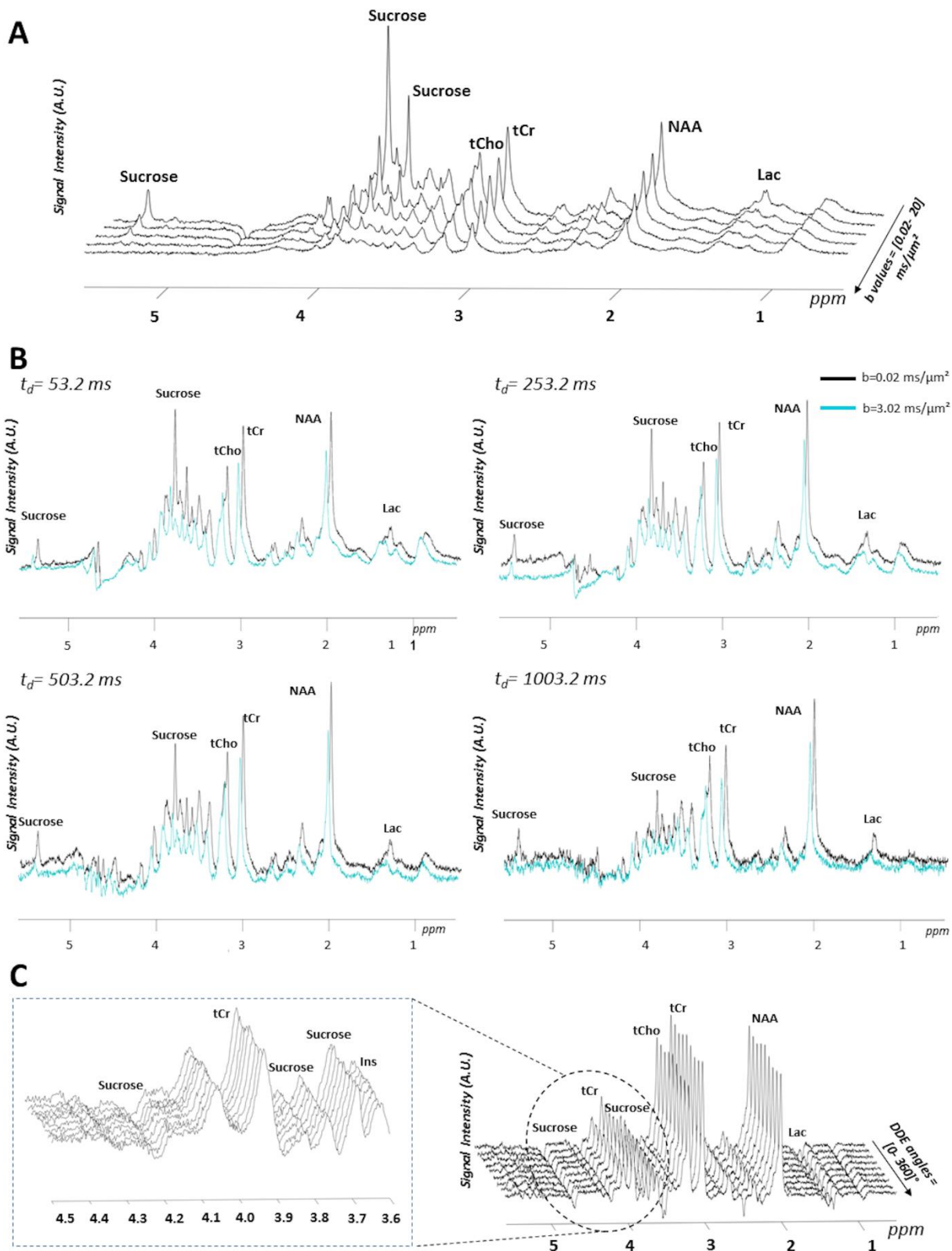
**Figure IV-1 :** A) Spectres acquis à  $b=0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  et  $b=20 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  dans un grand voxel de  $7 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$  positionné autour de l'hippocampe. Le voxel est délimité en vert sur les images sagittale et coronale en haut à gauche de l'image tandis que la trace des canules d'injection (hyper signal) est indiquée par une flèche rouge sur l'image sagittale. Les résonances du sucrose disparaissent de façon frappante pour  $b=20 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ , suggérant une diffusion plus rapide du sucrose. B) Structure moléculaire du sucrose. Les atomes d'hydrogène correspondant aux résonances du sucrose observables à 3.65, 3.78 et 5.37 ppm sont entourés. C) Spectres acquis pour les mêmes valeurs de  $b$  dans un voxel contrôle de  $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$  ne contenant ni CSF, ni site d'injection. On observe un comportement du signal de diffusion similaire à celui observé dans le plus gros voxel, ce qui suggère qu'une possible contamination du CSF des ventricules n'est pas la cause des résultats observés précédemment. Un facteur d'élargissement de raie de 1 Hz a été appliqué.

### IV.3.ii. INJECTION DANS LES VENTRICULES : PROPRIÉTÉS DE DIFFUSION DU SUCROSE DANS L'HIPPOCAMPE

Le sucrose a pu être quantifié avec certitude pour toutes nos conditions expérimentales avec des valeurs de Cramér-Rao Lower Bound (CRLB) variant de 1% à 3% pour les conditions d'acquisition les moins favorables en termes de SNR, c'est-à-dire aux très hautes valeurs de  $b$  (20 ms/ $\mu\text{m}^2$ ) ou pour des  $t_{\text{ds}}$  très longs (1003.2 ms). Il faut toutefois noter que deux jeux de données présentent néanmoins des valeurs de CRLBs légèrement supérieures (7/8%).

La **Figure IV-2** présente des jeux de données acquis pour les différentes modalités de DW-MRS chez un animal. La **Figure IV-2.A** montre un jeu de données pour toutes les valeurs de  $b$  tandis qu'une série de spectres acquis à  $b=0.02$  ms/ $\mu\text{m}^2$  et  $b=20$  ms/ $\mu\text{m}^2$  pour différentes valeurs de  $t_{\text{d}}$  est disponible sur la **Figure IV-2.B**. Enfin, un jeu de données DDE pour chaque valeur de  $\varphi$  est consultable sur la **Figure IV-2.C**.

**Figure IV-2 : A) Exemple d'un jeu de données acquis pour une série de valeurs de  $b$  allant de 0.02 à 20 m/ $\mu\text{m}^2$  dans un voxel de  $7 \times 3 \times 3$  mm<sup>3</sup> positionné autour de l'hippocampe. L'atténuation du signal en fonction de  $b$  est clairement plus prononcée dans le cas du sucrose par rapport à ce qui est observé pour les trois métabolites endogènes principaux (tNAA, tCho, tCr). Ce comportement est d'autant plus remarquable que l'intensité du signal du sucrose à  $b=0.02$  ms/ $\mu\text{m}^2$  est bien supérieure à celle des métabolites intracérébraux. B) Série de jeux de données acquis chez un animal à deux valeurs de  $b$  ( $b=0.02$  ms/ $\mu\text{m}^2$  de noir et  $b=20$  ms/ $\mu\text{m}^2$  en bleu) pour des valeurs croissantes de  $t_{\text{ds}} = [53.2 ; 253.2 ; 503.2 ; 1003.2]$  ms. On remarque ici que l'intensité relative du sucrose par rapport aux autres métabolites semble décroître avec le  $t_{\text{d}}$ . Ce phénomène est cependant dû à une différence de  $T_1$  plutôt qu'à une baisse de concentration du sucrose au cours de l'expérience (les valeurs de  $t_{\text{ds}}$  ont été acquises dans un ordre aléatoire afin de s'affranchir de ce possible biais expérimental). C) Exemple d'un jeu de données acquis avec la séquence DDE pour chaque valeur de  $\varphi$  entre  $0^\circ$  et  $360^\circ$  ( $b=5$  ms/ $\mu\text{m}^2$ ). La modulation de l'intensité du signal en fonction de l'angle  $\varphi$  est clairement visible pour tNAA, tCho et tCr. Quelques résonances, dont celles du lactate à 1.3 ppm ou encore des MM à 0.9 ppm, apparaissent en antiphase en raison de la J-modulation. L'insert sur le côté gauche de la figure effectue un zoom sur les résonances comprises entre 3.6 et 4.35 ppm. La modulation du signal en fonction de  $\varphi$  est toujours appréciable pour tCr. L'intensité du signal sucrose reste quant à elle stable en fonction de  $\varphi$  (ce comportement est particulièrement appréciable au niveau de la résonance à 3.7 ppm). Un facteur d'élargissement de raie de 1 Hz a été appliqué sur toutes les données.**

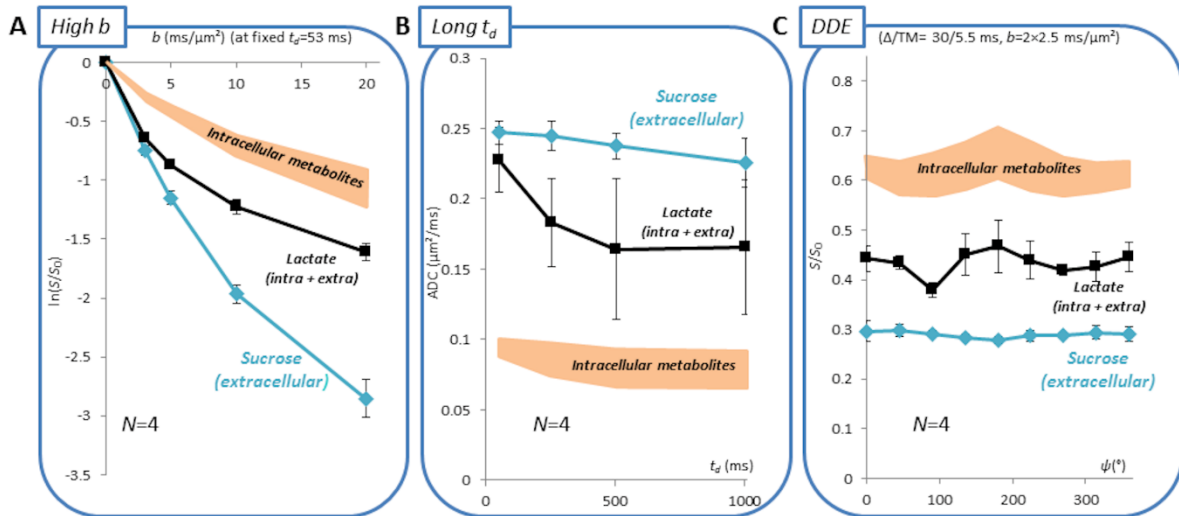


La **Figure IV-3.A** montre le logarithme de l'atténuation du signal moyenné sur quatre animaux. Les résultats pour les métabolites purement intracellulaires sont exposés en tant que la moyenne  $\pm$  l'écart type calculés à partir des données de tNAA, tCho et tCr afin de rendre compte d'un « territoire intracellulaire ». Certaines résonances moins intenses se superposant à celles du sucrose n'ont pas pu être quantifiées ici. C'est notamment le cas du myo-inositol et du glutamate qui ont dû être écartés de cette analyse. L'atténuation du signal du sucrose en fonction de  $b$  se révèle bien plus prononcée que pour les autres métabolites, confirmant ainsi la diffusion plus rapide du sucrose déjà observée dans la **Figure IV-1**. Il est néanmoins encore plus intéressant de relever ici que l'atténuation du sucrose dévie également d'un comportement purement monoexponentiel pour des valeurs de  $b > 5 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ . Ce phénomène indique un certain degré de restriction imposée par la microstructure locale. De façon frappante, le lactate exhibe un comportement similaire au sucrose pour  $b \leq 3.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  avant de dévier brusquement de cette tendance pour se rapprocher du comportement des métabolites purement intracellulaires.

Les valeurs d'ADC moyennées sur 4 animaux sont disponibles en **Figure IV-3.B**. Il peut être clairement apprécié que les valeurs d'ADC pour le sucrose sont bien supérieures à celles des autres métabolites pour n'importe quelle valeur de  $t_d$ , ce qui est à nouveau en accord avec l'idée d'une diffusion plus rapide pour cette molécule. Plus précisément, l'ADC du sucrose varie de  $0.24 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  pour un  $t_d$  relativement court de 53.2 ms à  $0.22 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  pour un long  $t_d$  de 1003.2 ms. En comparaison, les valeurs d'ADC moyennées sur les trois métabolites principaux décroissent de  $0.095 \pm 0.007 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  à  $0.079 \pm 0.014 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ . Il est intéressant de noter que les valeurs d'ADC pour les métabolites intracellulaires atteignent un plateau à partir de  $t_d=503.2$  ms, reflétant principalement la diffusion des métabolites le long de fibres cellulaires telles que les axones, les dendrites ou les prolongements astrocytaires (117,119). L'ADC du sucrose continue quant à lui de baisser avec le  $t_d$ , ce qui suggère que le régime de tortuosité n'est pas encore atteint dans l'ECS. La valeur de  $D_{\text{free}}$  pour le sucrose ayant été estimée à  $0.66 \pm 0.05 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ , on obtient des valeurs de tortuosité variant de 1.66 pour  $t_d = 53.2$  ms à 1.73 pour un  $t_d = 1003.2$  ms. Le lactate se comporte à nouveau de façon intermédiaire, son ADC diminuant brusquement avant de stabiliser autour de  $0.17 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  pour  $t_d \geq 503.2$  ms.

La modulation angulaire du signal pour les trois métabolites principaux, le lactate et le sucrose est montrée dans la **Figure IV-3.C**. Les métabolites purement intracellulaires présentent une modulation angulaire de l'intensité du signal caractéristique de molécules confinées dans des structures fortement anisotropes, i.e. des compartiments allongés. Comme attendu, l'atténuation du signal est ici plus marquée pour le sucrose que pour les autres métabolites, ce qui est une

fois de plus cohérent avec l'idée d'une diffusion plus rapide. Contrairement aux métabolites intracellulaires, il apparaît clairement que l'intensité du signal du sucrose ne varie pas en fonction de  $\varphi$ . Le signal DDE du sucrose reflète par conséquent un microenvironnement plutôt isotrope, tout du moins dans la limite de résolution spatiale de la mesure. Enfin, on peut relever une fois de plus le comportement « intermédiaire » du lactate : l'atténuation du signal est plus prononcée que pour les métabolites intracellulaires tout en présentant une modulation angulaire du signal comparable à ces derniers. Ces résultats pour le lactate sont cependant relativement bruités (les valeurs de CRLBs retournées par LCModel étant comprises entre 5 et 7 % contre seulement 1% dans le cas des trois métabolites principaux).



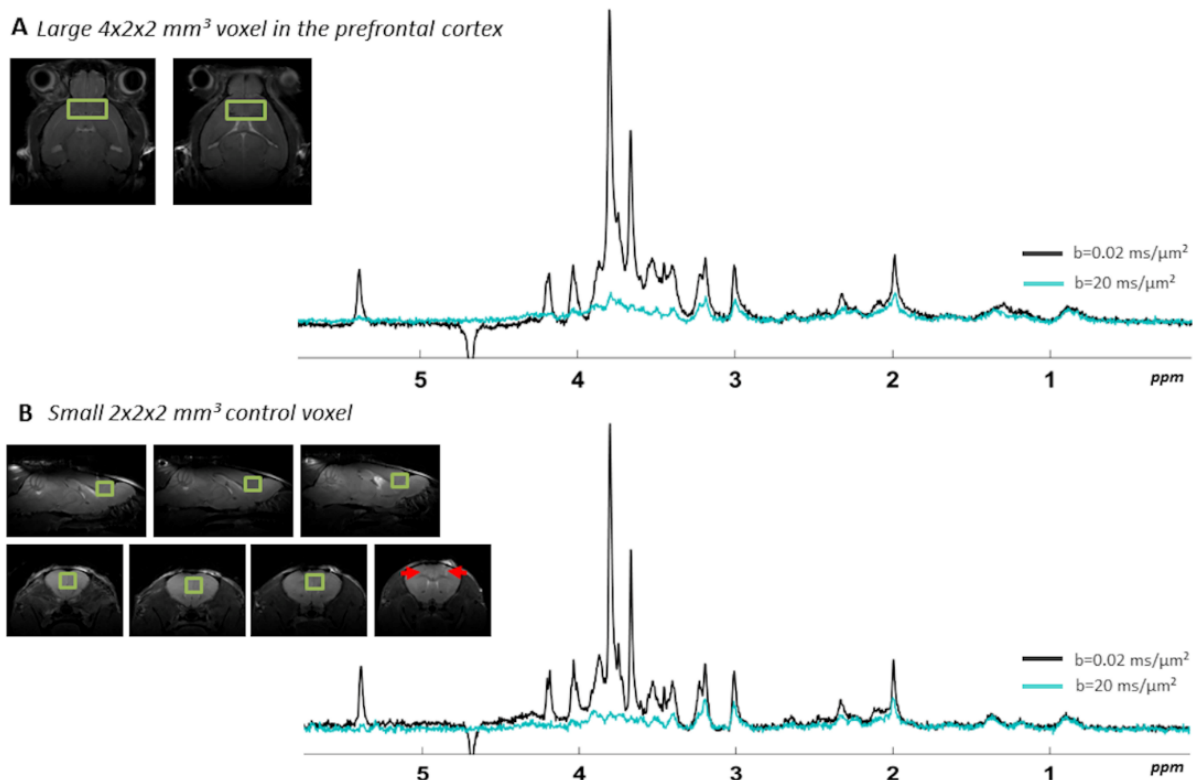
**Figure IV-3 :** A) Logarithme de l'atténuation du signal en fonction de  $b$  jusqu'à  $20 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  pour les métabolites intracellulaires (valeurs moyennées sur les données obtenues pour tNAA, tCr et tCho  $\pm$  s.d.), le lactate (moyenne  $\pm$  s.d.). L'atténuation du signal du sucrose est manifestement plus forte par rapport aux autres métabolites. Cependant l'atténuation dévie d'un comportement purement monoexponentiel aux plus hautes valeurs de  $b$ , révélant ainsi un certain de degré de sensibilité à de la restriction de courte portée. B) Dépendance temporelle de l'ADC pour les métabolites intracellulaires, le lactate et le sucrose (pour des valeurs de  $t_{ds}$  comprises entre 53.2 et 1003.2 ms). L'ADC du sucrose est supérieur à celui de tous les métabolites quel que soit le  $t_d$ . Contrairement aux métabolites purement intracellulaires, l'ADC du sucrose ne se stabilise pas autour d'une valeur plateau, ce qui suggère que le régime de tortuosité n'est pas encore atteint. C) Atténuation du signal en fonction des valeurs d'angle  $\phi$  obtenue par mesure DDE pour les métabolites intracellulaires, le lactate et le sucrose. Tandis que les métabolites intracellulaires montrent une modulation angulaire du signal significative, la signature du sucrose demeure plate, ce qui suggère que la diffusion de ce dernier n'est pas restreinte dans des compartiments allongés. Pour toutes les modalités de DW-MRS, le lactate se comporte de façon intermédiaire, ce qui est cohérent avec sa distribution à la fois dans l'ECS et l'ICS.

#### IV.3.iii. SITE D'INJECTION ALTERNATIF : PROPRIÉTÉS DE DIFFUSION DU SUCROSE DANS LE CORTEX PRÉFRONTAL

Afin de confirmer l'absence d'une contribution potentielle des ventricules au signal de diffusion et d'évaluer si le protocole d'injection peut avoir un effet sur les mesures de diffusion du sucrose, nous avons réalisé des mesures supplémentaires pour lesquelles le sucrose est directement injecté dans une zone du cortex préfrontal sans ventricule (cf **Figure IV-4.A**). En

dépit de la réduction de la taille du voxel, le sucrose, tNAA, tCR et tCho (mais malheureusement pas le lactate) ont pu être quantifié de façon fiable.

A l'instar des données acquises dans l'hippocampe, la **Figure IV-4.A** montre que le signal du sucrose disparaît presque totalement à  $b=20 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ . Afin d'exclure un potentiel biais survenant de l'inévitable présence des sites d'injection dans le voxel, nous avons à nouveau effectué des mesures dans un voxel contrôle de dimensions  $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$  excluant complètement ces derniers. Cette acquisition révèle un comportement similaire, confirmant une fois de plus une diffusion plus rapide pour le sucrose par rapport aux métabolites intracérébraux (cf **Figure IV-5.B**).



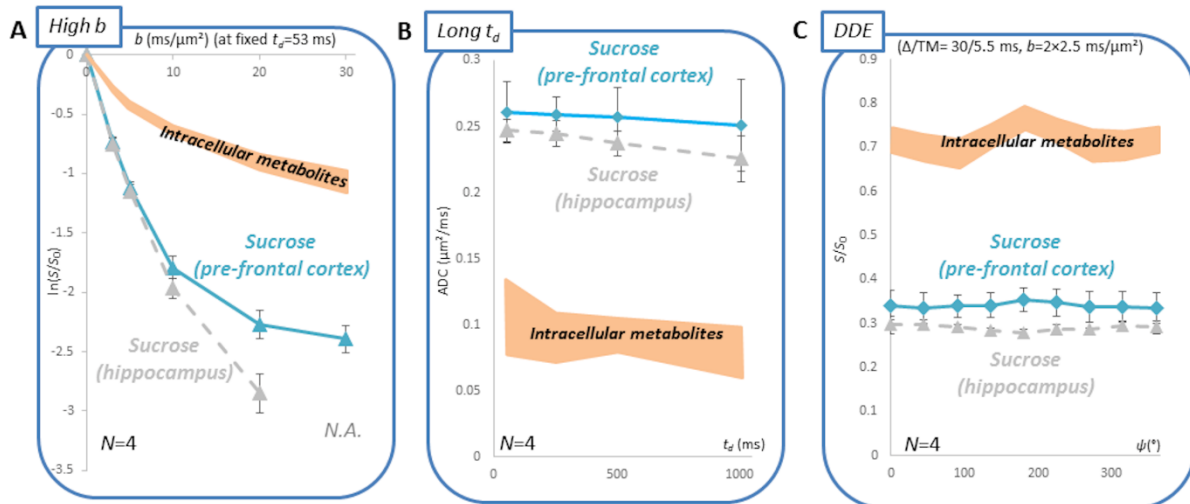
**Figure IV-4 :** A) Images axiales du voxel de dimensions  $4 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$  positionné dans le cortex préfrontal accompagnées des spectres acquis sans ( $b=0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ) et avec ( $b=20 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ) pondération en diffusion. Comme dans l'hippocampe, le signal de diffusion du sucrose semble plus rapide que pour les métabolites intracellulaires. B) Côté gauche : images anatomiques sagittales (ligne du haut) et coronales (ligne du bas) montrant le voxel contrôle de dimensions  $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$  positionné dans le cortex préfrontal. Le trajet des canules d'injection est indiqué par des flèches rouges sur la dernière coupe coronale. Côté droit : Spectres acquis à  $b=0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  et  $b=20 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ . Les résonances du sucrose s'évanouissent à une haute valeur de  $b$ , révélant un comportement similaire à ce qui est observé dans le plus grand voxel.



Les propriétés de diffusion du sucrose dans le voxel cortical sont résumées dans la **Figure IV-6**. Les trois modalités de DW-MRS révèlent pour tous les métabolites des comportements de diffusion similaires entre les deux voxels d'acquisition (hippocampe versus cortex). Aux hautes valeurs de  $b$ , l'atténuation du signal du sucrose est à nouveau plus prononcée par rapport aux autres métabolites tout en déviant cependant d'une tendance purement monoexponentielle (cf **Figure IV-6.A**). On peut également relever ici que l'atténuation du signal du sucrose paraît refléter une sensibilité à la restriction légèrement plus prononcée dans le cortex par rapport aux données de l'hippocampe. Ce point sera examiné plus en détails dans la discussion.

Les mesures aux longs  $t_{ds}$  confirment par ailleurs des valeurs d'ADC assurément plus élevées pour le sucrose que pour les autres métabolites, et ce pour tous les  $t_{ds}$ . Les valeurs de  $\lambda$  correspondantes sont comprises entre  $\lambda=1.59$  pour  $t_d=53.2$  ms et  $\lambda=1.62$  pour  $t_d=1003.2$  ms (cf **Figure IV-6.B**). Bien que ces valeurs semblent légèrement plus basses que celles obtenues dans l'hippocampe (où  $\lambda= [1.66- 1.73]$ ), les données sont ici trop bruitées pour nous permettre de conclure en faveur d'une différence significative de tortuosité entre ces deux régions cérébrales. Il apparaît à nouveau que l'ADC du sucrose ne semble pas atteindre de valeur plateau aux longs  $t_{ds}$ , ce qui suggère que le régime de tortuosité n'est pas non plus atteint dans cette aire corticale.

Enfin, les données DDE sont présentées dans la **Figure IV-6.C**. La modulation du signal en fonction de  $\varphi$  demeure clairement appréciable pour les métabolites purement intracellulaires tandis qu'un tel comportement n'est pas observé pour le sucrose (hormis pour  $\varphi=180^\circ$  où une augmentation très ténue du signal semble survenir).



**Figure IV-5 :** A) Logarithme de l'atténuation du signal en fonction de  $b$  ( $0.02\text{-}30 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ) dans le cortex préfrontal pour les métabolites intracellulaires (valeurs moyennées sur les données de  $t_{\text{NAA}}$ ,  $t_{\text{Cr}}$  et  $t_{\text{Cho}} \pm \text{s.d.}$ ) ainsi que pour le sucrose à la fois dans le cortex préfrontal (en bleu) et dans l'hippocampe (en gris). Le sucrose semble expérimenter plus de restriction dans le cortex préfrontal que dans l'hippocampe. B) Valeurs d'ADC en fonction de  $t_d=53.2\text{-}1003.2$  ms pour les métabolites intracellulaires dans le cortex préfrontal et le sucrose dans le cortex (en bleu) et l'hippocampe (en gris). Les valeurs d'ADC du sucrose ne diffèrent pas de manière significative entre les deux régions d'intérêt. C) Mesures DDE pour les métabolites dans le cortex préfrontal et le sucrose dans le cortex (en bleu) et l'hippocampe (en gris). L'intensité du signal en fonction de  $\varphi$  ne varie pas de façon significative pour le sucrose tandis qu'une modulation angulaire du signal est clairement visible pour les métabolites intracellulaires. Les données du sucrose pour chaque modalité correspondent à la moyenne et l'écart type obtenus sur quatre souris. Notez que le lactate n'a pu être quantifié avec certitude pour ce voxel et n'est donc pas reporté ici.

#### IV.3.iv. LE SUCROSE RESTE MAJORITAIREMENT DANS L'ECS

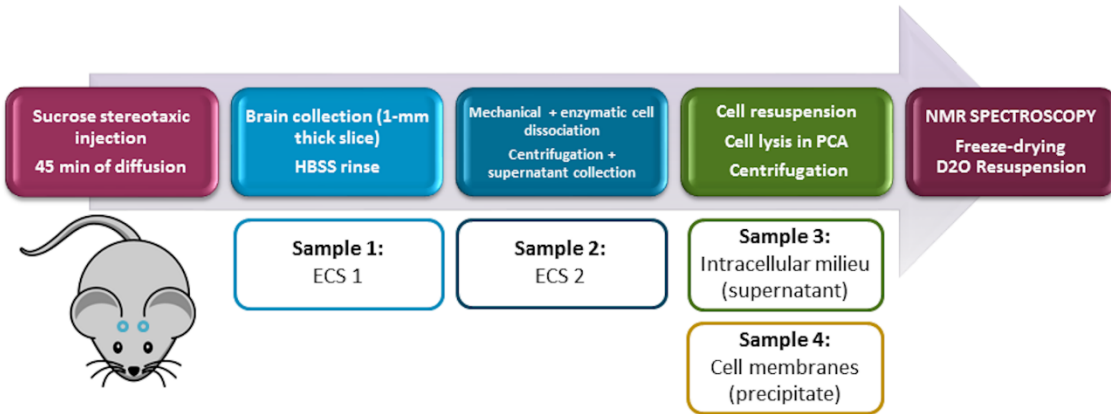
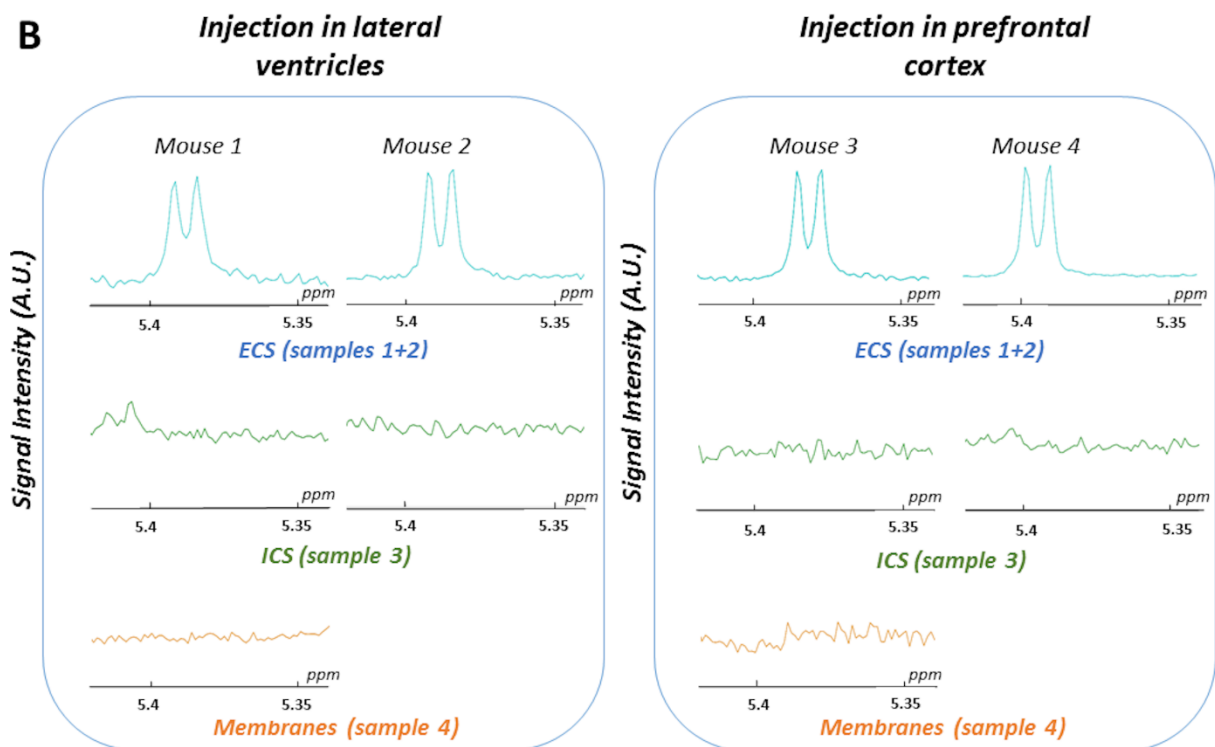
##### D'APRÈS UN PROTOCOLE DE DISSOCIATION CELLULAIRE

Deux expériences supplémentaires par site d'injection sont effectuées afin de confirmer l'absence de sucrose dans l'ICS. Plus précisément, les animaux sont sacrifiés 45 min post-injection afin d'effectuer un protocole de dissociation cellulaire sur des tissus prélevés *post-mortem*. Une description schématique de cette expérience, indiquant à quelles étapes de la dissociation correspondent les fractions extracellulaire, intracellulaire et membranaire, est disponible en **Figure IV-6.A**. Le contenu métabolique des différents échantillons est évalué par spectroscopie HR-MAS. L'entièreté du matériel biologique étant collectée à chaque étape de la dissociation (i.e. rien n'est mis de côté), on considère que la totalité du sucrose initialement présent dans le tissu se retrouve *in fine* dans les différentes fractions. Il est par conséquent

pertinent de s'appuyer sur la comparaison des signaux absolus pour évaluer la quantité de sucrose au sein des différents échantillons.

La **Figure IV-6.B** montre que le sucrose est seulement détecté dans les échantillons ECS 1 et ECS 2. Par ailleurs, la majorité du sucrose est en fait recueillie dans l'échantillon ECS 1. En considérant une valeur d'ADC du sucrose égale à  $\sim 0.22 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  (d'après les résultats de la section précédente), on estime que les molécules de sucrose parcourent en moyenne une distance de  $\sim 0.6 \text{ mm}$  en 15 min (durée du rinçage dans la solution de HBSS). Etant donné l'épaisseur de coupe de 2 mm, il n'est pas déraisonnable de postuler qu'une sous-population importante de sucrose, y compris des molécules initialement localisées en profondeur dans le tissu, ait pu être collectée durant la première étape du protocole. Une plus faible quantité de sucrose est également recueillie dans l'échantillon ECS 2.

Bien que cette expérience semble confirmer que le sucrose demeure majoritairement dans l'ECS, nous devons cependant nuancer ici ce résultat. En effet, l'apparition de nombreuses résonances supplémentaires entre 0 et 4.7 ppm, résultant de l'ajout des réactifs utilisés pour la dissociation cellulaire, nous empêche d'utiliser le signal des métabolites cérébraux comme référence pour les différents compartiments tissulaires (pour cette raison, seule la résonance du sucrose à 5.37 ppm est ici considérée).

**A****B**

**Figure IV-6 : A) Résumé schématique du protocole de dissociation cellulaire. Chaque étape génère un échantillon correspondant à l'ECS, l'ICS ou aux membranes cellulaires. B) Détection du sucrose par spectroscopie HR-MAS (résonance à 5.37 ppm) après dissociation cellulaire de tissus prélevés post injection de sucrose dans les ventricules latéraux (côté gauche) et dans le cortex préfrontal (côté droit). L'essentiel du sucrose est collecté dans les échantillons correspondant à l'ECS (spectres bleus), tandis qu'il n'est pas détecté dans la fraction intracellulaire (spectres verts) ni dans les membranes cellulaires (spectres oranges).**

## IV.4. DISCUSSION

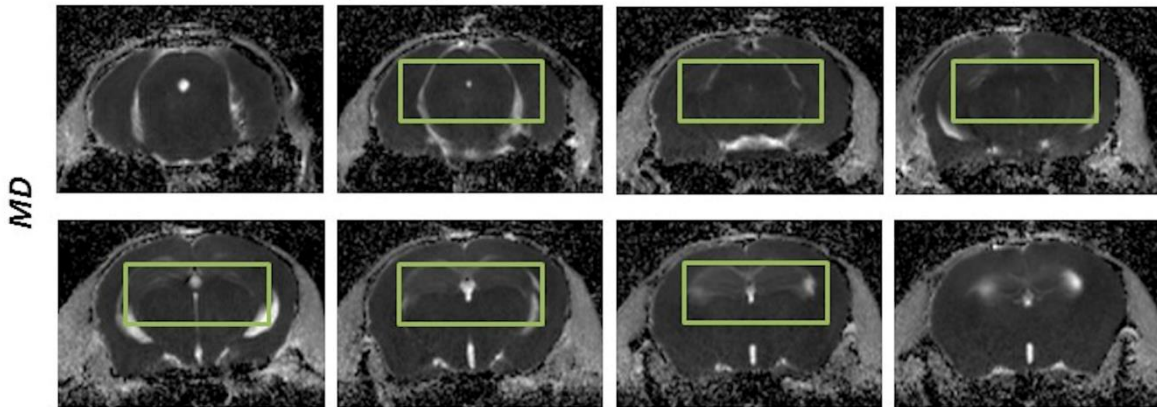
### IV.4.i. BIAIS POTENTIELS LIÉS À L'UTILISATION D'UNE SONDE EXOGÈNE POUR LE MARQUAGE DE L'ESPACE EXTRACELLULAIRE

La présence de ventricules ou des sites d'injection dans nos voxels expérimentaux peut potentiellement biaiser les résultats en faveur d'une diffusion plus rapide (et Gaussienne). Cependant dans le cas des mesures dans l'hippocampe, la fraction volumique occupée par les ventricules correspond à moins de 5 % du volume total du voxel. De plus, cette estimation reste valide même en considérant le pire scénario en termes d'erreur de déplacement chimique (qui concerne ici la résonance du sucrose à 5.37 ppm dans la direction dorsiventrals et a pour effet de décaler la position du voxel de 0.36 mm vers l'arrière du cerveau).

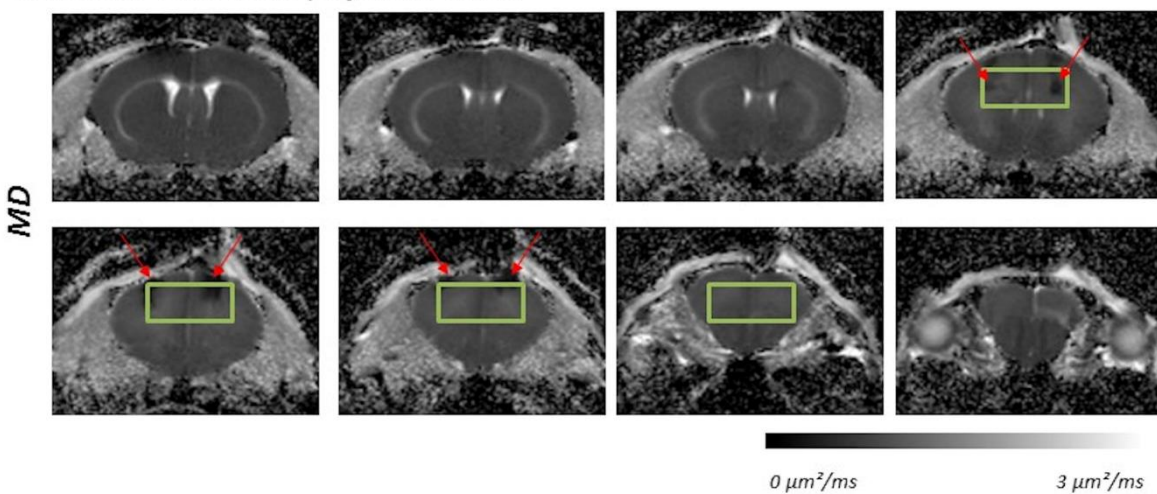
Afin de néanmoins confirmer l'absence d'un tel biais, des acquisitions supplémentaires ont été également réalisées pour  $b=0.02$  et  $b=20$  ms/ $\mu\text{m}^2$  dans de plus petits voxels sans ventricule ni tissu endommagé par l'insertion des canules. Les résultats obtenus sont similaires à ce qui observé dans les plus gros voxels : l'intensité des résonances du sucrose (relative aux métabolites cellulaires) ne varie pas tandis qu'une diffusion plus rapide pour le sucrose est également constatée. Ces mesurent suggèrent par conséquent qu'une possible contamination du signal par les ventricules ou les sites d'injection ne gouverne pas le comportement observé en termes de diffusion.

L'injection d'une solution de sucrose fortement concentrée peut potentiellement venir perturber la balance osmotique, constituant ainsi une autre source de biais. La diffusion des métabolites est cependant similaire à ce qui a été précédemment constaté dans notre équipe (118,119), indiquant par conséquent une morphologie cellulaire intacte. En outre, des mesures DTI ne révèlent pas de changement prononcé de la diffusivité moyenne de l'eau dans le voxel hippocampal après injection intraventriculaire du sucrose (**Figure IV-7.A**). Cela n'est cependant pas le cas lorsque le sucrose est injecté directement dans les tissus du cortex préfrontal, ainsi qu'annoté sur la **Figure IV-7.B**. Ce point sera examiné plus en détails dans la dernière partie de cette discussion.

**A**  $7 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$  voxel in the hippocampus



**B**  $4 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$  voxel in the prefrontal cortex



**Figure IV-7 :** A) Cartographies de la diffusivité moyenne (MD) de l'eau co-localisées avec le voxel de dimensions  $7 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$  positionné autour de l'hippocampe (rectangle vert). La MD apparaît uniforme sur tout le voxel, ce qui suggère que l'insertion des canules dans les ventricules n'induit pas d'altération de la microstructure au niveau de l'hippocampe. B) Cartographies de la MD co-localisées avec le voxel de dimensions  $4 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$  positionné dans le cortex préfrontal. Dans ce cas, bien que la MD apparaisse plutôt uniforme sur tout le voxel, des zones plus foncées (indiquées par des flèches rouges) sont également visibles au niveau des sites d'injection. La microstructure a probablement été endommagée suite à l'injection de sucrose dans une petite portion de tissu (correspondant à  $\sim 6 \%$  du volume total du voxel expérimental). Les images pondérées en diffusion (épaisseur=  $500 \mu\text{m}$ , résolution=  $160 \times 160 \mu\text{m}$ ) sont acquises grâce à un module EPI pondéré en diffusion sur 30 directions avec  $b=1 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  ( $\delta/\Delta=2/20 \text{ ms}$ ,  $TE/TR=30/3200 \text{ ms}$ ).

#### IV.4.ii. LA DIFFUSION EST PLUS RAPIDE DANS L'ESPACE

##### EXTRACELLULAIRE...

Nos résultats montrent que la diffusion du sucrose dans l'ECS est plus rapide que dans l'ICS. Plus particulièrement, l'ADC du sucrose correspond à un tiers de sa valeur de  $D_{free}$ . En comparaison,  $ADC_{tNAA}$  est égal à environ 10% de sa valeur de  $D_{free}$  (en considérant une valeur de  $D_{free}$  de  $0.78 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  telle que mesurée par Kroenke et collègues (166)), ce qui est trois fois moins que pour le sucrose.

Ce résultat apparaît de prime abord en désaccord avec le travail de Duong et collègues (109) qui rapporte peu de différence entre les valeurs d'ADC pour l'ECS et l'ICS dans une étude en spectroscopie du  $^{19}\text{F}$  pour laquelle des mesures de 2-[ $^{19}\text{F}$ ]Fluoro-2-deoxyglucose-6-phosphate intra- et extracellulaire ont été réalisées dans le cerveau de rat (sain et ischémique). Les auteurs expliquent ce résultat pour le moins surprenant par le fait que les molécules diffusant dans l'ECS peuvent se retrouver confinées dans des structures très petites (à l'échelle du nm) telles que les fentes synaptiques. Les dimensions du corps cellulaire étant par comparaison supérieures d'un ordre de grandeur ( $\sim 10 \mu\text{m}$  de diamètre), les molécules parcourant l'ECS ont par conséquent statistiquement plus de chance de se heurter à la membrane cellulaire que leurs homologues intracellulaires.

La même équipe s'est attelée par la suite à la réalisation d'une nouvelle série d'expériences en spectroscopie du  $^1\text{H}$  dont le but était d'administrer par voie intraventriculaire une gamme de marqueurs exogènes avec différents degrés de spécificité à l'ECS (210). Comme attendu, les valeurs d'ADC décroissent avec le poids moléculaire des molécules injectées, allant de  $0.22$  à  $0.063 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ . Dans cette étude, l'ADC du NAA, bien qu'étonnamment élevée, n'est pas beaucoup plus faible que celui du mannitol, un marqueur de l'ECS de rayon hydrodynamique comparable ( $0.16 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  pour le NAA contre  $0.20 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  pour le mannitol).

La différence entre ces travaux et notre présente étude peut s'expliquer par le fait que le sucrose apparaît comme étant plus spécifique de l'ECS que les sondes utilisées par Duong *et al.* Les auteurs estiment en effet dans des cultures cellulaires que la fraction intracellulaire du mannitol est d'environ 35%. Notre protocole de dissociation cellulaire ne révèle quant à lui aucune trace de sucrose dans l'ICS ou sur les membranes cellulaires. Les points expérimentaux choisis dans l'étude de Duong et collègues, dans laquelle les acquisitions de DW-MRS commencent 4h post-injection (contre  $\sim 1\text{h}$  post-injection dans notre cas), pourraient également résulter en une proportion plus importante de marqueurs ayant pénétré dans l'ICS. En effet, il n'est pas

déraisonnable de penser qu'un tel délai d'incubation peut potentiellement favoriser les échanges entre l'ECS et l'ICS.

Il peut être intéressant d'analyser à nouveau les données du mannitol en considérant sa biodistribution telle qu'estimée par Duong *et al*, à savoir 35% de mannitol intracellulaire, 38% de mannitol extracellulaire et 27% de mannitol interagissant avec la membrane cellulaire. L'ADC du mannitol extracellulaire peut alors être déduit de la formule suivante :

$$ADC_{global} = 0.35 \times ADC_{ICS} + 0.38 \times ADC_{ECS} + 0.27 \times ADC_{membrane} \quad (IV.4.1)$$

En posant  $ADC_{ICS} \approx 0.16 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  d'après les données du NAA et  $ADC_{membrane} \approx 0.02 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  d'après (213), on obtient  $ADC_{ECS} \sim 0.36 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ , une valeur finalement deux fois supérieure à  $ADC_{ICS}$ . Cette nouvelle estimation est en accord avec nos propres valeurs.

Nos résultats sont par ailleurs cohérents avec ceux rapportés par Goodman *et al* (212) en spectroscopie du  $^{23}\text{Na}$ . La biodistribution du sodium entre les compartiments intra- et extracellulaires correspond en effet à un ratio de 4:1, ce qui en fait un marqueur endogène plutôt spécifique de l'ECS. Dans cette étude, l'ADC du sodium mesuré chez le rat est de  $1.15 \pm 0.09 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ , ce qui correspond à 61% de sa valeur de  $D_{free}$  à 37°C. Des mesures similaires de diffusion de l'eau permettent d'estimer que son ADC correspond à 28% de son  $D_{free}$ . Les auteurs concluent donc que l'ADC de l'ECS est environ deux fois plus élevé que dans l'ICS.

Enfin, Dehghani *et al* ont plus récemment comparé la diffusion de l'acétate injecté par perfusion intraveineuse à la diffusion du NAA. Les valeurs d'ADC estimées pour  $b < 5 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  donnent  $0.24 \pm 0.008 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  pour l'acétate et  $0.086 \pm 0.002 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  pour le NAA. Ces résultats concordent par conséquent avec nos propres valeurs. La comparaison entre nos deux études doit cependant être nuancée par le fait que 1) l'acétate est une molécule beaucoup plus petite que le sucre et 2) « seulement » 40 % de l'acétate injecté se trouve dans l'ECS d'après les auteurs.

En conclusion, l'ensemble des éléments évoqués ci-dessus se prononcent plutôt en faveur d'une diffusion plus rapide dans l'ECS.

#### IV.4.iii. ... MAIS ELLE EST ÉGALEMENT TORTUEUSE ET RESTREINTE

Les mesures aux hautes valeurs de  $b$  montrent clairement que l'atténuation du signal du sucre dévie fortement d'un comportement mono-exponentiel, reflétant une sensibilité à de la restriction imposée par la microstructure. Au-delà de l'effet barrière causée par la présence des membranes cellulaires, la restriction pourrait survenir des nombreux espaces clos ou semi clos



résultant des invaginations de la membrane cellulaire. Ces micro-domaines sont en effet mentionnés dans de nombreuses études (206–208) et des simulations numériques de la diffusion dans l'ECS suggèrent qu'ils seraient à l'origine d'environ un tiers de la tortuosité dans ce compartiment (186).

Notre estimation de la tortuosité ( $\sim 1.6$  dans le cortex et  $\sim 1.7$  dans l'hippocampe) est plutôt proche de ce qui a été rapporté dans de précédents travaux utilisant d'autres techniques de mesure de la diffusion dans l'ECS telles que l'iontophorèse en temps-réel ou l'imagerie optique intégrative ( $\lambda \sim 1.6$ ) (214). Cette comparaison doit toutefois s'effectuer de façon prudente car nos expériences de diffusion sont réalisées ici sur des distances de  $\sim 5$  à  $\sim 20$   $\mu\text{m}$  typiquement plus petites que celles sondées par les techniques mentionnées ci-dessus correspondant à une centaine de micromètres (99). Dans notre cas, il semble en effet que le régime de tortuosité ne soit pas encore atteint et des  $t_{ds}$  plus longs pourraient par conséquent refléter une tortuosité plus importante.

Qu'en est-il en revanche des autres valeurs de tortuosité estimées par des expériences RMN ? Dans la référence (210), la valeur de  $\lambda$  rapportée pour le mannitol est plutôt haute :  $\lambda = 1.83$  pour une distance de diffusion d'environ  $\sim 2.8$   $\mu\text{m}$ . Cette valeur est plutôt surprenante, surtout si on considère que le mannitol est une molécule plus petite que le sucrose et possède un rayon hydrodynamique similaire à celui du NAA. Afin d'expliquer ce résultat inattendu, les auteurs proposent que les molécules de mannitol sont ici moins susceptibles d'être sensibles aux effets de pulsation périvasculaire en raison de la faible distance parcourue lors des mesures de diffusion. Cependant, les distances explorées dans notre propre étude ne sont que très légèrement supérieures. Nous pensons donc que les différentes valeurs de tortuosité peuvent à nouveau principalement s'expliquer par le fait que le mannitol semble moins spécifique de l'ECS que le sucrose, entraînant ainsi une surestimation de  $\lambda$  causée par une exploration partielle de l'ICS par les molécules de mannitol.

Il serait très intéressant d'aller au-delà de la simple constatation que l'ADC du sucrose décroît avec le  $t_d$  afin d'étudier si cette tendance suit une loi de puissance telle que prédite et observée dans les travaux théoriques et expérimentaux de l'équipe de Novikov et collègues (112,114,115). Malheureusement, nos données expérimentales ne sont pas assez précises pour se lancer dans une telle analyse (pas assez de points de mesure, bruit important à très longs  $t_{ds}$ ).

#### IV.4.iv. ABSENCE D'ANISOTROPIE MICROSCOPIQUE DANS L'ESPACE EXTRACELLULAIRE

Ainsi que détaillé dans le **Chapitre III**, les mesures DDE permettent d'obtenir une sensibilité inégalée à l'anisotropie microscopique, c'est-à-dire à un phénomène de diffusion restreinte se produisant dans des structures fortement anisotropes telles que des cylindres ou des pores fortement allongés (158–160,215). On doit cependant souligner ici que les paramètres d'acquisition de la DDE, à savoir une faible valeur de  $b$  et un  $TM$  court, ont été choisis ici afin de permettre une quantification fiable du sucrose. Ils sont par conséquent assez éloignés de ceux communément employés, comme par exemple dans le **Chapitre III** ou d'autres études (143,161). On observe malgré tout une modulation angulaire du signal pour tous les métabolites intracellulaires, ce qui reflète à l'instar du **Chapitre III** une diffusion dans des compartiments allongés tels que les fibres cellulaires (143,161,216).

Ce comportement n'est cependant pas observé pour le sucrose. Cette observation supporte l'idée que l'ECS n'est pas un milieu fortement anisotrope à l'échelle microscopique, tout du moins dans la substance grise. Il est probable que l'anisotropie soit évidemment localement plus prononcée à l'échelle sub-micrométrique (fentes synaptiques, espaces clos). Toutefois, à l'échelle de nos mesures (c'est-à-dire quelques micromètres), toute corrélation spatiale semble clairement perdue entre l'application des deux blocs de diffusion successifs, expliquant ainsi l'absence de modulation du signal dans l'ECS. A notre connaissance, il s'agit de la première fois que des mesures de DDE sont effectuées spécifiquement dans l'ECS, et nous pensons que cette technique se révèle particulièrement pertinente pour distinguer les compartiments extra- et intracellulaires.

Enfin, on peut remarquer que le lactate exhibe un comportement intermédiaire, c'est-à-dire une atténuation du signal plus prononcée accompagnée d'une modulation angulaire du signal toujours observable mais moins marquée par rapport aux métabolites purement intracellulaires. Ces résultats concordent avec ceux du **Chapitre III** et semblent refléter une fois de plus l'existence d'un pool important de lactate extracellulaire ne présentant pas ou peu de modulation angulaire due à la  $\mu A$  locale.

#### IV.4.v. IMPACT DU PROTOCOLE D'INJECTION

De façon assez frappante, les mesures aux hautes valeurs de  $b$  dévoilent une restriction plus importante dans le cortex que dans l'hippocampe. Des différences au niveau de la microstructure entre les deux aires étudiées pourraient expliquer ce phénomène, comme par

exemple une densité plus importante d'espaces clos et/ou une organisation des cellules plus compactes dans le cortex. Cette interprétation doit néanmoins être fortement nuancée car, contrairement au protocole d'injection intra-ventriculaire, l'injection de sucrose directement dans les tissus semble endommager localement la microstructure. Les cartographies de MD présentées dans la **Figure IV-7.B** montrent en effet une diminution très localisée de l'ADC de l'eau (d'environ 60% dans un volume correspondant à ~6 % du voxel spectroscopique) au niveau des sites d'injection. Il est donc probable que l'injection du sucrose directement dans les tissus puisse potentiellement imposer plus de restriction dans notre voxel expérimental.

Les différences observées pourraient également s'expliquer par le fait qu'une sous-population non négligeable de sucrose pénétrerait les cellules endommagées lors de son injection, sondant ainsi partiellement l'ICS. Cette hypothèse est cohérente avec l'atténuation du signal observée aux hautes valeurs de  $b$  qui suggère une sensibilité accrue à la restriction imposée par la microstructure par rapport à l'hippocampe. L'idée d'une sous-population de sucrose présente dans l'ICS pourrait également être en accord avec la très légère modulation d'amplitude du signal observée en DDE pour  $\phi=180^\circ$ . Cette interprétation doit cependant être nuancée par le fait que l'endommagement des cellules induit par l'insertion des canules reste un phénomène extrêmement local et non représentatif de l'entièreté du voxel, tout du moins d'après les données de DTI. De plus, le protocole de dissociation cellulaire n'a pas révélé la présence de sucrose dans la fraction intracellulaire.

#### IV.4.vi. UNE SENSIBILITÉ AU SYSTÈME GLYMPHATIQUE ?

##### **a. VASCULATURE CEREBRALE ET SYSTEME GLYMPHATIQUE**

La vasculature forme un long réseau d'artères, veines et capillaires dont le rôle est de subvenir en continu aux besoins énergétiques du cerveau. De nombreuses artères et veines capillaires (dizaine de micromètres de diamètre) pénètrent perpendiculairement les différentes couches corticales et sont reliés par un réseau de capillaires sanguins (~4  $\mu\text{m}$  de diamètre) qui établissent un maillage fin au sein du tissu cérébral. La densité des capillaires est en revanche plus faible dans la substance blanche (28,217).

La barrière hématoencéphalique permet de réguler et filtrer les échanges de solutés ayant lieu entre les vaisseaux et le système nerveux central afin de protéger les cellules cérébrales, vulnérables par nature, de potentiels agents pathogènes ou de la présence d'ions dans le sang pouvant venir perturber le signal synaptique. Elle est composée de quatre types cellulaires

(cellules endothéliales, péricytes, cellules musculaires lisses vasculaires et astrocytes) qui œuvrent de concert afin de maintenir son bon fonctionnement tout en établissant un dialogue métabolique complexe avec les neurones, plus communément appelé couplage neurovasculaire (218,219).

Il a récemment été proposé par Iliff *et al* que la vasculature cérébrale constituerait l'armature du « système glymphatique » (220). Ce mot, établi à partir de la contraction des termes « glie » et « système lymphatique », décrit un système d'exfiltration des déchets présents dans le fluide interstitiel reposant sur l'établissement d'un flux convectif dans les tissus. La production du liquide cébrospinal au niveau des ventricules par le plexus choroïde génère un gradient de pression entraînant la circulation du liquide dans l'espace périvasculaire (espace séparant les parois des vaisseaux des pieds astrocytaires) des artères traversant l'espace sous-arachnoïdien. Le flux est ensuite maintenu par la tension pulsatile artérielle, permettant ainsi au liquide cébrospinal de poursuivre son chemin plus profondément dans les tissus le long des artères pénétrantes (221). Il est ensuite échangé avec le fluide interstitiel par le truchement des pieds astrocytaires et plus précisément de l'aquaporine-4, une protéine transmembranaire autorisant le passage de l'eau. La relative perméabilité des astrocytes conférée par l'aquaporine-4 rend possible l'établissement d'un mouvement de convection dans le milieu extracellulaire, « propulsant » ainsi le fluide interstitiel et ses déchets métaboliques au niveau de l'espace paraveineux, avant d'atteindre finalement les ganglions lymphatiques du cou (222–224). L'existence d'un tel flux convectif comme étant le système de transport majoritaire dans le milieu extracellulaire (par opposition à la seule diffusion) reste cependant l'objet de vifs débats (131,132,225). Des études très récentes se posent donc la question de savoir si les déplacements dans l'ECS sont principalement gouvernés par le simple phénomène de diffusion ou par des flux convectifs (226–228).

Dans ce contexte, se pourrait-il que nos mesures soient sensibles à un tel système glymphatique ? Bien que nous ne puissions pas prétendre apporter ici une réponse définitive à cette épineuse question, il est intéressant de souligner que dans chaque cas (cortex vs hippocampe) l'évolution temporelle de l'ADC du sucrose ne semble pas refléter des mécanismes de transport actif, ce qui aurait plutôt résulté en une augmentation de l'ADC en fonction du  $t_d$ .

De très récentes études se sont néanmoins penchées sur l'évaluation par IRM du système glymphatique et de ses forces motrices. Chez l'Homme, Hirschler et collègues (229) ont mis au

point une séquence pondérée en  $T_2$  couplée à des mesures d'encodage de la vitesse permettant d'obtenir un contraste spécifique au CSF et ainsi d'évaluer sa mobilité dans les ventricules, le long de l'artère cérébrale moyenne ainsi que de plus petites artères (telles que les artéριοles pénétrantes dans le cortex ou encore les artéριοles des noyaux gris centraux). En synchronisant leurs données avec le cycle cardiaque, les auteurs mettent en lumière une relation entre la mobilité du CSF et les différentes phases du cycle cardiaque. Cet effet, bien que plus marqué au niveau des ventricules ainsi que l'espace périvasculaire de l'artère cérébrale moyenne, est également mesurable aux niveaux des artères plus fines. D'après les auteurs, la pulsativité cardiaque constitue donc une des forces motrices principales du système glymphatique, supportant l'existence d'un flux actif de CSF dans ces espaces.

Dans une démarche similaire chez l'Homme, Sepehrband *et al* ont optimisé une méthode de post-traitement permettant d'obtenir un contraste amélioré des espaces périvasculaires à partir d'une série d'images haute résolution pondérées en  $T_1$  et  $T_2$  (230). Cette approche a ensuite été mise à profit par la même équipe afin de segmenter finement les espaces périvasculaires dans la substance blanche (231), révélant ainsi un réseau important de CSF périvasculaire pénétrant profondément dans les tissus et circulant dans des structures dont le calibre moyen est estimé à  $\sim 0.88$  mm.

Bien que présentant des données inédites sur la mobilité et la distribution spatiale du CSF dans les ventricules et les espaces périvasculaires, ces deux études ne nous indiquent cependant pas en quoi ce « compartiment périvasculaire » contribue au signal global de diffusion dans l'ECS, notamment à faibles valeurs de  $b$ .

Afin d'apporter des éléments de réponse, Sepehrband (232) a réalisé par la suite des acquisitions d'images dans les noyaux gris centraux chez l'Homme pour différentes pondérations en diffusion jusque  $b=800 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  dans le but de comparer deux aires exhibant différents profils vasculaires (faiblement vs fortement vascularisé). Ces mesures dévoilent une atténuation du signal systématiquement plus importante dans la zone plus fortement vascularisée. En outre, bien que la fraction d'espace périvasculaire soit petite au regard du volume d'intérêt total, les simulations effectuées par l'auteur suggèrent que l'impact sur le signal global de diffusion reste néanmoins très important (la présence d'un seul vaisseau entouré de CSF pourrait contribuer à hauteur de  $\sim 25\%$  au signal total de diffusion à faibles valeurs de  $b$ ). L'auteur en conclut donc que la contribution des espaces périvasculaires au signal global de diffusion dans l'ECS est non négligeable. Il met ainsi en lumière deux composantes de la diffusion dans ce milieu : 1) un

pool diffusant rapidement dans les espaces périvasculaires et 2) un pool diffusant plus lentement dans le parenchyme.

Sepehrband évoque finalement l'idée d'un phénomène de diffusion rapide venant s'ajouter au seul effet de la perfusion vasculaire (effet IVIM). Cette vision est loin d'être incompatible avec nos résultats. Bien que les protocoles d'injection entrepris dans la présente étude ne laissent pas supposer une accumulation du sucrose spécifiquement dans les espaces périvasculaires, il n'est pas exclu que la diffusion rapide du sucrose soit en partie expliquée par une diffusion plus particulièrement rapide dans ces structures. Tout cela reste malgré tout à nuancer par le fait que nos mesures ont été effectuées dans la substance grise chez la souris : on pourrait donc s'attendre à ce que la distribution et le volume de CSF périvasculaire soient ici bien différents de ceux de la substance blanche chez l'Homme.

## IV.5. CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons évalué les propriétés de diffusion du sucrose dans l'espace extracellulaire grâce à des protocoles avancés de DW-MRS. Nos résultats penchent en faveur d'une diffusion dans l'ECS environ deux à trois fois plus rapide que dans l'ICS. Cependant, nos mesures révèlent également que la diffusion dans l'ECS ne correspond pas à de la diffusion libre mais reflète de la restriction et de la tortuosité imposées par la microstructure. Plus précisément, nous avons estimé une valeur de tortuosité d'environ  $\sim 1.6$  qui tend à augmenter avec le  $t_d$ , ce qui indique que le régime de tortuosité n'est pas encore atteint pour nos conditions expérimentales (la valeur maximale du  $t_d$  étant ici d'une seconde). En outre, les mesures effectuées à hautes valeurs de  $b$  dévoilent un certain degré de sensibilité à de la restriction se produisant sur de très faibles distances. Pourtant, l'absence de modulation du signal du sucrose lors des mesures DDE révèle un comportement très différent des métabolites intracellulaires. Nous proposons que cette signature spécifique du « signal » DDE peut être utilisée afin de discriminer avec succès les compartiments intra- et extracellulaires.

---

# CHAPITRE V. DEVELOPPEMENT D'UNE SEQUENCE GLUTAMATE-CEST PONDEREE EN DIFFUSION : RESULTATS PRELIMINAIRES ET PISTES D'AMELIORATION

## V.1. INTRODUCTION

### V.1.i. L'EFFET GLUCEST EN BREF

Cette partie a pour but de détailler brièvement les mécanismes sur lesquels reposent l'effet CEST ainsi que d'identifier les notions importantes abordées par la suite dans ce chapitre. Le lecteur est invité à consulter le manuscrit de thèse d'un ancien doctorant du laboratoire pour une description mathématique plus détaillée de l'effet CEST (233) ainsi que la revue de Zaiss et Bachert (234).

Le transfert de saturation par échange chimique, plus communément nommé par son acronyme anglais CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer), repose sur l'échange de protons entre un soluté donné et son solvant, dans notre cas l'eau. Plus précisément, il est possible de saturer l'aimantation d'une molécule en appliquant une longue impulsion ou un train d'impulsions RF à la fréquence de résonance de la molécule ciblée. L'échange constant de protons entre la molécule d'intérêt et l'eau entraîne alors un transfert de saturation entre le soluté et son solvant, induisant par conséquent une diminution de l'intensité du signal de l'eau directement proportionnelle à la concentration du soluté. L'intérêt principal de cette approche est qu'elle rend possible l'observation de solutés présents en faible quantité dans l'échantillon : alors que l'aimantation des protons labiles de la molécule d'intérêt est souvent trop faible pour être observée directement, la diminution de l'intensité du pic de l'eau résultant du transfert de saturation est quant à elle facilement quantifiable.

Plusieurs modalités d'interaction avec l'eau libre sont susceptibles de donner lieu à un effet CEST, englobant à la fois le transfert d'aimantation lié au couplage dipolaire (plus connu sous la dénomination de contraste de transfert d'aimantation) et le transfert d'aimantation résultant des échanges chimiques de protons portés par des groupes fonctionnels, principalement de type



amine (-NH<sub>2</sub>), amide (RCONR'R'') ou hydroxyle (-OH) dans le cas des molécules biologiques. Dans ce chapitre, nous nous intéressons uniquement au glutamate dont l'effet CEST (gluCEST) est le résultat des échanges chimiques ayant lieu entre les protons amine de la molécule et l'eau.

McConnell modifie dès 1958 les équations de Bloch afin de prendre en compte les effets du transfert d'aimantation dus aux échanges chimiques entre deux molécules (235). En considérant deux pools A (solvant) et B (soluté), ce nouveau système d'équations fait ainsi entrer en jeu les paramètres suivants :

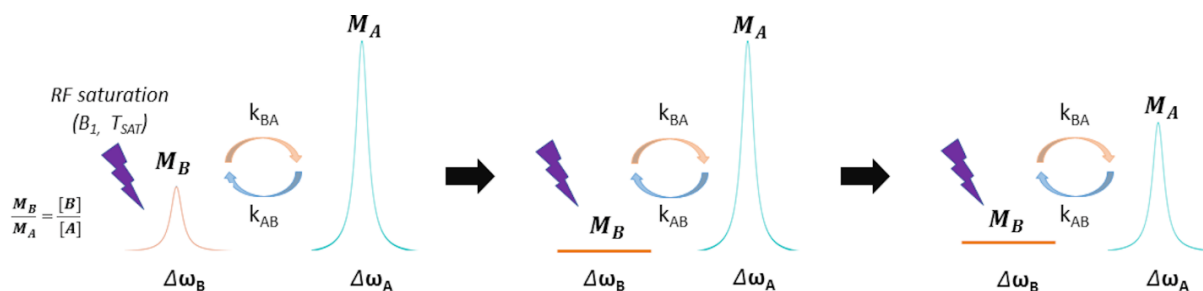
- $M_{0A}$  et  $M_{0B}$ , les aimantations relatives à l'équilibre des pools A et B ;
- $R_{1A}$  et  $R_{1B}$ , les taux de relaxation longitudinale des pools A et B ;
- $R_{2A}$  et  $R_{2B}$ , les taux de relaxation transversale des pools A et B ;
- $\omega_1 = 2\pi\gamma B_1$ , l'amplitude de l'onde RF de saturation;
- $\Delta\omega_A$  et  $\Delta\omega_B$ , la différence de fréquence entre la fréquence de résonance des pools et la fréquence de l'impulsion RF ;
- $k_{AB}$  et  $k_{BA}$ , les constantes d'échange du pool A au pool B et vice versa.

Il est possible de simplifier le système et d'obtenir une solution analytique lorsque  $M_{0A} = M_{0B}$ . Deux régimes d'échange peuvent ainsi être considérés, à savoir les échanges lents et les échanges rapides. La modélisation de ces deux régimes permet de mettre en lumière une condition sur le taux d'échange :  $k_{BA}$  doit être très inférieur devant  $|\Delta\omega_A - \Delta\omega_B|$  afin de permettre la distinction fréquentielle entre les deux pools. On peut noter ici que la différence de déplacement chimique entre les deux pools augmente en fréquence avec le champ magnétique, ce qui est alors plus favorable pour l'observation de molécules exhibant un taux d'échange plus élevé.

Les paramètres de saturation (durée  $T_{sat}$  et intensité  $B_1$  de l'impulsion RF à la fréquence  $\Delta\omega_B$ ) jouent également un rôle important dans l'observation de l'effet CEST. Lorsque la saturation du pool B est totale, l'efficacité du transfert de saturation dépend alors uniquement de deux paramètres :

- le taux d'échange  $k_{BA}$  entre les deux pools (plus ce dernier est lent plus  $T_{sat}$  doit être long) ;
- le taux de relaxation transversale  $R_{1A}$  (le transfert de saturation n'aura pas d'effet significatif si la repousse longitudinale de l'aimantation du pool A a lieu trop rapidement).

La **Figure V-1** illustre de façon simplifiée le principe de l'effet CEST dans le cas d'un régime d'échanges lents accompagné d'une saturation totale du pool B.



**Figure V-1 : Illustration de l'effet CEST. Deux pools de molécules A (solvant) et B (soluté) échangent constamment des protons dans un régime dit « lent » ( $k_{BA} \ll |\Delta\omega_A - \Delta\omega_B|$ ). Une impulsion de saturation RF est appliquée avec une intensité  $B_1$  pendant une durée  $T_{sat}$  jusqu'à totalement détruire l'aimantation du pool B. Au bout d'un certain temps, un transfert de saturation survient du pool B vers le pool A par l'intermédiaire des échanges de protons ayant lieu entre les deux pools. Ce phénomène entraîne une diminution de l'aimantation du pool A proportionnelle à la concentration du pool B.**

Cependant, la saturation des protons du pool B n'est en pratique que partielle voire faible car la saturation totale de l'aimantation nécessite un  $T_{sat}$  très long ( $\geq 5T_{1B}$ ) associé à un dépôt d'énergie trop important. A titre d'exemple, on utilise en général pour le gluCEST un train de 10 impulsions de 100 ms séparées d'un délai de 20  $\mu$ s, soit un  $T_{sat}$  d'environ 1 s. L'efficacité du transfert de saturation dépend alors de paramètres expérimentaux supplémentaires, telles que le rapport de concentration entre les pools A et B, ainsi que du  $T_{sat}$  et du  $B_1$ . Bien qu'une valeur de  $B_1$  élevée entraîne un effet CEST d'autant plus prononcé, il convient de ne pas employer un  $B_1$  trop intense afin d'éviter tout effet de saturation directe des protons du solvant. Il est intéressant de souligner que la valeur de  $B_1$  optimale est directement liée au taux d'échange  $k_{BA}$  (236):

$$B_{1opt} = \frac{k_{BA}}{2\pi\gamma} \quad (\text{Equation VI.1.1})$$

En considérant un  $k_{BA}$  de 1000 Hz pour le glutamate, on obtient une valeur de  $B_1$  optimale de 4  $\mu$ T. On peut remarquer par ailleurs que nous nous situons ici dans le cas d'un régime d'échanges intermédiaires ( $k_{BA} \approx |\Delta\omega_A - \Delta\omega_B|$ ) dont l'observation est rendue possible par l'utilisation d'un haut champ de 11.7 T.

Afin de caractériser expérimentalement l'effet CEST, on procède en pratique à l'acquisition du z-spectrum : l'idée est ici d'appliquer la ou les impulsions de saturation de façon à balayer une

large gamme de fréquences – ou ppm- autour de la fréquence de l'eau. On peut alors tracer la valeur de l'intégrale du pic de l'eau en fonction de la fréquence de saturation  $f_{\text{sat}}$ . Par convention, l'échelle des ppm est centrée autour de la fréquence de résonance de l'eau ( $\Delta\omega_{\text{H}_2\text{O}} = 0$  ppm). En l'absence d'effet CEST, le z-spectrum attendu est complètement symétrique et s'annule en 0 ppm en raison de la saturation directe des protons de l'eau. Le z-spectrum devient en revanche asymétrique en présence de l'effet CEST : la saturation des molécules du pool B se produit lorsque  $f_{\text{sat}} = \Delta\omega_B$ , entraînant l'apparition d'un minimum local sur le z-spectrum (qui n'est pas observé pour la valeur symétrique  $f_{\text{sat}} = -\Delta\omega_B$ ). Dans ce contexte, il est utile d'exprimer l'effet CEST par le ratio de transfert d'aimantation asymétrique, plus couramment désigné par son acronyme anglais MTRasym (*Asymmetrical Magnetization Transfer Ratio*). Le MTRasym, correspond au rapport de la différence entre les parties positives et négatives du z-spectrum sur l'intensité du pic de l'eau obtenue pour une valeur de  $f_{\text{sat}}$  hors-résonance :

$$MTRasym(f_{\text{sat}}) = \frac{M_{za}(-f_{\text{sat}}) - M_{za}(f_{\text{sat}})}{M_{0A}} \quad (\text{Equation V.1.2})$$

Des exemples de z-spectra et de MTRasym correspondants sont présentés dans la suite de ce chapitre.

#### V.1.ii. GLUCEST ET DIFFUSION : UNE NOUVELLE SOURCE DE CONTRASTE POUR DISTINGUER LES ESPACES INTRA- ET EXTRANEURONAL ?

Nous avons vu au cours du **Chapitre I** qu'une analyse quantitative des données d'IRM de diffusion passe par la modélisation de ces dernières dans le but d'inférer des paramètres caractérisant la microstructure tels que les diffusivités axiales et radiales, l'anisotropie fractionnelle ou encore l'orientation/dispersion des fibres. A titre d'exemple, un faisceau de fibres neuronales peut être modélisé par un ensemble de cylindres présentant une distribution de rayon et d'angle de dispersion par rapport à un axe principal (cf **Partie I.6.iii**). On considère alors trois compartiments aux propriétés de diffusion bien distinctes : un pool intra-axonal, marqué par une diffusion restreinte principalement unidirectionnelle, un pool extra-axonal, présentant une diffusion anisotrope mais non-restreinte, et un pool correspondant à une possible contribution du CSF provenant des ventricules caractérisé par une diffusion libre (136,156,237).

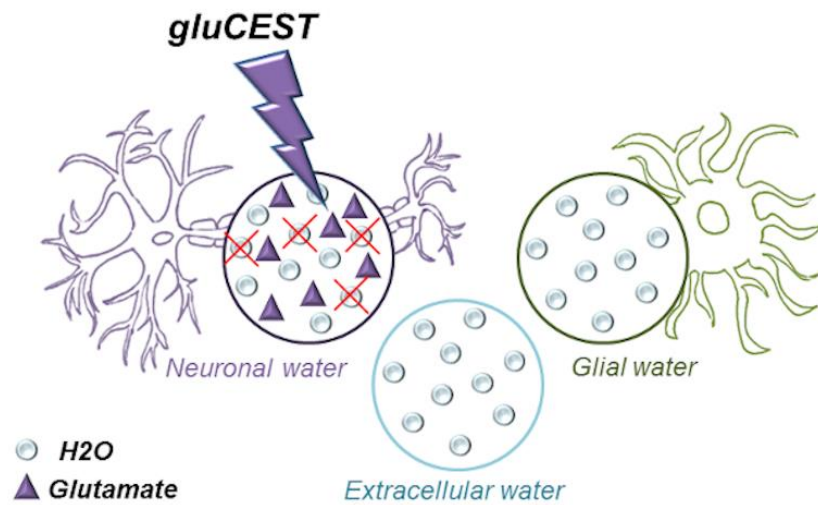
Ainsi qu'évoqué dans le **Chapitre I**, il est nécessaire de modéliser le signal de diffusion dans son ensemble. Malheureusement, une dégénérescence des solutions caractérisées par des minimums locaux peu « profonds » est souvent observée lorsque l'on tente d'ajuster les données expérimentales au modèle présenté ci-dessus (136–138,156). La nature ubiquitaire de

l'eau rend fondamentalement difficile, si ce n'est impossible, de spécifiquement capturer les propriétés de diffusion au sein des différents compartiments cellulaires et extracellulaire. Ce manque de spécificité nous empêche d'accéder expérimentalement aux propriétés de diffusion dans chaque compartiment, ce qui permettrait de lever cette dégénérescence des solutions. Ce phénomène a pour conséquence de rendre l'estimation des paramètres décrivant la microstructure très sensible au bruit expérimental. Des connaissances *a priori* supplémentaires sont donc nécessaires afin de différencier expérimentalement la contribution des différents compartiments et affiner les hypothèses sur lesquelles repose la modélisation des données.

Un exemple d'hypothèse de départ particulièrement débattue consiste à savoir si la diffusion dans l'ICS est plus lente ou plus rapide que dans l'ECS (136,137). Afin de répondre à cette question, il est crucial de pouvoir spécifiquement mesurer la diffusion de l'eau dans ces compartiments. Pour ce faire, de précédentes approches expérimentales se sont appuyées sur l'injection intracérébrale d'agent de contraste tel que le gadolinium afin de venir moduler la contribution du compartiment extracellulaire lors de mesures de diffusion (136,238,239). Il est également possible d'injecter des sondes exogènes de l'ECS mesurables en DW-MRS, telles que le sucrose employé dans le **Chapitre IV** de ce manuscrit, afin de comparer leur profil de diffusion à celui obtenu pour des métabolites purement intracellulaires (109,210). Ces approches ne sont cependant pas idéales car elles nécessitent l'utilisation d'un marqueur exogène, ce qui pose plusieurs problèmes : 1) il n'est pas exclu que de telles sondes puissent altérer l'équilibre osmotique et par conséquent endommager la microstructure cellulaire, 2) la spécificité au milieu extracellulaire de ces marqueurs peut s'avérer limitée, 3) les interactions spécifiques avec les membranes ou la matrice extracellulaire pour ces molécules peuvent différer de l'eau et 4) ces approches ne sont pas envisageables chez l'Homme.

Le but du présent travail est par conséquent de proposer une nouvelle approche ne requérant pas l'injection d'un marqueur exogène. Plus précisément, nous proposons d'utiliser ici le contraste CEST de métabolites endogènes confinés dans des compartiments tissulaires spécifiques afin de moduler la contribution relative du pool d'eau associé. Nous implémentons cette idée pour le glutamate, un marqueur neuronal bien connu pour lequel il est possible d'obtenir un effet CEST important grâce aux échanges rapides entre les protons de sa fonction amine et l'eau (240). Nous avons donc rajouté un module de saturation CEST dans une séquence de DW-MRS afin de réduire la contribution du pool d'eau neuronal au signal de diffusion (cette approche est illustrée en **Figure V-2**). Nous avons ensuite effectué des mesures

sur dix rats, d'abord dans un voxel principalement composé de substance grise dans le cortex (N=5), puis dans un voxel de substance blanche placé dans le corps calleux (N=5).



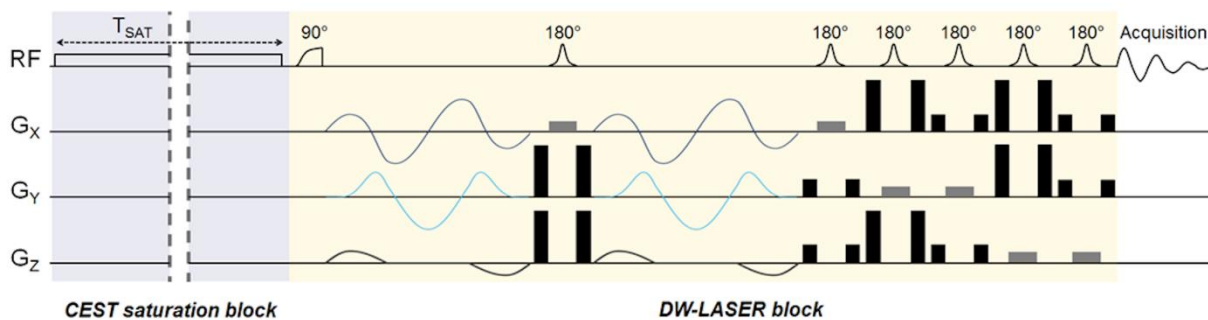
**Figure V-2 : Illustration de l'approche expérimentale explorée dans ce chapitre. Le glutamate est un marqueur endogène du compartiment neuronal et les protons de sa fonction amine effectuent des échanges constants avec l'eau intra-neuronale. Il est donc normalement possible de saturer spécifiquement ce pool d'eau via l'effet CEST. La contribution du pool d'eau intra-neuronale au signal de diffusion se trouve alors amoindrie par rapport à l'eau des compartiments glial et extracellulaire (à condition que les échanges d'eau entre compartiments soient négligeables durant le temps de saturation  $T_{sat}$ ).**

## V.2. METHODES SPECIFIQUES

### V.2.i. SEQUENCE DEVELOPPEE

La **Figure V-3** présente le schéma de la séquence développée dans le cadre de ce travail. Un module de saturation gluCEST ( $T_{\text{sat}}=300$  ms) comprenant 3 impulsions RF de  $9 \mu\text{T}$  séparées d'un délai de  $20 \mu\text{s}$  est implémenté au début d'une séquence LASER adiabatique pondérée en diffusion. Pour les mesures dans le cortex, une pondération en diffusion isotrope dans l'espace, ce qui est intéressant dans le cas de très petits voxels pour lesquels on ne peut plus supposer une organisation macroscopique isotrope de la microstructure, est obtenue grâce à l'utilisation de gradients QMAS, développés par Topgaard et collègues (241), insérés de part et d'autre de la première impulsion de refocalisation ( $\delta=15$  ms). Une approche similaire a déjà été employée dans notre équipe pour les gradients oscillants (voir (103,104) pour référence). Pour les mesures directionnelles dans le corps calleux, les gradients QMAS ont été remplacés par des gradients oscillants.

Le TE est égal à 55 ms tandis que le TR est fixé à 7.5 s afin de permettre à l'aimantation de l'eau de repousser complètement en z. Enfin, nous avons également vérifié dans un fantôme que l'ADC de l'eau ne variait pas en fonction des différents offsets de saturation.



**Figure V-3 : Chronogramme de la séquence proposée alliant contraste CEST et mesure de diffusion.**

### V.2.ii. MESURES ISOTROPES DANS LE CORTEX (SUBSTANCE GRISE)

Les mesures sont effectuées sur cinq rats femelles (Sprague-Dawley) anesthésiés à l'isoflurane. Nous utilisons par ailleurs une antenne volumique afin d'assurer un  $B_1$  permettant l'obtention d'un contraste gluCEST homogène sur tout le cerveau. Une antenne de surface en quadrature est privilégiée en réception afin de maximiser le SNR.

Un voxel de  $6 \times 2 \times 4 \text{ mm}^3$  est positionné dans une région corticale riche en glutamate au-dessus du corps calleux. Les ventricules sont soigneusement exclus du voxel d'intérêt afin d'éliminer toute contamination potentielle en provenance du CSF.

Un z-spectrum est mesuré afin d'évaluer l'effet gluCEST dans notre voxel pour des paramètres de saturation correspondant à  $T_{\text{sat}}=300 \text{ ms}$  et  $B_1=9 \text{ } \mu\text{T}$ . A cet effet, une série de spectres de l'eau est acquise pour différents offsets de saturation entre -5 et +5 ppm par pas de 0.1 ppm, soit 50 Hz (total de 101 spectres).

Trois offsets de saturation sont finalement retenus pour le reste des mesures gluCEST pondérées en diffusion, à savoir +3 ppm (la résonance des protons amine du glutamate), -3 ppm (contrôle symétrique) et -20 ppm (signal de référence hors- résonance). Pour rappel, la convention CEST considère que la résonance de l'eau est ici à 0 ppm. L'ADC est ensuite estimé pour chaque fréquence de saturation grâce à une mesure pour deux valeurs de  $b$  (à  $b_0/b= 0.2/1.2 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ). La mesure est répétée dix fois pour chaque animal, chaque acquisition correspondant à 8 répétitions entrelacées pour chaque offset de saturation (correspondant donc à un total de 24 scans par acquisition).

### V.2.iii. MESURES DIRECTIONNELLES DANS LE CORPS CALLEUX (SUBSTANCE BLANCHE)

Des mesures directionnelles sont acquises chez 5 rats dans un voxel de dimensions  $2 \times 1 \times 4 \text{ mm}^3$  soigneusement positionné de façon à épouser le corps calleux. Dans ce cas, une paire de gradients symétriques sinusoïdaux (une période,  $\delta=15 \text{ ms}$ ) est appliquée dans la direction X (principalement parallèle aux fibres) ou Y (principalement perpendiculaire aux fibres). La mesure est répétée sept fois dans chaque direction, correspondant à un temps de mesure total de 80 minutes. De façon similaire aux mesures corticales, huit répétitions entrelacées pour chaque fréquence de saturation sont effectuées par acquisition.

### V.2.iv. ANALYSE DES DONNEES

L'intensité du pic de l'eau est estimée par intégration de la partie réelle du spectre (sur 100 points centrés autour du maximum). Le % d'effet CEST ( $MTR_{\text{asym}}$ ) pour une fréquence de saturation donnée est calculé selon la formule suivante :

$$MTR_{\text{asym}} = \frac{S_{(-fsat)} - S_{(+fsat)}}{S_{-5 \text{ ppm}}} \times 100 \quad (\text{VI.2.1})$$

Ainsi qu'expliqué dans le **Chapitre II** de ce manuscrit, des corrections individuelles en phase et en fréquence ont été réalisées avant de sommer chaque scan individuel des spectres de l'eau pour chaque offset de saturation. L'ADC est ensuite calculé selon la formule suivante :

$$ADC = \frac{1}{\Delta b} \times \frac{S_{b=1.2 \mu m^2/ms}}{S_{b=0.2 \mu m^2/ms}} \quad (\text{VI.2.2})$$

Enfin, les valeurs d'ADC pour chaque fréquence de saturation sont représentées sous forme de boîtes à moustaches générés grâce à la boîte à outils Matplotlib disponible dans Python 3.

#### V.2.v. MESURE CONTROLE SUR FANTOME

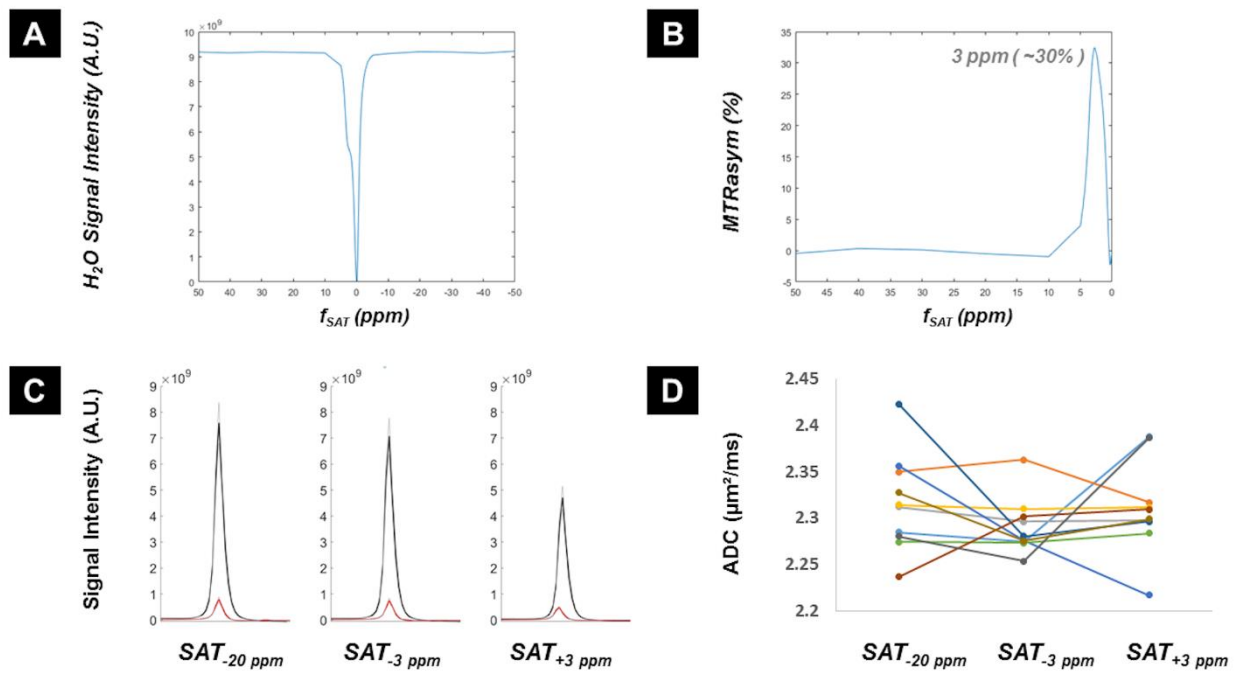
Des mesures contrôles sont également effectuées sur une solution de glutamate concentrée à 50 mM (pH ajusté à 7) avec des paramètres de saturation similaires afin de vérifier que les mesures d'ADC demeurent stables en fonction des trois fréquences de saturation. Dix mesures d'ADC sont réalisées au cours de la même expérience pour les trois fréquences de saturation. Pour le calcul du MTRasym, le signal est normalisé par rapport au signal obtenu avec une saturation effectuée à -20 ppm de l'eau et non -5 ppm.



## V.3. RESULTATS

### V.3.i. MESURE CONTROLE DANS UNE SOLUTION DE GLUTAMATE A 50 MM

La **Figure V-4** montre les résultats obtenus lors de mesures contrôles sur un fantôme de glutamate. Un épaulement aux alentours de 3 ppm, la fréquence de résonance du glutamate, est clairement visible sur la partie positive du z-Spectrum (**Figure V-4.A**), correspondant à un effet CEST de ~30 % après calcul du MTR<sub>asym</sub> (**Figure V-4.B**). Les spectres correspondants à la moyenne  $\pm$  s.d. sur les dix acquisitions sont consultables sur la **Figure V-4.C** pour les deux valeurs de pondération en diffusion ( $b_0=0.2$  ms/ $\mu\text{m}^2$  et  $b=1.2$  ms/ $\mu\text{m}^2$ ) ainsi que pour les trois fréquences de saturation à -20 ppm, -3 ppm et 3 ppm. Les valeurs d'ADC correspondantes sont disponibles en **Figure V-4.D** et sont égales à  $2.32 \pm 0.05$   $\mu\text{m}^2/\text{ms}$  pour  $f_{\text{sat}} = -20$  ppm,  $2.29 \pm 0.03$   $\mu\text{m}^2/\text{ms}$  pour  $f_{\text{sat}} = -3$  ppm et  $2.31 \pm 0.05$   $\mu\text{m}^2/\text{ms}$  pour  $f_{\text{sat}} = 3$  ppm. De façon générale, aucune différence significative apparaît entre les valeurs d'ADC en fonction des trois fréquences de saturation. Plus précisément, 4 mesures sur 10 révèlent un ADC extrêmement stable en fonction de  $f_{\text{sat}}$  (taux de variation  $< 1$  %). De plus, 3 mesures montrent quant à elles une augmentation de l'ADC comprise entre 3.3 et 4.7 % pour la fréquence de résonance du glutamate à 3 ppm par rapport à  $f_{\text{sat}} = -20$  ppm tandis que 3 autres mesures font état de la tendance inverse, avec des diminutions de 1.2 à 5.9 %. Aucune tendance globale pour l'ADC en fonction de  $f_{\text{sat}}$  n'est par conséquent observée pour ce jeu de données. On note cependant des variations d'ADC pouvant être relativement importantes entre les mesures. Ces variations ne sont cependant pas constatées par la suite lors des mesures *in vivo*.



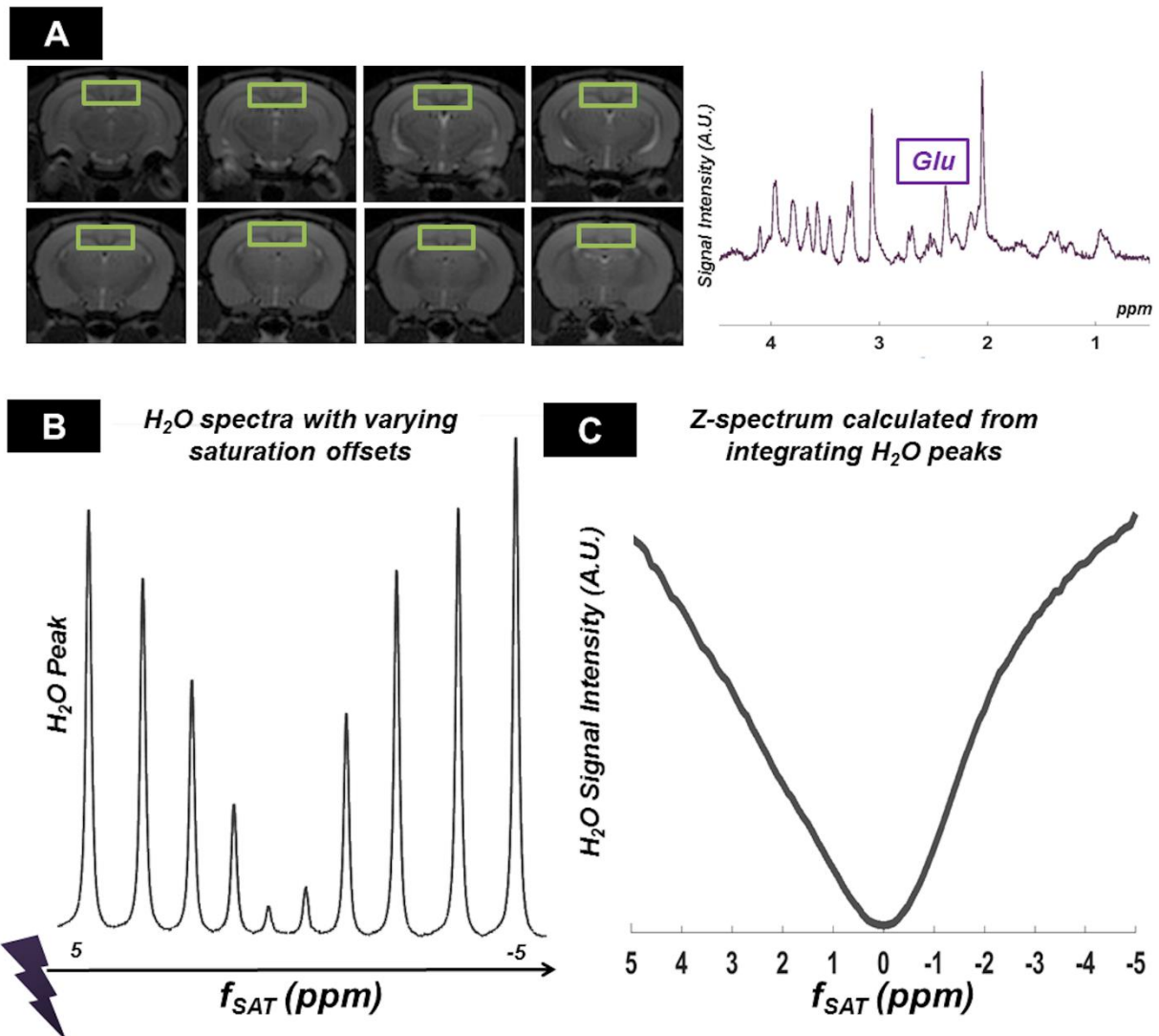
**Figure V-4 :** A) Z-spectrum mesuré sur une solution fantôme de glutamate concentrée à 50 mM. Chaque point correspond à l'intensité du signal de l'eau pour une fréquence de saturation donnée estimée par intégration de la partie réelle du spectre sur 100 points. B) MTRasym correspondant au z-spectrum montré en A. Un effet gluCEST d'environ 30% est observé à 3 ppm. C) Spectres de l'eau obtenus sans ( $b_0 = 0.2 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ , en noir) et avec ( $b = 1.2 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ , en rouge) pondération en diffusion pour les trois fréquences de saturation. Les spectres en gras correspondent au spectre moyen sur 10 acquisitions au cours d'une même expérience, tandis que les lignes grises correspondent au spectre moyen  $\pm$  s.d.

### V.3.ii. MESURES DANS LE CORTEX

Pour ce travail exploratoire, nous avons pris le parti de maximiser la sensibilité de détection au détriment de la résolution spatiale afin de pouvoir détecter des variations subtiles des propriétés de diffusion en fonction de  $f_{\text{sat}}$ . Une bonne résolution temporelle des mesures est par ailleurs également nécessaire afin de minimiser tout biais induit par des dérives potentielles du champ magnétique. Nous avons par conséquent décidé d'opter pour une approche en spectroscopie localisée plutôt qu'en imagerie.

Le glutamate est clairement détectable en spectroscopie conventionnelle du proton dans le voxel cortical (délimité en vert sur les images anatomiques présentées dans la **Figure V-5.A**), ce qui est prometteur pour la suite de nos expériences gluCEST.

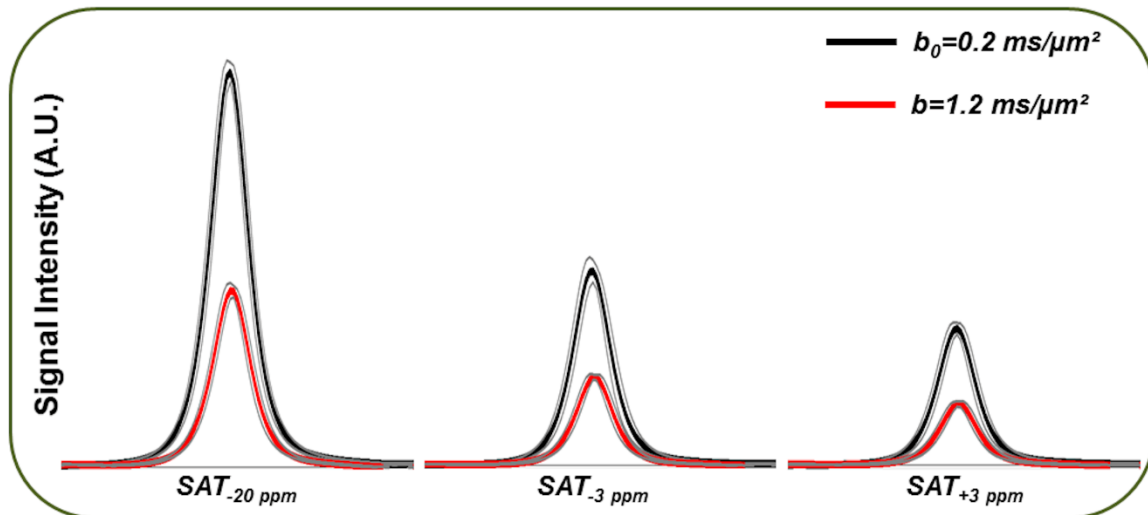
Environ 15% d'effet gluCEST est obtenue pour  $f_{\text{sat}}=+3$  ppm. La **Figure V-5.B** montre les spectres d'eau obtenus pour différents offsets de saturation entre -5 et +5 ppm (tous les spectres ne sont pas montrés ici pour des raisons de clarté) tandis que le z-spectrum correspondant est consultable en **Figure V-5.C**.



**Figure V-5 :** A) Série d'images anatomiques illustrant la position du voxel d'intérêt de dimensions  $6 \times 2 \times 4$  mm<sup>3</sup>. Une concentration satisfaisante de glutamate peut être observée sur le spectre <sup>1</sup>H correspondant (acquis sans pondération en diffusion ni saturation). Les ventricules ont été exclus avec soin du voxel. B) Série de 10 spectres d'eau obtenus en variant  $f_{\text{sat}}$  de 5 à -5 ppm. L'effet gluCEST sur la partie positive des fréquences de saturation est clairement visible. C) Z-spectrum acquis dans un cerveau de rat pour les paramètres de saturations choisis ( $B_1=9$   $\mu$ T et  $T_{\text{sat}}=300$  ms).

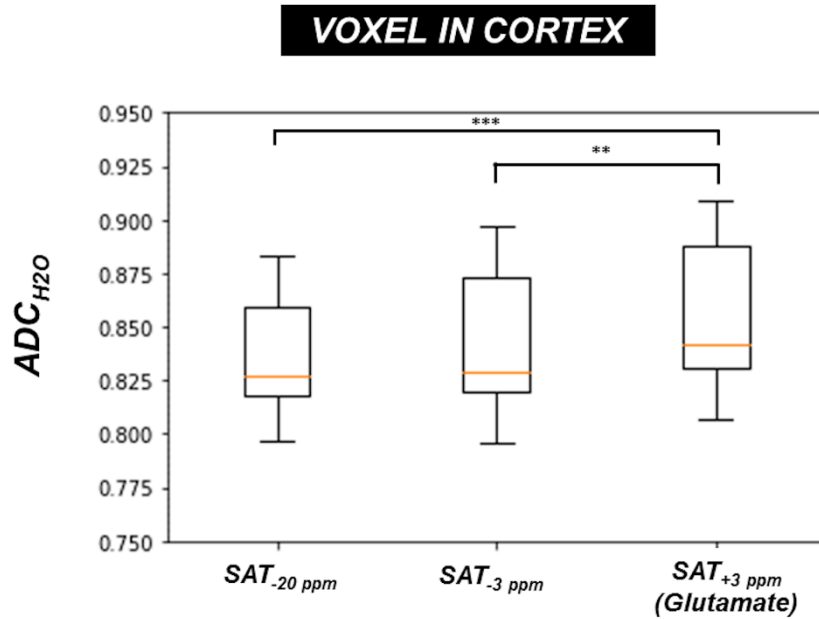
La **Figure V-6** montre un jeu de données acquis chez un animal correspondant aux spectres de l'eau moyennés sur 10 répétitions pour les trois fréquences de saturations choisies (-20, -3 et

+3 ppm), avec (en noir) et sans (en rouge) pondération en diffusion. Les spectres correspondant à la moyenne  $\pm$  s.d. apparaissent également en gris clair. On remarque ici que l'écart-type est plutôt faible, ce qui souligne la stabilité de la mesure durant toute la durée de l'expérience (60 min).



**Figure V-6 :** Exemple d'un jeu de données acquis chez un rat dans le voxel cortical. Les spectres sont moyennés sur dix acquisitions (chaque acquisition comprenant elle-même 8 scans individuels entrelacés avec les autres fréquences de saturation).

Les valeurs d'ADC obtenues pour les dix répétitions effectuées chez 5 animaux sont représentées sous forme de boîtes à moustaches en fonction des différents offsets de saturation dans la **Figure V-7**. Les valeurs d'ADC mesurées pour  $f_{\text{sat}}=+3$  ppm sont légèrement ( $\sim 1\%$ ) mais significativement supérieures à celles obtenues pour les autres fréquences de saturation, suggérant une diffusion de l'eau plus rapide dans l'ECS (et dans une moindre mesure, le compartiment glial) que dans l'espace intraneural. Cette tendance est observée chez tous les sujets, et la dispersion des valeurs d'ADC observable dans les boîtes à moustaches s'explique principalement par des variations inter-individus (voir la **Figure V-8**).



**Figure V-7 : Boîtes à moustaches des valeurs d'ADC (en  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ ) obtenues chez 5 animaux et pour chaque valeur de fréquence de saturation. La valeur médiane est représentée par une barre horizontale orange tandis que les premier ( $Q_1$ ) et troisième ( $Q_3$ ) quartiles sont en noir. Les moustaches englobent les valeurs d'ADC comprises dans l'intervalle  $1.5 \times [Q_3 - Q_1]$ . Les valeurs d'ADC mesurées à 3 ppm sont plus élevées que celles obtenues pour -3 et -20 ppm, ce qui suggère que la diffusion est plus lente dans les neurones (\*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$  d'après le U-test de Mann-Whitney). Les valeurs d'ADC sont quantifiées en effectuant le rapport des intégrales (sur 100 points autour du maximum) de la partie réelles des signaux obtenus avec et sans pondération en diffusion.**

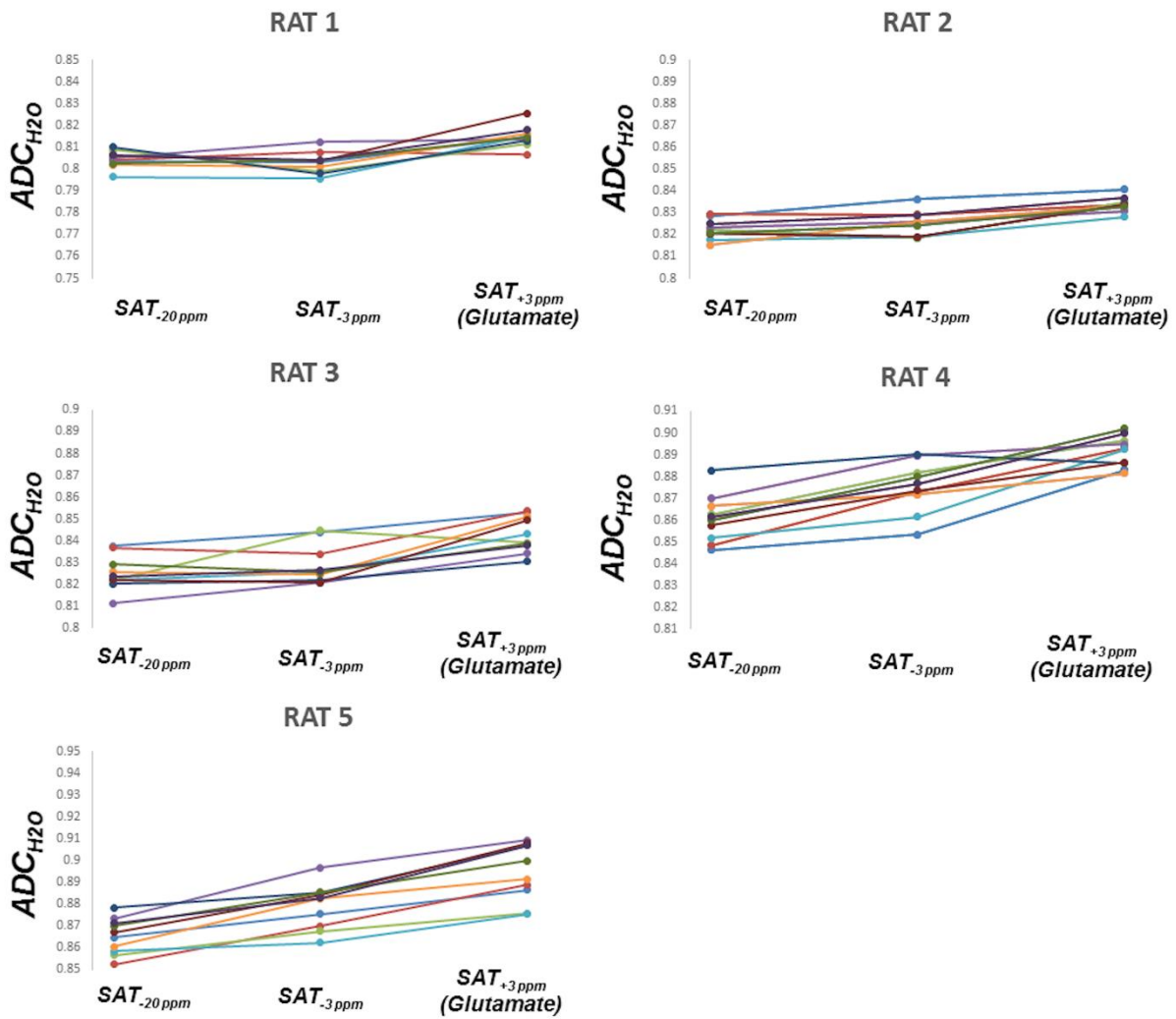


Figure V-8 : Valeurs d'ADC (dix répétitions) obtenues pour chaque rat en fonction des trois fréquences de saturation (-20, -3 et 3 ppm). L'ADC augmente pour  $f_{\text{sat}}=+3$  ppm chez chaque individu. Cette tendance est observable pour la quasi-totalité des répétitions individuelles effectuées sur un même rat. Les valeurs d'ADC obtenues pour la fréquence de saturation contrôle de -20 ppm varient d'un individu à l'autre entre 0.79 et 0.88  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ .

### V.3.iii. MESURES DANS LE CORPS CALLEUX

Les résultats prometteurs obtenus dans la substance grise nous ont encouragés à reproduire des mesures similaires dans une structure majoritairement composée de substance blanche, à savoir le corps calleux. Dans ce cas, des mesures directionnelles ont pu être effectuées à la fois parallèlement (application du gradient de diffusion dans la direction X) et perpendiculairement (application du gradient de diffusion dans la direction Y) aux fibres.

La **figure V-9.A** présente une série d'images anatomiques montrant la position du voxel autour du corps calleux ainsi que le spectre MRS correspondant. Le glutamate est toujours détectable en dépit de la diminution du SNR résultant de la réduction de la taille du voxel. A l'instar des mesures effectuées dans le cortex, une série de spectres acquis en balayant différents offsets de saturation dans la gamme  $\pm 5$  ppm (par pas de 0.1 ppm) est observable en **Figure V-9.B** tandis que le z-spectrum correspondant (obtenu par intégration du pic de l'eau à chaque offset de saturation) est montré en **Figure V-9.C**. Un maximum de contraste gluCEST ( $\sim 12\%$ ) est observé à 3 ppm.

Les valeurs d'ADC sont à nouveau présentées sous la forme de boîtes à moustaches dans la **Figure V-10** pour chaque direction d'application des gradients de diffusion (X ou Y). De façon générale, les valeurs d'ADC obtenues pour la direction Y sont plus basses que celles obtenues pour la direction X, ce qui est cohérent avec le fait que la diffusion de l'eau est plus restreinte perpendiculairement aux fibres neuronales.

Les mesures effectuées dans la direction Y confirment les résultats précédemment obtenus dans la substance grise et donnent des valeurs d'ADC à  $f_{\text{sat}}=+3$  ppm significativement supérieures aux données obtenues pour  $f_{\text{sat}}=-3$  ppm et  $f_{\text{sat}}=-20$  ppm. Il est également intéressant de souligner ici que les valeurs d'ADC obtenues pour  $f_{\text{sat}}=-3$  ppm sont également significativement supérieures à celles obtenues pour  $f_{\text{sat}}=-20$  ppm, ce qui n'est pas le cas pour les acquisitions dans le cortex (tout du moins de manière significative). Cette tendance n'est en revanche pas observée dans le cas des mesures de diffusion réalisées dans la direction X, i.e. aucune différence significative n'est observée en fonction des différentes fréquences de saturation.

Les **Figures V-11** et **V-12** présentent les données acquises chez chaque individu pour les sept acquisitions effectuées dans les directions Y et X respectivement.

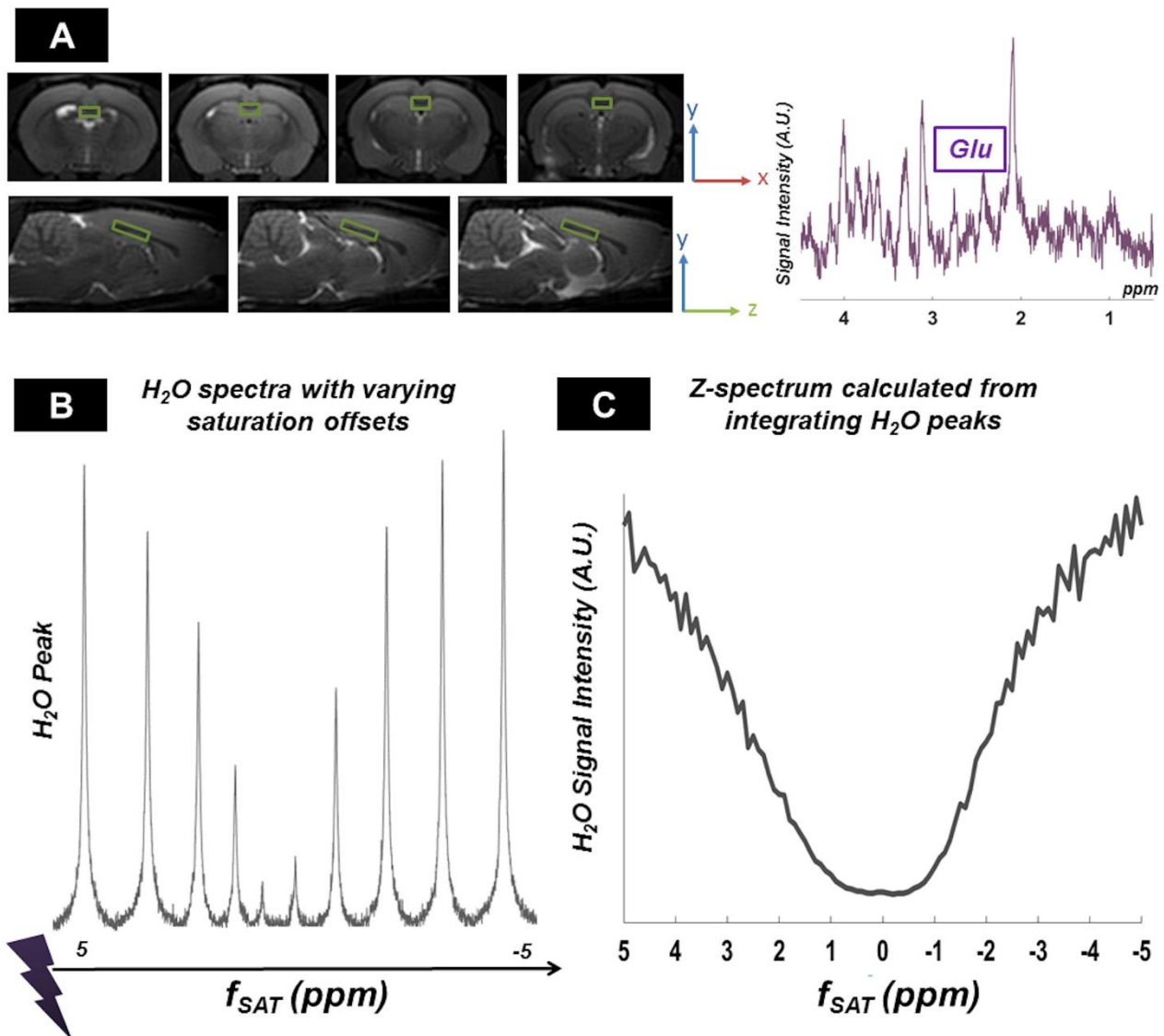


Figure V-9 : A) Série d'images anatomiques coronales (ligne du haut) et sagittales (ligne du bas) montrant le voxel de dimensions  $2 \times 1 \times 4 \text{ mm}^3$  positionné autour du corps calleux (rectangle vert). Le spectre RMN correspondant confirme la présence de glutamate dans le voxel. B) Spectres de l'eau acquis à différentes fréquences de saturations comprises en -5 et 5 ppm. Les spectres acquis pour un offset en fréquence positif (partie gauche sur l'axe des ppm) sont remarquablement moins intenses que leurs symétriques obtenus avec un offset négatif. C) Z-spectrum obtenu en intégrant la partie réelle de chaque pic de l'eau (101 points en tout).



## VOXEL IN CC

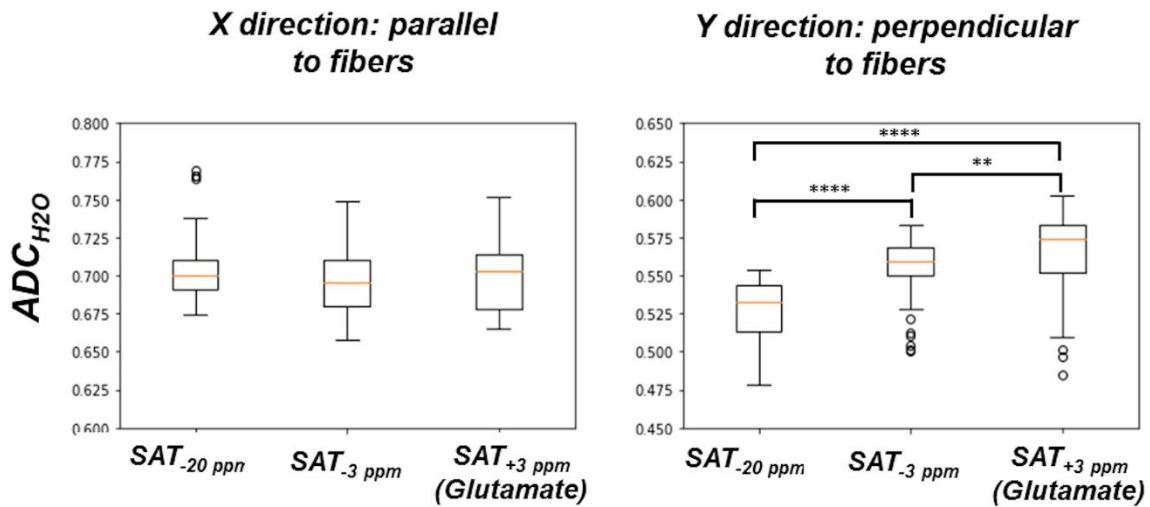


Figure V-10 : Boîtes à moustaches des valeurs d'ADC obtenues chez 5 animaux et pour chaque offset de saturation en fonction de la direction d'application des gradients de diffusion (X ou Y). La valeur médiane est représentée par une barre horizontale orange tandis que les premier (Q<sub>1</sub>) et troisième (Q<sub>3</sub>) quartiles sont en noir. Les moustaches englobent les valeurs comprises dans l'intervalle  $1.5 \times [Q_3 - Q_1]$ . Les cercles noirs représentent des valeurs non comprises dans cet intervalle et par conséquent considérées comme outliers. Ces derniers sont cependant présents en faible nombre par rapport au nombre total de points. Pour le cas perpendiculaire aux fibres (direction Y), les valeurs d'ADC pour  $f_{\text{sat}}=+3$  ppm et  $f_{\text{sat}}=-3$  ppm sont significativement supérieures à celles obtenues pour  $f_{\text{sat}}=-20$  ppm (\*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\*\* :  $p < 0.0001$  d'après le U-test de Mann-Whitney). Aucune différence significative n'est obtenue dans le cas des mesures effectuées dans la direction X. L'intensité du signal avec et sans diffusion a été obtenue en intégrant la partie réelle du pic de l'eau sur 100 points autour du maximum.

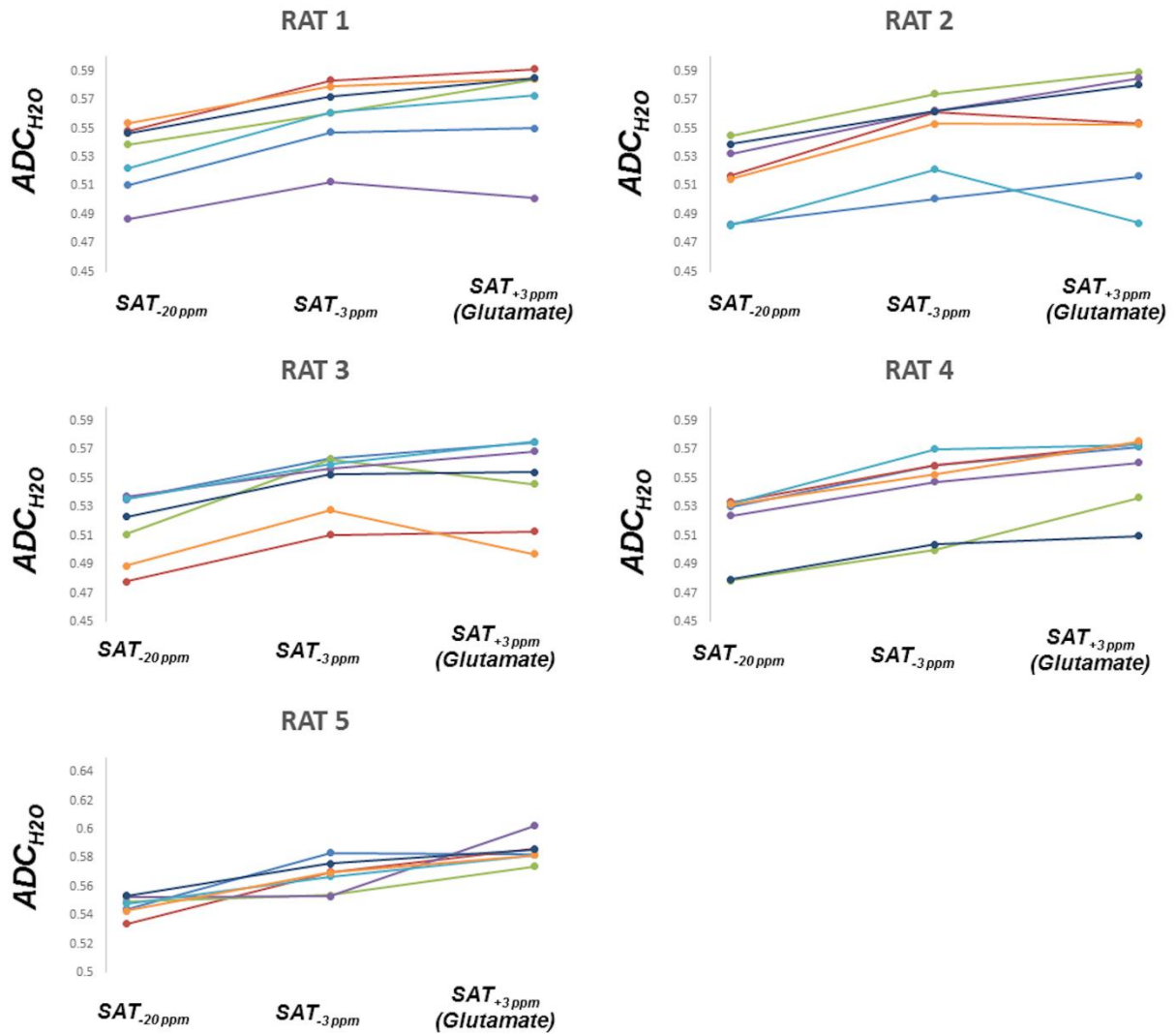


Figure V-11 : Valeurs d'ADC (7 répétitions) obtenues pour chaque rat en fonction des trois fréquences de saturation (-20, -3 et 3 ppm) en appliquant les gradients de diffusion dans la direction Y (perpendiculairement aux fibres). L'augmentation de l'ADC pour  $f_{\text{sat}}=-3$  ppm et  $f_{\text{sat}}=+3$  ppm par rapport à  $f_{\text{sat}}=-20$  ppm est observable chez chaque sujet. Cette tendance se retrouve sur la plupart des répétitions individuelles.

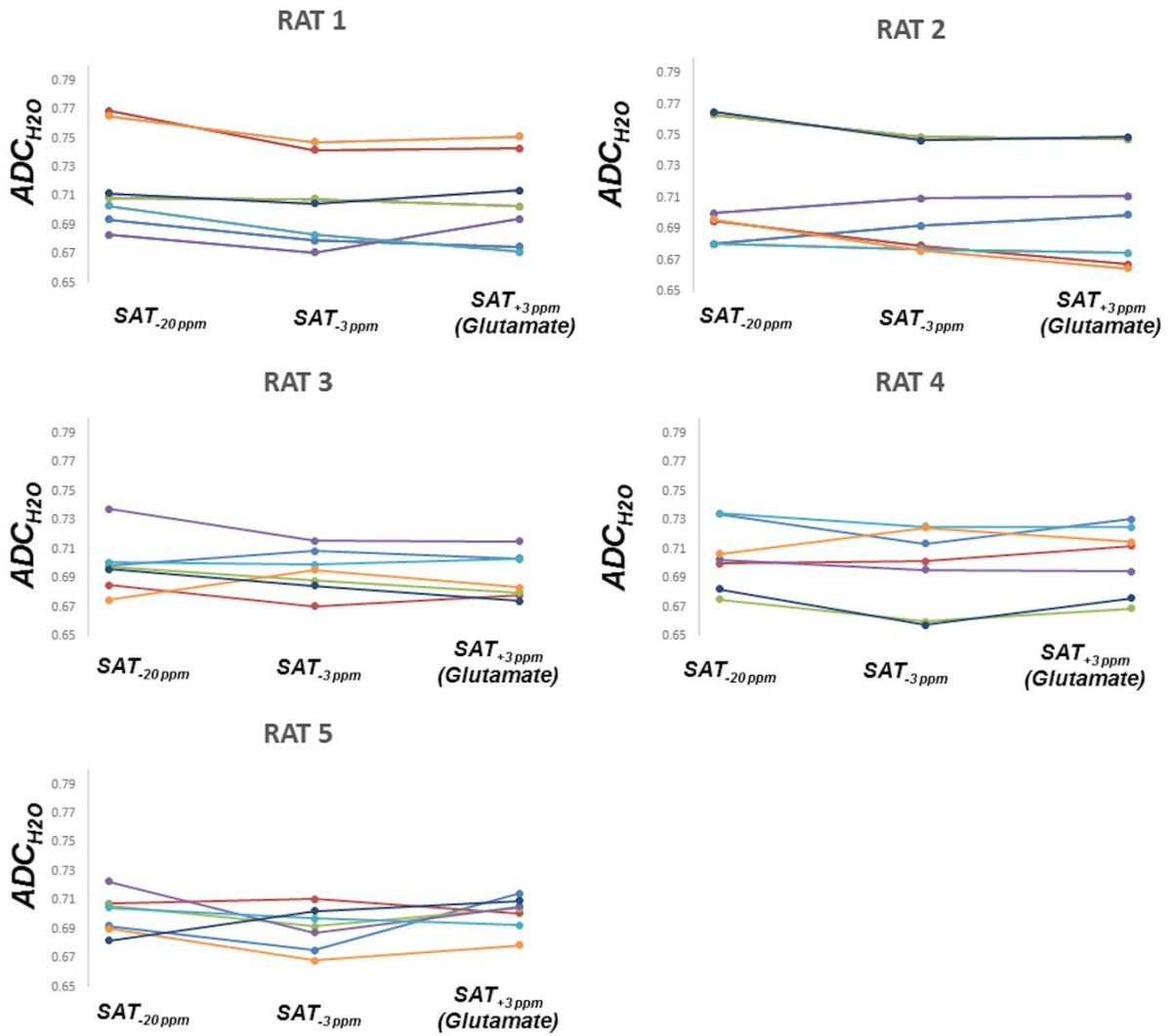


Figure V-12 : Valeurs d'ADC (7 répétitions) obtenues pour chaque rat en fonction des trois fréquences de saturation (-20, -3 et 3 ppm) en appliquant les gradients de diffusion dans la direction X (parallèlement aux fibres).

## V.4. DISCUSSION

### V.4.i. SPECIFICITE DE NOS PARAMETRES DE SATURATION CEST AU GLUTAMATE (ET DONC AU COMPARTIMENT NEURONAL)

Des mesures préliminaires réalisées avec un  $T_{\text{sat}}$  égal à 1 seconde (valeur plus communément utilisée en gluCEST) n'ont pas permis d'obtenir des résultats concluants (non montrés ici). Nous avons alors émis l'hypothèse que l'emploi d'un long  $T_{\text{sat}}$  favoriserait une redistribution de l'eau saturée au sein des différents compartiments tissulaires (ces derniers n'étant pas complètement hermétiques), ce qui aurait pour effet de diminuer inexorablement la sélectivité de la mesure au compartiment intra-neuronal. Nous avons par conséquent pris la décision de réduire ce paramètre à 300 ms. Cette valeur est en accord avec l'étude de Quirk et collègues qui ont estimé un temps de résidence intracellulaire d'environ 550 ms pour l'eau dans le cerveau de mammifère (239). Il faut cependant noter ici que le concept de résidence intracellulaire est sujet à débat au sein de la communauté scientifique et nous ne pouvons pas totalement exclure la possibilité d'échanges transmembranaires bien plus rapides pour l'eau dans la substance grise (242). Des différences d'ADC en fonction de  $f_{\text{sat}}$  sont néanmoins déjà visibles pour  $T_{\text{sat}} = 300$  ms et nous avons par conséquent décidé de garder ce paramètre inchangé dans le cadre de ce travail préliminaire.

Afin de compenser cette valeur de  $T_{\text{sat}}$  plus faible, il a été nécessaire d'augmenter la valeur du  $B_1$ , conduisant inévitablement à l'élargissement du z-spectrum. Dans ces conditions, il n'est pas possible d'exclure totalement la possibilité de saturer d'autres pools de protons dont la fréquence de résonance est proche de celle des protons amines du glutamate. Plus précisément, nous pourrions être sensibles aux effets APT se produisant à 3.5 ppm, induits par les protons amides de protéines mobiles telles que des polypeptides ou des lipides (243). Bien que la spécificité de la saturation gluCEST au compartiment neuronal ait pu par conséquent être légèrement compromise, les effets APTs sont le fruit de protéines intracellulaires et notre approche reste donc plutôt spécifique au milieu intracellulaire (244).

### V.4.ii. UNE DIFFUSION MOINS RAPIDE DANS LES NEURONES DE LA SUBSTANCE GRISE ?

L'augmentation des valeurs d'ADC observée lorsque le pool d'eau neuronal est indirectement saturé par l'effet gluCEST suggère une diffusion plus lente dans les neurones que dans les autres compartiments (i.e. le milieu extracellulaire et dans une moindre mesure, les cellules gliales),

tout du moins dans la substance grise. La différence entre les valeurs d'ADC avec et sans saturation, bien que significative, reste néanmoins ténue, surtout si l'on considère que le milieu extracellulaire occupe 20% du volume cérébral total. Les résultats du **Chapitre IV** suggèrent par ailleurs que l'ADC dans l'ECS pourrait être jusqu'à deux fois élevé que dans l'ICS, un constat également partagé par Goodman et collègues (212). Cependant, il est clair que nous n'observons pas ici de variations aussi importantes. Deux hypothèses pourraient expliquer ce phénomène : 1) seulement une fraction du pool d'eau neuronal est saturée par l'effet gluCEST et 2) le  $T_{\text{sat}}$ , bien que réduit au maximum, ne permet pas d'éviter des échanges entre compartiments durant la mesure. L'approche proposée ici reste donc majoritairement qualitative et il serait judicieux d'approfondir notre analyse grâce à un modèle prenant en compte la diffusion, les échanges entre compartiments ainsi que l'effet gluCEST afin d'estimer les variations d'ADC attendues.

#### V.4.iii. VERS UNE POTENTIELLE SENSIBILITE DIRECTIONNELLE DANS LA SUBSTANCE BLANCHE ?

Le corps calleux est une structure fortement ordonnée principalement composée d'axones densément regroupés en faisceaux orientés parallèlement à la direction X. En outre, la gaine de myéline entourant ces axones ralentit les échanges d'eau entre les compartiments, et ces derniers sont ainsi moins susceptibles d'affecter la mesure durant le  $T_{\text{sat}}$ . Le corps calleux nous apparaît par conséquent comme une structure propice à l'approche directionnelle que nous souhaitons développer ici.

Les mesures de diffusion perpendiculairement aux fibres dans le corps calleux suggèrent que la diffusion radiale est plus lente dans les neurones que dans l'espace extra-axonal. Les fibres axonales exhibant des diamètres de l'ordre de quelques  $\mu\text{m}$ , si ce n'est en-deçà, les molécules sont plus à même de subir une forte restriction transverse à l'intérieur des fibres qu'à l'extérieur.

Ces mesures révèlent également une augmentation notable de l'ADC lorsque l'on sature la résonance symétrique au glutamate à -3 ppm. Ce phénomène pourrait être attribué aux effets Overhauser nucléaires (NOE) qui se manifestent principalement à -1.75 et -3.75 ppm (245). Il a par ailleurs été montré que ces effets NOE étaient plus prépondérants dans la substance blanche que dans la substance grise (246,247), notamment en raison des protons aliphatiques présents en grand nombre dans la gaine de myéline (247,248). Ces résultats doivent cependant être prudemment interprétés car les paramètres expérimentaux utilisés dans la présente étude, i.e. un  $T_{\text{sat}}$  très court couplé à une valeur élevée de  $B_1$  de 9  $\mu\text{T}$ , diffèrent grandement des valeurs

de saturation communément utilisées pour ce type d'expérience ( $B_1$  compris entre  $\sim 0.3-1.4 \mu T$  et  $T_{sat}$  supérieur à 1 s). Malgré tout, les données laissent à penser que l'utilisation de la saturation à -3 ppm en tant que contrôle symétrique pourrait être biaisée par la saturation partielle du pool d'eau de la myéline.

Contrairement aux mesures perpendiculaires aux fibres, les mesures effectuées parallèlement à ces dernières n'ont pas montré de différence significative entre les valeurs d'ADC en fonction des différentes fréquences de saturation. Cette absence de variation semble indiquer que l'eau possède des diffusivités axiales intra-axonale et extra-axonale similaires.

La question de la diffusivité axiale intra- vs extra-axonale est scrutée avec attention par la communauté scientifique, car il s'agit d'un paramètre crucial dans la plupart des modèles d'analyse des données obtenues en DTI ou DKI. Kunz *et al* (136) se sont expérimentalement penchés sur la question en réalisant des infusions de gadolinium ayant pour but de moduler la contribution du pool d'eau extracellulaire au signal total de diffusion (signal extracellulaire diminué en présence du gadolinium). Ils ont ainsi pu suivre l'évolution du kurtosis ainsi que des diffusivités axiales intra- et extra-axonales (respectivement  $D_{a, \parallel}$  and  $D_{e, \parallel}$ ) dans le genu du corps calleux, avant et après infusion de gadolinium. Ils ont ensuite comparé leurs données à un modèle bi-compartimental afin d'explorer deux scénarios biologiquement plausibles dans la substance blanche: 1)  $D_{a, \parallel} > D_{e, \parallel}$  avec une dispersion axonale plus prononcée (branche 1) et 2)  $D_{a, \parallel} < D_{e, \parallel}$  avec une dispersion axonale beaucoup plus limitée (branche 2). Une augmentation du kurtosis radial est observée post-infusion, démontrant ainsi l'efficacité de la modulation du signal par le gadolinium. Quelle que soit la branche de départ utilisée, la modélisation des données révèle par ailleurs des valeurs plus importantes pour la fraction d'eau intra-axonale post-injection de gadolinium, ce qui est conforme aux résultats attendus. Finalement, la comparaison des deux scénarios penchent en faveur de la branche 1, c'est-à-dire  $D_{a, \parallel} > D_{e, \parallel}$ . Les estimations obtenues à partir de ce scénario semblent en effet mieux refléter la dispersion des fibres *in vivo*, tandis que les valeurs obtenues pour la branche 2 aboutissent systématiquement à une absence totale de dispersion, i.e. des fibres parfaitement alignées, ce qui paraît peu plausible sur le plan biologique. Contrairement à ce qui est attendu, les auteurs n'ont toutefois pas directement observé une augmentation significative de la diffusivité axiale suivant l'injection de gadolinium. Les auteurs expliquent ce résultat contre-intuitif par la présence de gradients « parasites » (background gradients) induits par des artefacts de susceptibilité survenant lors de l'infusion de gadolinium. Finalement, les auteurs n'excluent pas

la possibilité que  $D_{a,1}$  et  $D_{e,1}$  soient similaires, ce qui serait en meilleur accord avec nos propres résultats.

## V.5. POUR ALLER PLUS LOIN (1/2) : ÉTAPES DE VALIDATION SUPPLEMENTAIRES

Les résultats préliminaires présentés dans cette étude sont encourageants mais doivent cependant être confortés par des étapes de validation supplémentaires. Quelques pistes exploratoires permettant de compléter cette étude sont brièvement présentées dans cette partie. Ces pistes ont fait l'objet de quelques tentatives au cours de ce travail de thèse mais n'ont malheureusement pu aboutir par manque de temps.

### V.5.i. MESURES SUR UN BROyat DE CERVEAU

L'idée de cette expérience est de répéter les mesures réalisées dans un échantillon présentant un contenu métabolique similaire aux conditions *in vivo* mais dénué de toute microstructure. Dans ce cas, aucune variation de l'ADC en fonction de la fréquence de saturation n'est *a priori* attendue du fait de l'absence de différents compartiments tissulaires.

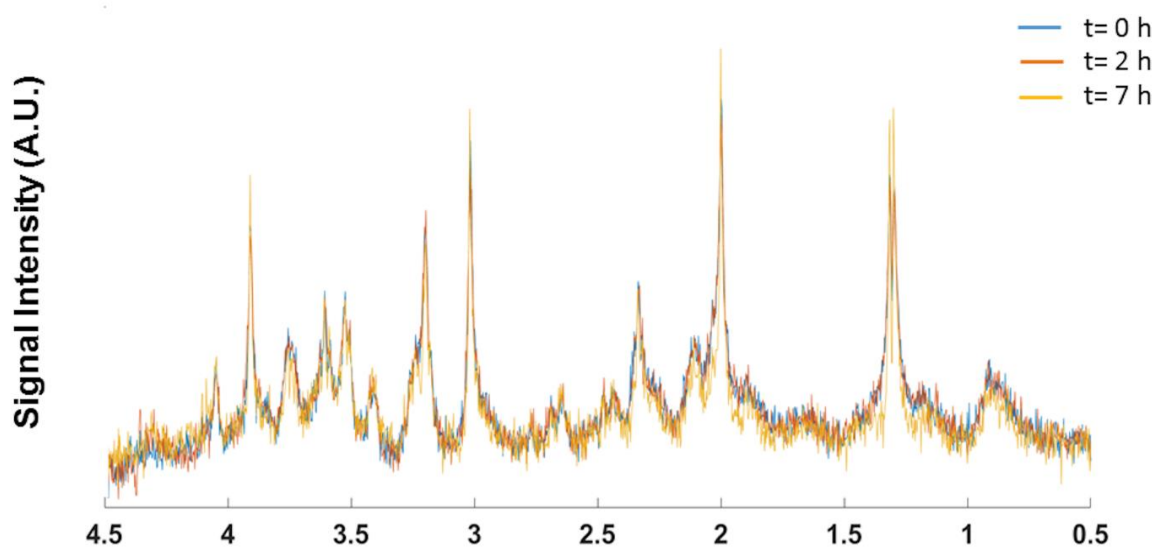
Un broyat est préparé à partir d'un cerveau prélevé et immédiatement congelé dans de l'isopentane. L'échantillon est mécaniquement broyé dans un mortier -dans lequel est régulièrement versé de l'azote liquide- jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Le broyat est par la suite conservé à -80°C avant d'être solubilisé dans une solution de sérum physiologique le jour de l'expérience. Le volume de liquide utilisé pour solubiliser l'échantillon doit être minimal, afin de diluer au minimum la concentration des métabolites cérébraux. L'échantillon est également chauffé à 98°C dans un bain-marie sec pendant 5 minutes afin de dénaturer des enzymes pouvant possiblement altérer le contenu métabolique. Enfin, une sonde de sonication est utilisée afin d'homogénéiser l'échantillon et de rompre d'éventuels débris ( $d_{\text{sonde}} = 0.5 \text{ mm}$ , 35% d'amplitude, 30 impulsions carrées, 1 s à l'état haut, 1 s à l'état bas).

La **Figure V-13** montre trois spectres RMN  $^1\text{H}$  acquis à plusieurs heures d'intervalle. On peut constater que le profil métabolique est très similaire à celui observé *in vivo* : l'intensité relative entre les différents pics reste comparable, hormis pour le lactate dont la concentration est bien plus importante par rapport aux conditions *in vivo*. Ce phénomène est cependant attendu en raison du stress métabolique induit par le sacrifice de l'animal. On peut également noter que le glutamate est clairement identifiable sur le spectre, suggérant la possibilité d'observer un effet gluCEST significatif. Enfin la concentration des métabolites, et notamment du glutamate, reste



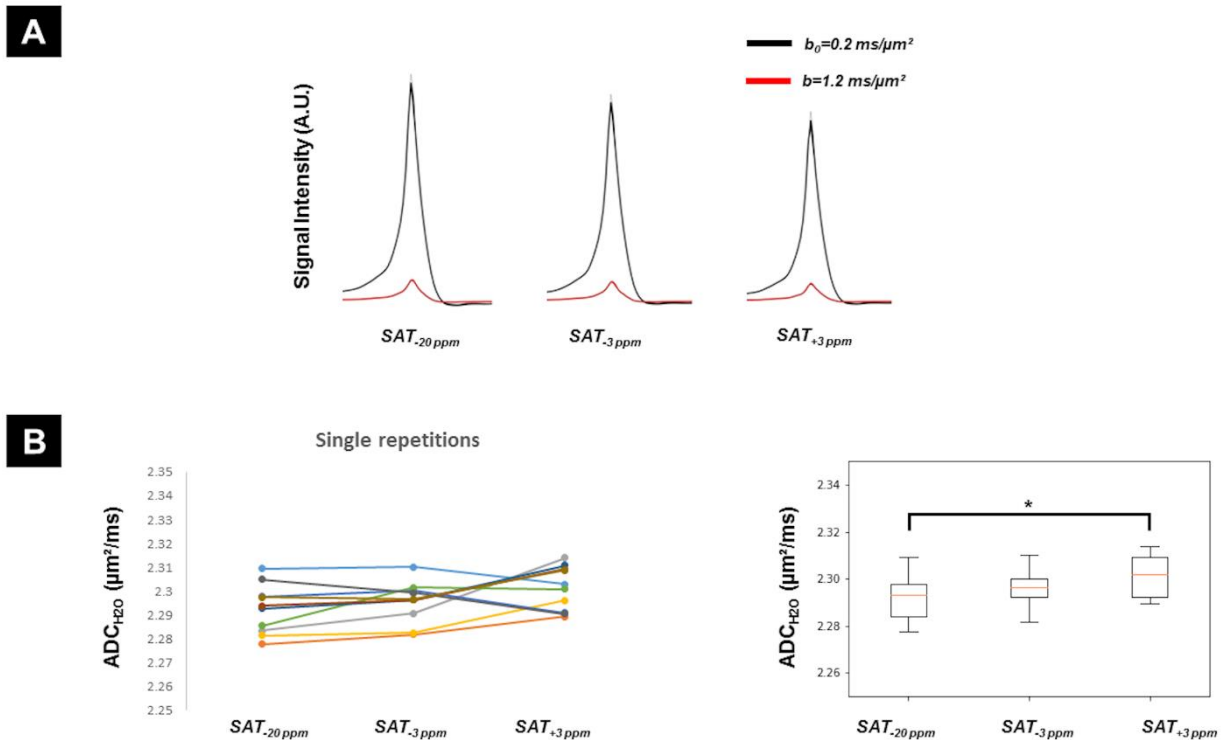
stable sur plusieurs heures ce qui suppose que l'intensité de effet gluCEST est relativement stable au cours de l'expérience.

La **Figure V-14** représente les spectres de l'eau acquis avec et sans pondération en diffusion (**Figure V-14.A**) ainsi que les valeurs d'ADC correspondantes obtenues pour les trois fréquences de saturation (**Figure V-14.B**). De façon surprenante, l'écart d'intensité entre les spectres mesurés pour  $f_{\text{sat}} = -3$  ppm et  $f_{\text{sat}} = 3$  ppm est relativement faible, reflétant un effet gluCEST peu intense ne correspondant pas aux mesures *in vivo*.



**Figure V-13 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  acquis sur un broyat de cerveau pour  $t = 0, 2$  et  $7$  h.**

Les mesures d'ADC en fonction des différentes fréquences de saturation sont relativement stables et se situent autour d'une valeur de  $2.30 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ , ce qui est similaire aux valeurs d'ADC obtenues dans la solution de glutamate à 50 mM. Ces valeurs confirment l'obtention d'un échantillon homogène et relativement peu visqueux après les étapes de broyage mécanique et de sonication. Contrairement aux mesures *in vivo*, aucune tendance franche n'est observée sur l'ensemble des répétitions, bien qu'un test de Mann-Whitney reflète une augmentation de l'ADC légèrement significative pour  $f_{\text{sat}} = 3$  ppm. Ces résultats restent cependant à confirmer sur d'autres échantillons. En outre, le très faible effet gluCEST observé ici ne permet pas de conclure définitivement en faveur d'une augmentation significative de l'ADC pour  $f_{\text{sat}} = 3$  ppm.



**Figure V-14 : Mesures d'ADC effectuées dans un broyat de cerveau. A) Pics de l'eau mesurés avec (en rouge) et sans (en noir) pondération en diffusion pour les trois fréquences de saturation. Les spectres sont moyennés sur dix mesures. B) *Partie gauche* : Valeurs d'ADC obtenues pour les dix mesures aux trois fréquences de saturation. *Partie droite* : Boîtes à moustaches obtenues à partir des valeurs d'ADC montrées en B. Les valeurs d'ADC sont significativement plus élevées pour  $f_{\text{sat}} = 3 \text{ ppm}$  d'après un test de Mann-Whitney apparié. Cette tendance pourrait cependant être dominée par quelques mesures seulement sans refléter pour autant un comportement systématique pour chaque répétition, contrairement à ce qui est observé *in vivo*.**

Le positionnement du fantôme dans l'aimant reste également à être optimisé : idéalement, ce dernier doit être chauffé à 37°C afin de reproduire les conditions de diffusion *in vivo*. Pour ce faire, nous avons initialement enroulé le fantôme dans les tuyaux du système de chauffage. Nous nous sommes cependant aperçus que la circulation d'eau au sein des tuyaux, et plus précisément la présence de bulles d'air piégées dans le système, engendrait un biais conséquent sur l'effet gluCEST mesuré, invalidant par conséquent nos mesures. Les résultats présentés ici ont donc été obtenus sur un échantillon non chauffé.

Enfin, malgré les efforts effectués afin d'obtenir l'échantillon le plus homogène possible, certains agrégats –des débris de membranes cellulaires agglomérés ?- sont toujours présents. Il n'est pas impossible que ces derniers interfèrent également avec l'effet gluCEST et une étape

de centrifugation supplémentaire pourrait permettre de séparer ces débris membranaires du reste de l'échantillon.

En conclusion, ces mesures préliminaires effectuées sur un broyat de cerveau confirment la faisabilité de notre protocole expérimental mais des mesures supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer ou infirmer de possibles variations de l'ADC en fonction de la fréquence de saturation, ce qui, pour rappel, n'est pas attendu ici en raison de l'absence de compartiments tissulaires.

#### V.5.ii. MODELE SYNTHETIQUE DE FIBRES PARALLELES

Pour cette seconde expérience contrôle, nous avons imaginé un système reproduisant un faisceau de matière blanche telle que présent dans le corps calleux. L'idée est donc ici de reproduire *in vitro* l'augmentation de l'ADC en présence de l'effet gluCEST.

Pour ce faire, nous avons utilisé un capillaire de 10 m de longueur ( $d_{interne}/d_{externe} = 20 / 90 \mu\text{m}$ ) constitué de silice synthétique recouvert d'une couche de polyamide de 12  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Le capillaire est divisé en sections de longueurs égales d'une quarantaine de cm avant d'être manuellement rempli avec une solution de glutamate à 50 mM à l'aide d'une seringue. Plus précisément, les capillaires sont insérés dans une aiguille ( $d_{interne} = 0.405 \text{ mm}$ ) qui est par la suite scellée avec une colle imperméable afin de contraindre le passage du liquide au sein du capillaire. Le remplissage des capillaires est ensuite visuellement confirmé par l'apparition d'une goutte de solution à l'extrémité de ceux-ci. Les capillaires sont découpés en portion de 1-2 cm dans le but de former un « faisceau » le plus épais possible. L'échantillon est inséré dans une seringue de 1 mL dont les extrémités sont préalablement sectionnées. Afin d'éviter tout transfert du contenu des capillaires vers l'« ECS », une des extrémités des capillaires est tout d'abord scellée avec du mastic imperméable. La seringue est ensuite remplie avec une solution de sérum physiologique de façon à presque entièrement submerger le faisceau synthétique. Le

tout est ensuite à nouveau scellé avec du mastic. Une photo du fantôme est disponible en **Figure V-15**.



**Figure V-15** : Fantôme modélisant un faisceau de fibres synthétiques. Dans ce fantôme, l' "ICS" est modélisé par l'intérieur des microcapillaires remplis d'une solution de glutamate très concentrée tandis que l' "ECS" est rempli d'une solution saline. Les capillaires sont regroupés de façon à obtenir l'organisation la plus compacte possible tout en maintenant au mieux le parallélisme entre les "fibres". Une solution de glutamate cinq fois plus concentrée que dans les conditions *in vivo* est ici utilisée afin de compenser le faible volume de solution contenu dans l'ensemble des capillaires.

La **Figure V-16** montre une série de spectres avec et sans pondération en diffusion obtenus dans notre modèle synthétique de fibres parallèles (voxel de dimensions  $1 \times 8 \times 8 \text{ mm}^3$  positionné au milieu du faisceau de fibres). Malheureusement, la composition hétérogène du fantôme complique fortement l'homogénéisation du champ magnétique dans un tel échantillon. La largeur de raie à mi-hauteur mesurée sur le pic de l'eau est de 70 Hz, contrairement aux valeurs de 20 Hz et de 1-2 Hz couramment obtenues *in vivo* et dans des solutions fantômes respectivement. Dans ce contexte, nous n'avons pas été en mesure de confirmer la présence de glutamate par spectroscopie RMN. On peut noter en outre que la différence d'intensité entre les deux pics de l'eau mesurés à -3 et +3 ppm s'avère très ténue, remettant fortement en cause l'occurrence d'un effet gluCEST suffisamment important pour être mesuré ici. Le faible volume interne des capillaires laisse également à penser que le glutamate est présent en très faible quantité en dépit d'une concentration élevée de 50 mM. Tous ces éléments rendent par conséquent cette expérience peu concluante et il semble nécessaire de repenser la fabrication de ce fantôme, tant du point de vue des matériaux utilisés que de l'organisation, de la structure et du nombre de capillaires.

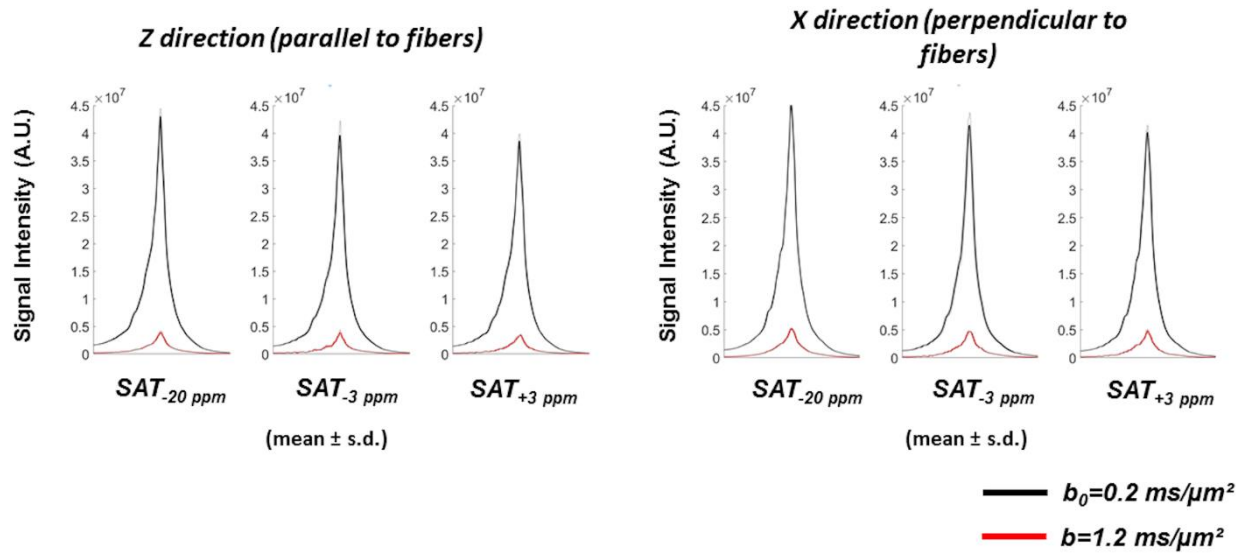


Figure V-16 : Série de spectres de l'eau mesurés sur un modèle synthétique de fibres parallèles, avec (rouge) et sans (noir) diffusion, aux trois fréquences de saturation d'intérêt. Les gradients de diffusion sont appliqués à la fois parallèlement (direction Z) et perpendiculairement (direction X) aux fibres.

## V.6. POUR ALLER PLUS LOIN (2/2) : DEVELOPPEMENT D'UNE SEQUENCE D'IMAGERIE

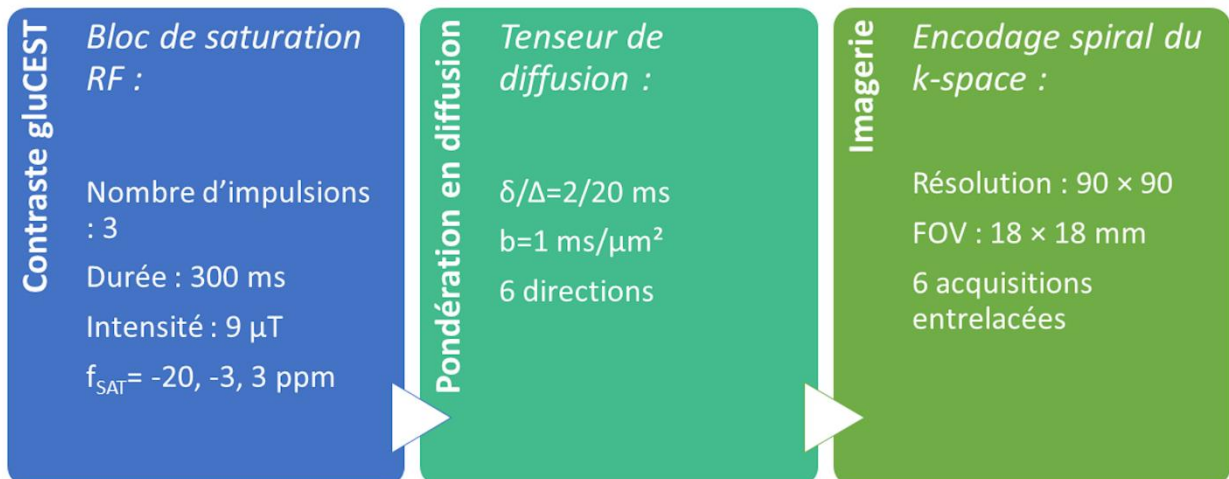
### V.6.i. DESIGN DE LA SEQUENCE

Afin de bénéficier d'une meilleure résolution spatiale, nous avons voulu explorer la possibilité d'étendre l'approche gluCEST pondérée en diffusion à une séquence d'imagerie. Cette démarche est cependant périlleuse en termes de SNR, la diffusion et le gluCEST étant deux mesures reposant sur une diminution relative de l'intensité du signal. Afin de maximiser le signal tout en gardant un temps d'acquisition raisonnable, nous avons opté pour un module d'imagerie spiral car cette approche permet de parcourir rapidement le k-space de manière optimale tout en offrant la possibilité de sur-échantillonner le centre du k-space, ce qui est avantageux en termes de SNR (249,250). De plus, l'encodage spiral est plutôt robuste face aux artefacts de mouvement car la forme périodique des gradients permet de compenser l'accumulation progressive de phase (250). Particulièrement attractif pour des applications d'imagerie dynamique telles que l'imagerie cardiaque, les avantages de l'encodage spiral ont également encouragé son utilisation en DTI. Lee et collègues ont en effet montré un bénéfice de 40 à 80 % pour le SNR lors de l'utilisation de l'encodage spiral par rapport à une approche EPI à 3 T (251).

Malgré tous ces avantages, l'utilisation d'une séquence spirale reste en pratique difficile à cause d'une forte sensibilité aux inhomogénéités du champ  $B_0$ . Un soin particulier doit donc être porté au réglage des gradients de shim. Nous ne rentrerons pas ici dans les détails de l'optimisation de trajectoire ainsi que la reconstruction du signal car nous avons utilisé l'implémentation par défaut disponible sous Paravision 6. Pour plus d'information, le lecteur est invité à se tourner vers des revues telles que (250).

Afin de maximiser le signal, nous avons décidé d'utiliser notre antenne cryogénique dont la sensibilité est bien supérieure à l'antenne volumique précédemment utilisée en spectroscopie.

Pour résumer, les différents aspects de la séquence sont représentés dans la **Figure V-17**.



**Figure V-17 : Résumé de notre séquence d'imagerie gluCEST pondérée en diffusion. De façon similaire à notre séquence de spectroscopie, un bloc de saturation gluCEST de trois impulsions RF est joué avant d'appliquer les gradients de diffusion (ici de polarité inverse). Un module d'encodage spiral du k-space est utilisé pour la partie imagerie.**

#### V.6.ii. PARAMETRES D'ACQUISITION ET ETAPES DE TRAITEMENT DU SIGNAL

Les mesures sont effectuées chez trois souris sauvages. Douze jeux de données sont acquis par animal, chaque jeu correspondant à une acquisition DTI sur six directions ( $b=1$  ms/ $\mu$ m<sup>2</sup>) associée à deux images très faiblement pondérées en diffusion ( $b_0=0.06$  ms/ $\mu$ m<sup>2</sup>). Chaque acquisition DTI est répétée pour nos trois fréquences de saturation (pour un temps d'acquisition total de 7 min 34 s par scan). Nous avons ici pris le parti d'effectuer des mesures DTI plus courtes sur six directions seulement plutôt que des acquisitions plus longues (mais moins bruitées) sur 30 directions afin de maximiser la résolution temporelle entre nos trois fréquences de saturation. Les images DTI brutes sont ensuite sommées sur six scans, aboutissant finalement à deux jeux de données par animal.

Les images sont débruitées grâce à une analyse en composantes principales (252). Cette étape a été gracieusement effectuée par le Dr. Ileana Jelescu (Center for biomedical imaging, EPFL). Le tenseur de diffusion est calculé pour chaque pixel à l'aide de la matrice des valeurs de  $b$  (253). Enfin, les valeurs propres du tenseur de diffusion permettent d'obtenir des cartographies des métriques couramment utilisées pour l'analyse des données DTI :

- l'anisotropie fractionnelle (FA) telle que définie par l'**Equation I.5.6** ;

- la diffusivité moyenne (MD) correspondant à la moyenne des trois valeurs propres du tenseur ;
- la diffusivité axiale (AD) correspondant à la première valeur propre ;
- la diffusivité radiale (RD) correspondant à la moyenne des deuxième et troisième valeurs propres.

Des régions d'intérêts sont ensuite manuellement tracées dans le cortex et autour du corps calleux. Le corps calleux étant une région très fine, par conséquent difficile à sélectionner manuellement, tout pixel ayant une FA inférieure à 0.45 (valeur seuil arbitraire) est automatiquement retiré de l'analyse.

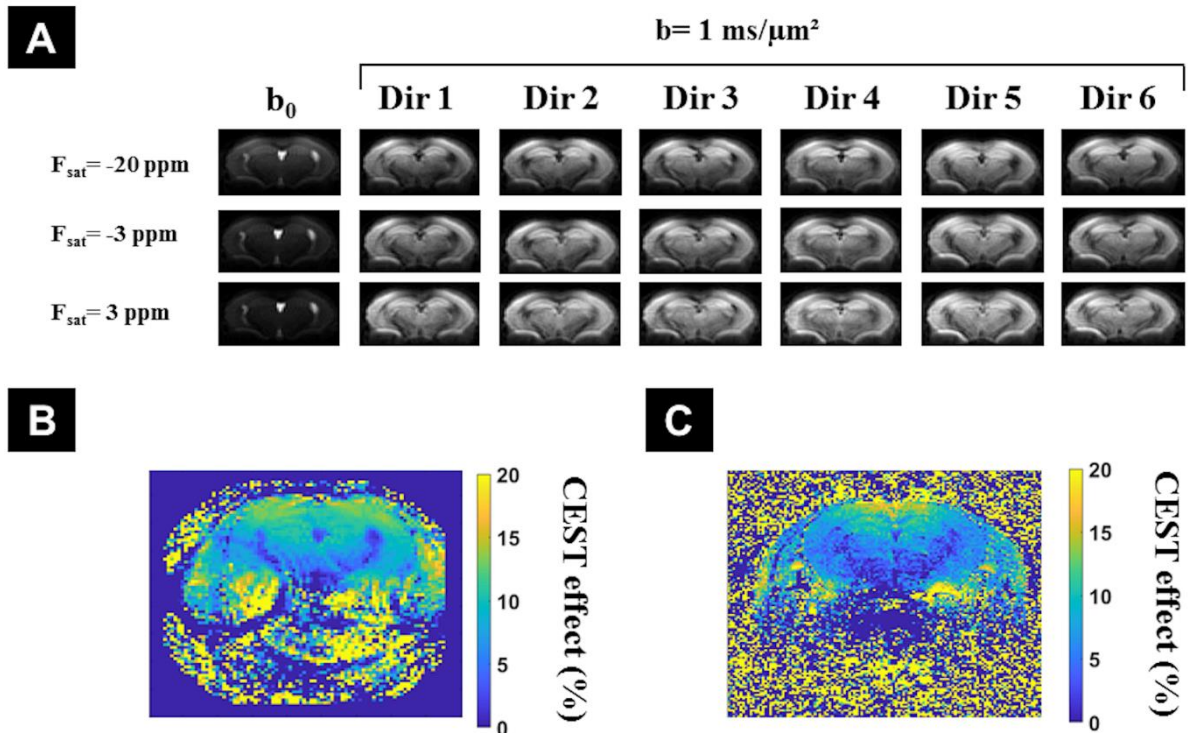
### V.6.iii. RESULTATS PRELIMINAIRES

La **Figure V-18.A** présente un jeu de données DTI sur six directions pour les trois fréquences de saturation -20, -3 et 3 ppm (somme sur six acquisitions). Les images présentent un contraste satisfaisant au niveau du corps calleux. Des distorsions circulaires sont visibles au niveau du bas du cerveau, ce qui s'explique probablement par la forte sensibilité aux inhomogénéités de  $B_0$  de la séquence spirale couplée à des erreurs de trajectoire. Ces artefacts ne sont cependant pas visibles dans la moitié supérieure du cerveau contenant les structures d'intérêts. Bien que des étapes supplémentaires d'optimisation du module spiral puissent être effectuées, nous avons jugé la qualité des images comme étant suffisamment satisfaisante dans le cadre de cette étude préliminaire.

Une cartographie de l'effet gluCEST obtenue en analysant les images acquises à  $b_0$  est consultable en **Figure V-18.B**, révélant un effet gluCEST grossièrement compris entre 10 et 20 %. A titre de comparaison, une cartographie de l'effet gluCEST obtenu avec notre séquence de référence (séquence RARE sans pondération en diffusion) est également présentée en **Figure V-18.C**. On remarque que la séquence RARE permet une meilleure discrimination des structures, l'hippocampe et le corps calleux étant nettement discernables sur la cartographie gluCEST. Cette image est cependant obtenue avec un temps d'acquisition plus long combiné à l'absence totale de pondération en diffusion, autant de facteurs qui ne jouent pas en faveur de notre propre séquence. On peut constater dans les deux cas une forte sensibilité aux inhomogénéités de  $B_1$  en fonction de la profondeur au sein des tissus, l'effet gluCEST diminuant fortement dans les aires cérébrales les plus éloignées de l'antenne. Ce phénomène s'explique ici par l'utilisation d'une antenne de surface. Pour cette raison, nous avons veillé à

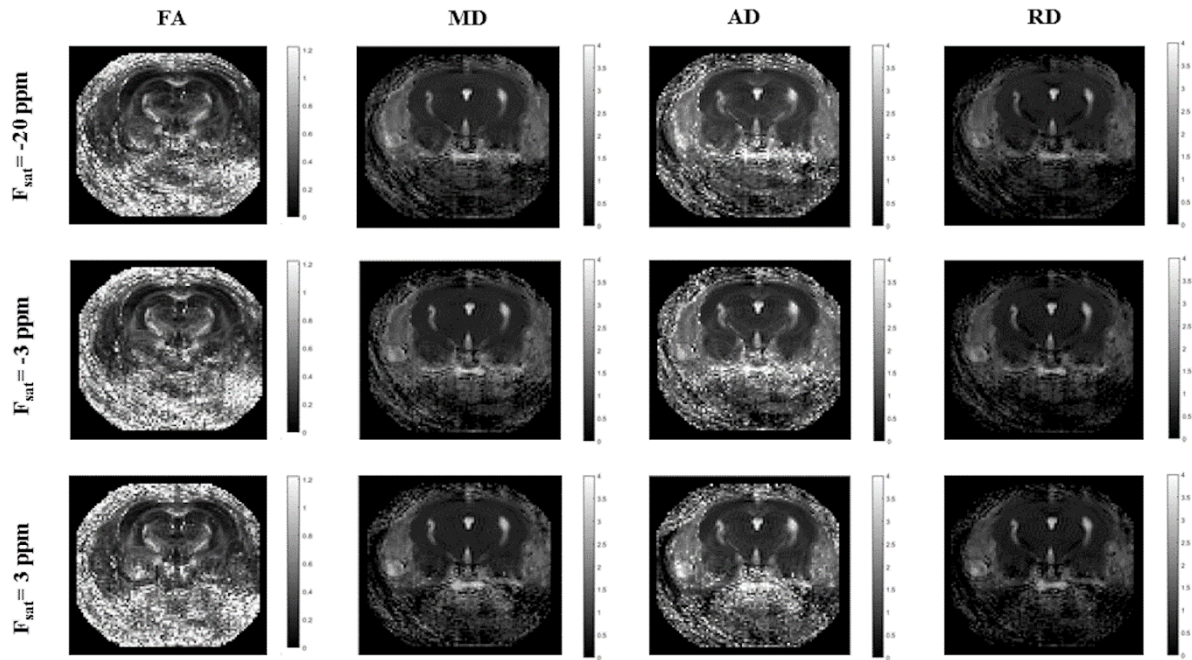


ce que les structures analysées soient situées à une distance comparable de l'antenne cryogénique.



**Figure V-18 :** A) Jeu de données DTI (sommé sur six acquisitions successives) acquis chez la souris aux trois fréquences de saturation (-20, -3 et 3 ppm). B) Cartographie gluCEST obtenue à partir des images à  $b_0$  (pour rappel,  $b_0=0.06 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ). C) Cartographie gluCEST obtenue avec une séquence RARE.

La **Figure V-19** montre une série de cartographies de FA, MD, AD et RD obtenues chez un animal pour les trois fréquences de saturation. Bien que ces cartographies soient plus bruitées pour  $f_{\text{sat}} = 3 \text{ ppm}$ , les images offrent un contraste suffisant, notamment au niveau du corps calleux. Conformément à ce qui est attendu dans le cas d'une structure fortement anisotrope telle que le corps calleux, la FA et l'AD sont nettement plus élevées par rapport au cortex ou à l'hippocampe tandis que la RD est à l'inverse beaucoup plus faible.



**Figure V-19 : Cartographies de FA, MD, AD et RD obtenues chez un animal pour  $f_{\text{sat}} = -20, -3$  et  $3$  ppm.**

Enfin, les régions d'intérêt définies dans le cortex et le corps calleux sont désignées par des pixels colorés en rouge sur une image à  $b_0$  dans la **Figure V-20.A**. L'évolution des valeurs de FA, MD, AD et RD -moyennées sur les pixels inclus dans chaque région d'intérêt- en fonction des fréquences de saturation sont disponibles dans la **Figure V-20.B**. Conformément à ce qui est attendu, les valeurs d'AD sont nettement supérieures à celles de RD dans le cas du corps calleux alors qu'elles sont similaires dans le cortex. De façon surprenante, les valeurs de diffusivité en fonction de la fréquence de saturation sont systématiquement plus faibles pour  $f_{\text{sat}} = 3$  ppm, suggérant par conséquent une diffusion plus rapide dans le compartiment intracellulaire.

La tendance observée ici vient complètement contredire les résultats obtenus en spectroscopie chez le rat. Même s'il est difficile d'expliquer à ce stade une telle différence entre les données, plusieurs facteurs de différentes natures pourraient être explorés :

- Différence inter-espèce, bien qu'il soit très peu probable qu'une différence marquée au niveau de la microstructure soit à l'origine des différences observées ;
- Différence de taille entre les voxels d'intérêt, notamment au niveau du corps calleux pour lequel le voxel englobe grossièrement la structure dans le cas des expériences de spectroscopie;

- Différence au niveau des antennes utilisées (antenne volumique versus antenne surfacique) induisant des différences du point de vue l'homogénéité de l'effet gluCEST obtenu ;
- Précision des directions de diffusion employées : alors que la mesure DTI échantillonne l'espace sur six directions, les gradients sont appliqués de manière approximative parallèlement et perpendiculairement aux fibres dans les cas des expériences de spectroscopie;
- Différence au niveau de la valeur de  $b_0$  ( $0.1 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  en spectroscopie vs  $0.06 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  en imagerie), induisant une suppression différente de la contribution des pools d'eau rapide (CSF, effet IVIM) ;
- Différence au niveau de la valeur de  $b$  ( $1.2 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  en spectroscopie et  $1 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  en imagerie), provoquant possiblement une sensibilité différente au kurtosis, c'est-à-dire aux phénomènes de diffusion non-gaussiens (restriction) ;
- Une possible contamination des images DTI par du signal en provenance des lipides ou d'autres régions de l'espace (ghosting) venant perturber le contraste gluCEST.

Au vue de la diversité des paramètres à explorer, une première étape pourrait consister à reproduire les expériences de spectroscopie chez la souris en utilisant l'antenne cryogénique. On pourrait également envisager de répéter dans un second temps l'expérience en utilisant exactement les mêmes valeurs de  $b$  que celles utilisées en imagerie afin de déterminer si celles-ci changent dramatiquement les résultats observés.

Enfin, le module d'encodage peut encore être amélioré en utilisant par exemple des trajectoires optimisées à densité variable dans le but de réduire de possibles effets de repliement spectral (254). Un navigateur basé sur l'échantillonnage faiblement résolu du centre du  $k$ -space peut également être utilisé afin de corriger la phase induite par des artefacts de mouvement, permettant ainsi de grandement améliorer la reconstruction de l'image (255).

En conclusion, cette section montre la faisabilité d'une séquence d'imagerie permettant de combiner contraste gluCEST et mesures de diffusion. De nombreuses étapes sont cependant encore nécessaires afin d'être en mesure d'analyser et interpréter correctement ces données.

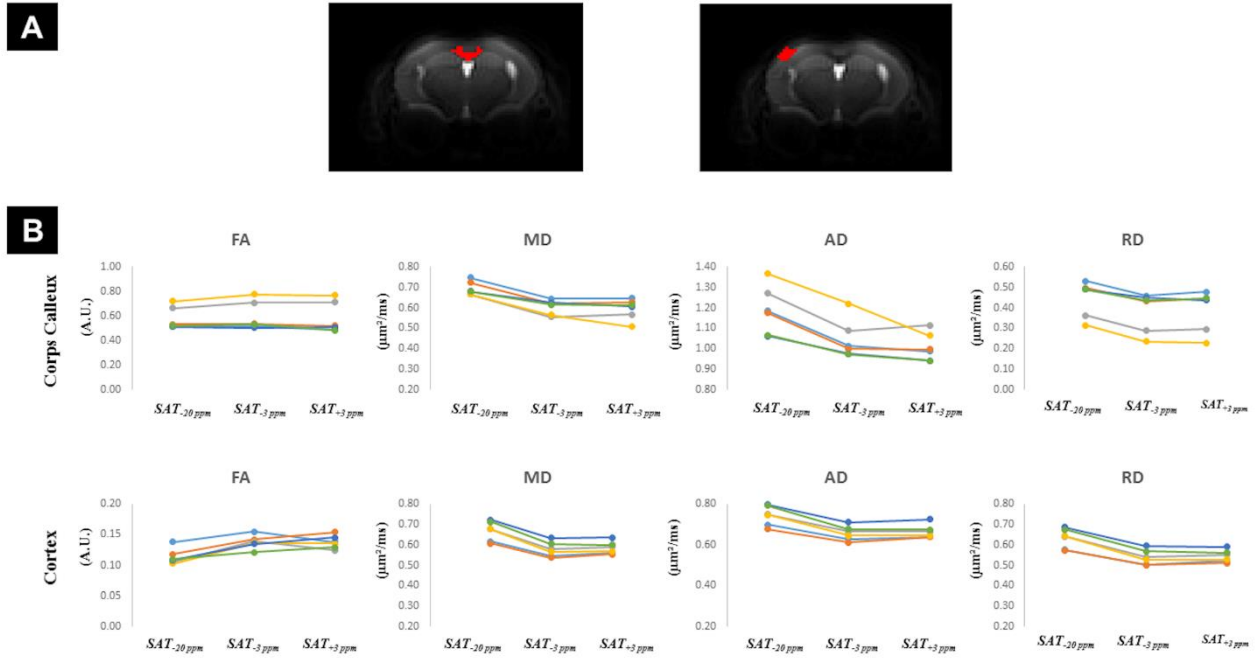


Figure V-20 : A) Régions d'intérêt (pixels rouges) définies pour le corps calleux (image de gauche) et le cortex (image de droite). B) Evolution des métriques DTI en fonction des trois fréquences de saturation pour le corps calleux (ligne du haut) et le cortex (ligne du bas).

## V.7. CONCLUSION

Notre approche tire parti de la capacité de l'effet gluCEST à venir spécifiquement atténuer la contribution du pool d'eau intraneural / intracellulaire au signal total de diffusion. La combinaison du gluCEST aux mesures de diffusion offre une source de contraste originale permettant la comparaison des propriétés de diffusion de l'eau résidant dans les compartiments intra- et extracellulaires sans avoir à recourir à l'utilisation d'une sonde de marquage exogène. Cette première étude montre le potentiel de cette technique à capturer de subtiles variations de l'ADC avec et sans pondération en diffusion, à condition que le temps de saturation soit suffisamment court afin de réduire au maximum l'effet des échanges d'eau entre compartiments pouvant survenir durant l'application des impulsions RF de saturation. Nos résultats dans la substance grise semblent indiquer que l'ADC isotrope est globalement plus faible à l'intérieur des neurones.

Les mesures directionnelles effectuées dans la substance blanche donnent des résultats très différents en fonction de la direction d'application du gradient selon X ou Y, suggérant que la diffusivité radiale est plus élevée à l'extérieur des axones, tandis que la diffusivité axiale reste similaire entre les deux compartiments.

Nous montrons également que cette approche peut être étendue à une séquence d'imagerie afin d'effectuer des mesures DTI, ouvrant ainsi d'intéressantes perspectives en termes de résolution spatiale.

En conclusion, ce travail exploratoire a permis de développer de nouveaux outils permettant d'associer contraste gluCEST et mesures de diffusion. Cependant, les résultats contradictoires obtenus en spectroscopie et en imagerie, auxquels vient s'ajouter la difficulté d'effectuer des expériences de validation sur fantôme, compliquent grandement l'interprétation des données en termes de microstructure. De plus, l'effet de l'échange d'eau entre les compartiments intracellulaire et extracellulaire doit faire l'objet d'un travail de modélisation approfondi afin de confirmer la spécificité suffisante de la saturation gluCEST au milieu intracellulaire.

---

# CHAPITRE VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La notion de compartiment tissulaire constitue le fil rouge de ce travail de thèse. La nature peu « remarquable » du signal de diffusion rend en effet son interprétation difficile et la modélisation des données repose donc nécessairement sur la prise en compte de différents compartiments tissulaires présentant *a priori* des propriétés de diffusion différentes. Des mesures *in vivo* sont cependant incontournables afin de confirmer et affiner les hypothèses sur lesquelles s'appuient les modèles de la microstructure. Dans cette optique, il est nécessaire d'adapter son approche expérimentale afin d'améliorer la spécificité de la mesure à un compartiment tissulaire donné. Dans ce travail de thèse, nous adoptons par conséquent plusieurs stratégies afin d'explorer différents aspects complémentaires de la microstructure.

Les mesures de DW-MRS permettent d'être sensibles aux compartiments intracellulaires en détectant la diffusion de métabolites confinés dans des types cellulaires précis. Plus précisément, les mesures aux hautes valeurs de  $b$  sont particulièrement sensibles à la restriction, reflétant notamment le diamètre des fibres cellulaires. Les mesures aux longs  $t_{ds}$  permettent quant à elles de collecter des informations sur la longueur des fibres cellulaires tout en étant également influencée par la tortuosité induite par la présence de structures secondaires (protrusions telles que les épines dendritiques ou les feuilletts astrocytaires). En complément de ces deux approches, nous tentons d'élucider dans le **Chapitre III** en quoi les mesures DDE apportent des informations supplémentaires sur la microstructure. Nous remarquons dans un premier temps que la modulation angulaire du signal de diffusion des métabolites suggère que ceux-ci diffusent principalement dans des compartiments allongés, i.e. le long des fibres cellulaires. Néanmoins, l'utilisation d'un simple modèle de cylindres orientés de manière isotrope dans l'espace ne suffit pas à modéliser les données DDE de manière satisfaisante, aboutissant systématiquement à des valeurs de  $d_{\text{fibre}}$  et  $D_{\text{free}}$  peu réalistes d'un point de vue biologique. Des simulations de la diffusion dans des cellules synthétiques 3D révèlent que la prise en compte de la présence d'embranchements le long des fibres cellulaires s'avère primordiale afin de reproduire l'amplitude de la modulation angulaire du signal observée *in vivo* pour les métabolites. Les mesures DDE semblent par conséquent particulièrement sensibles à la perte des corrélations spatiales survenant durant le TM en raison du changement

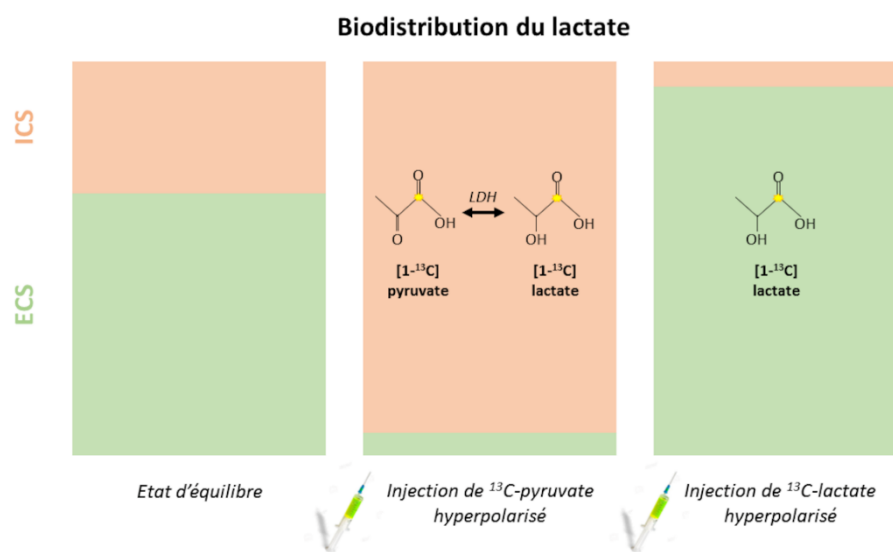
de trajectoire imposé par la microstructure pour un grand nombre de molécules. Enfin, la signature DDE particulièrement singulière du lactate, présent à la fois dans l'ICS et l'ECS, indique que cette mesure pourrait permettre de discriminer ces compartiments en termes d'anisotropie microscopique.

Dans le **Chapitre IV**, nous effectuons des mesures de DW-MRS spécifiquement dans l'ECS en injectant un marqueur exogène de ce compartiment, le sucrose. Les résultats obtenus dans la substance grise mettent en avant le caractère non-gaussien des propriétés de diffusion de ce compartiment. En effet, bien que la diffusion du sucrose soit plus rapide que celle des métabolites intracellulaires et apparaisse comme monoexponentielle à faibles valeurs de  $b$ , elle est également sensible à des phénomènes de restriction et de tortuosité imposée par la microstructure de l'ECS. L'absence totale de modulation du signal DDE du sucrose, contrairement à ce qui est observé pour les métabolites intracellulaires, confirme par ailleurs le potentiel de cette mesure à distinguer l'ICS de l'ECS. Le comportement « intermédiaire » du lactate pour toutes les mesures de DW-MRS, à mi-chemin entre les métabolites intracellulaires et le sucrose, est à nouveau en accord avec la distribution de ce métabolite au sein des compartiments intracellulaires (neuronal et glial) et l'ECS.

Nous revenons dans le **Chapitre V** à des mesures plus « conventionnelles » de la diffusion de l'eau, avec néanmoins l'utilisation originale d'un contraste gluCEST visant à moduler la contribution du pool d'eau intra-neuronal. Une première série de mesures dans de gros voxels de spectroscopie, placés dans le cortex ou autour du corps calleux, indiquent une diffusivité radiale plus lente de l'eau intra-neuronale à la fois dans la substance grise et dans la substance blanche. Les diffusivités axiales extra- et intra-axonale semblent en revanche similaires dans la substance blanche. Afin d'améliorer la résolution spatiale de notre approche, nous explorons par la suite la faisabilité de telles mesures en imagerie à l'aide d'une séquence DTI précédée d'un module de saturation CEST. Des cartographies de FA, MD, AD et RD sont ainsi obtenues avec un SNR satisfaisant pour chaque fréquence de saturation. Malheureusement, l'évolution des métriques DTI (notamment AD et RD) en présence de saturation gluCEST va complètement à l'encontre de ce qui est précédemment observé en spectroscopie. Ces résultats préliminaires, bien qu'intrigants, ne nous permettent donc pas de trancher avec certitude sur les propriétés de diffusion de l'eau intra-axonale.

Enfin, nous souhaitons ici élargir l'horizon de ce travail de thèse en proposant une nouvelle stratégie expérimentale ayant pour but d'élucider en partie la biodistribution du lactate cérébral

au sein des compartiments tissulaires. Nous avons en effet évoqué dans la **Section I.6.ii** en quoi la répartition du lactate au sein des compartiments tissulaires pourrait apporter de précieuses indications quant à son rôle métabolique dans le contexte de l'hypothèse de la navette astrocyte-neurone. Les mesures des **Chapitres III** et **IV** montrent cependant à quel point il est difficile, voire impossible, de mesurer les propriétés de diffusion du lactate spécifiquement dans l'ICS en raison de l'existence d'un important pool extracellulaire. Nous proposons par conséquent de recourir à des injections de pyruvate marqué au  $^{13}\text{C}$  hyperpolarisé afin d'observer la production lactate intracellulaire marqué au  $^{13}\text{C}$  hyperpolarisé à partir du pyruvate injecté, avant son relargage dans l'ECS. A l'inverse, le lactate extracellulaire et vasculaire pourra être observé grâce à l'injection de lactate marqué au  $^{13}\text{C}$  hyperpolarisé non-intériorisé par les cellules. Nous émettons ainsi l'hypothèse que les propriétés de diffusion du lactate marqué au  $^{13}\text{C}$  hyperpolarisé ne seront pas représentatives de ce qui est observé à l'état d'équilibre, mais se rapprocheront plutôt des propriétés de diffusion des métabolites intracellulaires dans le cas de l'injection de pyruvate hyperpolarisé, ou des propriétés de diffusion telles qu'observées pour le sucrose dans le cas de l'injection de lactate hyperpolarisé. Une représentation qualitative de la



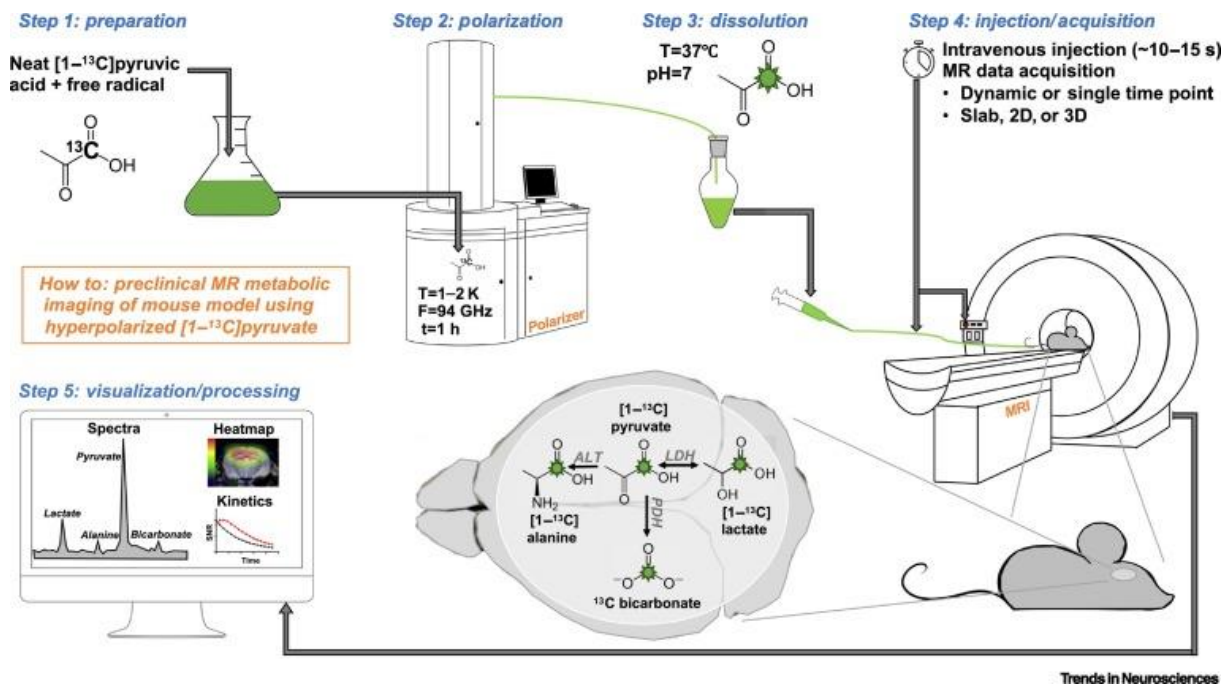
**Figure VI-1 : Représentation qualitative de la biodistribution du lactate au sein de l'ICS et l'ECS pour nos différentes conditions expérimentales.**

distribution du lactate à l'état d'équilibre et lors des différentes solutions marquées au  $^{13}\text{C}$  hyperpolarisé est proposée en **Figure VI.1**.

Afin de mener à bien ce projet, nous avons établi un partenariat avec l'équipe de recherche de Myriam Chaumeil basée à l'Université de Californie à San Francisco. Les mesures sont réalisées sur un scanner 3 T chez la souris à l'aide d'une antenne de surface en quadrature  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ . Un schéma résumant les différentes étapes de la préparation et de l'injection d'une



solution de pyruvate marqué au  $^{13}\text{C}$  hyperpolarisé est disponible en **Figure VI.2** (extraite de (256)).



**Figure VI-2 : Déroulé d'une expérience d'imagerie métabolique du pyruvate marqué au  $^{13}\text{C}$  hyperpolarisé. Tiré de Le Page *et al* (254).**

Nous évaluerons dans un premier temps la faisabilité des mesures de spectroscopie localisée du  $^{13}\text{C}$  hyperpolarisé en utilisant la séquence STE-LASER. Nous effectuerons par la suite des mesures du lactate marqué au  $^{13}\text{C}$  hyperpolarisé produit de façon endogène dans les cellules de façon à suivre l'évolution temporelle de l'ADC du lactate après injection de pyruvate marqué au  $^{13}\text{C}$  hyperpolarisé. Le but de cette expérience est d'évaluer comment les propriétés de diffusion du lactate dévient au cours du temps par rapport à l'état d'équilibre. Nous pourrions alors être éventuellement sensibles au transport du lactate produit dans l'ICS vers l'ECS. Des mesures de diffusions plus complexes, telles que l'ADC aux longs  $t_{\text{ds}}$  ou les mesures aux hautes valeurs de  $b$ , nous aideront par ailleurs à mieux caractériser les propriétés de diffusion du lactate dans l'ICS, tandis que la DDE pourra être utilisée d'évaluer la compartimentation du lactate hyperpolarisé au cours de l'expérience, d'abord dans l'ICS puis dans l'ECS. A l'instar des mesures dans l'ICS, des mesures des propriétés de diffusion du lactate en provenance des pools extracellulaires et vasculaires pourraient être réalisées grâce à l'injection de lactate marqué au  $^{13}\text{C}$  hyperpolarisé. D'après les résultats du **Chapitre III**, on s'attend alors à des résultats différant grandement des propriétés de diffusion du lactate produit de manière endogène dans

l'ICS à partir du pyruvate marqué au  $^{13}\text{C}$  hyperpolarisé. Ces mesures sont actuellement en cours de réalisation à UCSF et nous espérons prochainement obtenir quelques résultats préliminaires.

---

## CHAPITRE VII. PUBLICATIONS ET

### FINANCEMENTS OBTENUS EN LIEN AVEC CE TRAVAIL DE THESE

#### VII.1. PUBLICATIONS DANS DES JOURNAUX A COMITE DE RELECTURE

Vincent *et al*, Revisiting double diffusion encoding MRS in the mouse brain at 11.7 T : Which microstructural features are we sensitive to ?, *NeuroImage*, 207 (2020) 116399

Vincent *et al*, Characterizing extracellular diffusion properties using diffusion-weighted MRS of sucrose injected in the mouse brain, *NMR in Biomedicine*, 2021;34:e4478

#### VII.2. PRESENTATIONS ORALES EN CONFERENCE

Vincent *et al*, Revisiting double diffusion encoding MRS in the mouse brain at 11.7 T : Which microstructural features are we sensitive to ?, ISMRM, 2019, abstract number 1012, Power Pitch Session « Microstructure Modelling & Validation » (*magna cum laude*).

Vincent *et al*, Characterizing extracellular diffusion properties using diffusion-weighted MRS of sucrose injected in the mouse brain, ISMRM, 2020, abstract number 0847, Combined Educational & Scientific Session « Microstructure : what scales are you probing ? » (*summa cum laude*).

Vincent *et al*, Using glutamate-CEST to characterize water diffusion inside neurons: initial results, ISMRM, 2020, abstract number 0729, Scientific Session « Diffusion Microstructure Modeling and Validation » (*summa cum laude*).

#### VII.3. BOURSES DE MOBILITÉ SCIENTIFIQUE

Bourse Fulbright Paris-Saclay  
Bourse de l'ISMRM - ISMRM grant research exchange  
Bourse de mobilité de l'Université Paris-Saclay

---

## CHAPITRE VIII. RÉFÉRENCES

1. Khanam H, Ali A, Asif M, Shamsuzzaman. Neurodegenerative diseases linked to misfolded proteins and their therapeutic approaches: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016 Nov 29;124:1121–41.
2. Santé M des S et de la. Maladies neurodégénératives [Internet]. Ministère des Solidarités et de la Santé. 2020 [cited 2020 Apr 13]. Available from: <http://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/maladies/maladies-neurodegeneratives/>
3. Admin S, Admin S. La maladie de Parkinson [Internet]. Ministère des Solidarités et de la Santé. 2020 [cited 2020 Apr 13]. Available from: <http://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/maladies/maladies-neurodegeneratives/article/la-maladie-de-parkinson>
4. DGOS. La maladie d'Alzheimer [Internet]. Ministère des Solidarités et de la Santé. 2020 [cited 2020 Apr 13]. Available from: <http://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/maladies/maladies-neurodegeneratives/article/la-maladie-d-alzheimer>
5. Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2016 Aug 1;53(6):4094–125.
6. Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*. 2016 Aug 19;353(6301):777–83.
7. Nicoletti F, Bruno V, Copani A, Casabona G, Knöpfel T. Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? *Trends in Neurosciences*. 1996 Jul 1;19(7):267–71.
8. Bae JR, Kim SH. Synapses in neurodegenerative diseases. *BMB Rep*. 2017 May;50(5):237–46.
9. Millecamps S, Julien J-P. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*. 2013 Mar;14(3):161–76.
10. Procaccini C, Santopaolo M, Faicchia D, Colamatteo A, Formisano L, de Candia P, et al. Role of metabolism in neurodegenerative disorders. *Metabolism*. 2016 Sep 1;65(9):1376–90.
11. Schapira AHV, Cooper JM. Mitochondrial function in neurodegeneration and ageing. *Mutation Research/DNAging*. 1992 Sep 1;275(3):133–43.
12. Spiers TL, Meyer-Luehmann M, Stern EA, McLean PJ, Skoch J, Nguyen PT, et al. Dendritic Spine Abnormalities in Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice Demonstrated by Gene Transfer and Intravital Multiphoton Microscopy. *J Neurosci*. 2005 Aug 3;25(31):7278–87.
13. Adalbert R, Coleman MP. Review: Axon pathology in age-related neurodegenerative disorders. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2013;39(2):90–108.
14. Adalbert R, Nogradi A, Babetto E, Janeckova L, Walker SA, Kerschensteiner M, et al. Severely dystrophic axons at amyloid plaques remain continuous and connected to viable cell bodies. *Brain*. 2009 Feb 1;132(2):402–16.
15. Tsai J, Grutzendler J, Duff K, Gan W-B. Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. *Nature Neuroscience*. 2004 Nov;7(11):1181–3.
16. Ben Haim L, Carrillo-de Sauvage M-A, Ceyzériat K, Escartin C. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2015 [cited 2020 Apr 14];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2015.00278/full>
17. Rosas HD, Salat DH, Lee SY, Zaleta AK, Pappu V, Fischl B, et al. Cerebral cortex and the clinical expression of Huntington's disease: complexity and heterogeneity. *Brain*. 2008 Apr 1;131(4):1057–68.
18. Crutch SJ, Lehmann M, Schott JM, Rabinovici GD, Rossor MN, Fox NC. Posterior cortical atrophy. *The Lancet Neurology*. 2012 Feb 1;11(2):170–8.

19. Bozzao A, Floris R, Baviera ME, Apruzzese A, Simonetti G. Diffusion and Perfusion MR Imaging in Cases of Alzheimer's Disease: Correlations with Cortical Atrophy and Lesion Load. *American Journal of Neuroradiology*. 2001 Jun 1;22(6):1030–6.
20. Wiltshire K, Foster S, Kaye JA, Small BJ, Camicioli R. Corpus Callosum in Neurodegenerative Diseases: Findings in Parkinson's Disease. *DEM*. 2005;20(6):345–51.
21. Seeley WW, Crawford RK, Zhou J, Miller BL, Greicius MD. Neurodegenerative Diseases Target Large-Scale Human Brain Networks. *Neuron*. 2009 Apr 16;62(1):42–52.
22. Villain N, Fouquet M, Baron J-C, Mézènge F, Landeau B, de La Sayette V, et al. Sequential relationships between grey matter and white matter atrophy and brain metabolic abnormalities in early Alzheimer's disease. *Brain*. 2010 Nov 1;133(11):3301–14.
23. Palesi F, De Rinaldis A, Vitali P, Castellazzi G, Casiraghi L, Germani G, et al. Specific Patterns of White Matter Alterations Help Distinguishing Alzheimer's and Vascular Dementia. *Front Neurosci* [Internet]. 2018 [cited 2020 Apr 14];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2018.00274/full#B71>
24. Andica C, Kamagata K, Hatano T, Saito Y, Ogaki K, Hattori N, et al. MR biomarkers of degenerative brain disorders derived from diffusion imaging. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* [Internet]. n/a(n/a). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmri.27019>
25. Bean BP. The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007 Jun;8(6):451–65.
26. Paus T, Pesaresi M, French L. White matter as a transport system. *Neuroscience*. 2014 Sep 12;276:117–25.
27. Stuart G, Spruston N, Häusser M. *Dendrites*. Oxford University Press; 2007. 578 p.
28. Alexander DC, Dyrby TB, Nilsson M, Zhang H. Imaging brain microstructure with diffusion MRI: practicality and applications. *NMR in Biomedicine*. 2019;32(4):e3841.
29. Zaqout S, Kaindl AM. Golgi-Cox Staining Step by Step. *Front Neuroanat* [Internet]. 2016 [cited 2020 Apr 6];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2016.00038/full>
30. Mainen ZF, Sejnowski TJ. Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. *Nature*. 1996 Jul;382(6589):363–6.
31. L'image de la semaine: «Les épines dendritiques, siège de la communication nerveuse» [Internet]. CNRS Le journal. [cited 2020 Apr 4]. Available from: <https://lejournel.cnrs.fr/nos-blogs/aux-frontieres-du-cerveau/limage-de-la-semaine-les-epines-dendritiques-siege-de-la>
32. Hering H, Sheng M. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature Reviews Neuroscience*. 2001 Dec;2(12):880–8.
33. Paus T. Imaging microstructure in the living human brain: A viewpoint. *NeuroImage*. 2018 Nov 15;182:3–7.
34. Schuez A, Miller R. *Cortical Areas: Unity and Diversity*. CRC Press; 2002. 533 p.
35. Innocenti GM, Vercelli A, Caminiti R. The Diameter of Cortical Axons Depends Both on the Area of Origin and Target. *Cereb Cortex*. 2014 Aug 1;24(8):2178–88.
36. Innocenti GM, Carlén M, Dyrby TB. Chapter 15 - The Diameters of Cortical Axons and Their Relevance to Neural Computing. In: Rockland KS, editor. *Axons and Brain Architecture* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2016. p. 317–35. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128013939000153>
37. Seppehrband F, Alexander DC, Clark KA, Kurniawan ND, Yang Z, Reutens DC. Parametric Probability Distribution Functions for Axon Diameters of Corpus Callosum. *Front Neuroanat* [Internet]. 2016 [cited 2020 Apr 6];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2016.00059/full>
38. Stuffelbeam R. *Neurons, Synapses, Action Potentials, and Neurotransmission - The Mind Project* [Internet]. [cited 2020 Nov 9]. Available from: [http://www.mind.ilstu.edu/curriculum/neurons\\_intro/neurons\\_intro.php](http://www.mind.ilstu.edu/curriculum/neurons_intro/neurons_intro.php)
39. Pelvig DP, Pakkenberg H, Stark AK, Pakkenberg B. Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiology of Aging*. 2008 Nov 1;29(11):1754–62.

40. Azevedo FAC, Carvalho LRB, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti REL, Leite REP, et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neurology*. 2009;513(5):532–41.
41. Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010 Jan 1;119(1):37–53.
42. Graeber MB, Streit WJ. Microglia: Immune Network in the CNS. *Brain Pathology*. 1990;1(1):2–5.
43. Mori T, Buffo A, Götz M. The Novel Roles of Glial Cells Revisited: The Contribution of Radial Glia and Astrocytes to Neurogenesis. In: *Current Topics in Developmental Biology* [Internet]. Academic Press; 2005. p. 67–99. (Neural Development; vol. 69). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0070215305690047>
44. Baldwin KT, Eroglu C. Molecular mechanisms of astrocyte-induced synaptogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*. 2017 Aug 1;45:113–20.
45. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG, Araque A, Parpura V, et al. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*. 1999 May 1;22(5):208–15.
46. Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *PNAS*. 1994 Oct 25;91(22):10625–9.
47. Colombo E, Farina C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends in Immunology*. 2016 Sep 1;37(9):608–20.
48. Cheslow L, Alvarez JI. Glial-endothelial crosstalk regulates blood–brain barrier function. *Current Opinion in Pharmacology*. 2016 Feb 1;26:39–46.
49. Khakh BS, Sofroniew MV. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci*. 2015 Jul;18(7):942–52.
50. Oishi K, Zilles K, Amunts K, Faria A, Jiang H, Li X, et al. Human brain white matter atlas: Identification and assignment of common anatomical structures in superficial white matter. *NeuroImage*. 2008 Nov 15;43(3):447–57.
51. Substance blanche sous-corticale et centrale [Internet]. [cited 2020 Apr 6]. Available from: <https://www.inforadiologie.ch/substance-blanche-centrale.php>
52. Nilsson M, van Westen D, Ståhlberg F, Sundgren PC, Lätt J. The role of tissue microstructure and water exchange in biophysical modelling of diffusion in white matter. *Magn Reson Mater Phy*. 2013 Aug 1;26(4):345–70.
53. Urenjak J, Williams SR, Gadian DG, Noble M. Specific Expression of N-Acetylaspartate in Neurons, Oligodendrocyte-Type-2 Astrocyte Progenitors, and Immature Oligodendrocytes In Vitro. *Journal of Neurochemistry*. 1992;59(1):55–61.
54. Choi J-K, Dedeoglu A, Jenkins BG. Application of MRS to mouse models of neurodegenerative illness. *NMR in Biomedicine*. 2007;20(3):216–37.
55. Simmons ML, Frondoza CG, Coyle JT. Immunocytochemical localization of N-acetyl-aspartate with monoclonal antibodies. *Neuroscience*. 1991 Jan 1;45(1):37–45.
56. Barker PB. N-Acetyl Aspartate—A Neuronal Marker? *Annals of Neurology*. 2001;49(4):423–4.
57. Ariyannur PS, Madhavarao CN, Namboodiri AMA. N-acetylaspartate synthesis in the brain: Mitochondria vs. microsomes. *Brain Research*. 2008 Aug 28;1227:34–41.
58. Erecińska M, Silver IA. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Progress in Neurobiology*. 1990 Jan 1;35(4):245–96.
59. Daikhin Y, Yudkoff M. Compartmentation of Brain Glutamate Metabolism in Neurons and Glia. *J Nutr*. 2000 Apr 1;130(4):1026S–1031S.
60. Brand A, Richter-Landsberg C, Leibfritz D. Multinuclear NMR Studies on the Energy Metabolism of Glial and Neuronal Cells. *DNE*. 1993;15(3–5):289–98.

61. Thurston JH, Sherman WR, Hauhart RE, Kloepper RF. myo-Inositol: A Newly Identified Nonnitrogenous Osmoregulatory Molecule in Mammalian Brain. *Pediatric Research*. 1989 Nov;26(5):482–5.
62. Haris M, Cai K, Singh A, Hariharan H, Reddy R. In vivo mapping of brain myo-inositol. *NeuroImage*. 2011 Feb 1;54(3):2079–85.
63. Eisenberg F, Parthasarathy R. Measurement of biosynthesis of myo-inositol from glucose 6-phosphate. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 1987. p. 127–43. (Cellular Regulators Part B: Calcium and Lipids; vol. 141). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687987410616>
64. Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*. 1977 Mar 25;195(4284):1356–8.
65. Urenjak J, Williams SR, Gadian DG, Noble M. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy unambiguously identifies different neural cell types. *J Neurosci*. 1993 Mar 1;13(3):981–9.
66. Bekdash RA. Choline, the brain and neurodegeneration: insights from epigenetics. *Front Biosci*. 2018;23:1113–43.
67. Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, Wallimann T, Widmer HR. Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Research Bulletin*. 2008 Jul 1;76(4):329–43.
68. Bonvento G, Valette J, Flament J, Mochel F, Brouillet E. Imaging and spectroscopic approaches to probe brain energy metabolism dysregulation in neurodegenerative diseases. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017 Jun 1;37(6):1927–43.
69. Wu J-Y, Prentice H. Role of taurine in the central nervous system. *Journal of Biomedical Science*. 2010;17(Suppl 1):S1.
70. Vitvitsky V, Garg SK, Banerjee R. Taurine biosynthesis by neurons and astrocytes. *Journal of biological chemistry*. 2011;286(37):32002–10.
71. Cellular landscape [Internet]. Gael McGill. [cited 2021 Apr 4]. Available from: <https://gaelmcgill.artstation.com/projects/Pm0JL1>
72. De Graaf RA. Basic Principles. In: *In Vivo NMR Spectroscopy* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2019 [cited 2021 Apr 4]. p. 1–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119382461.ch1>
73. Torrey HC. Bloch equations with diffusion terms. *Physical review*. 1956;104(3):563.
74. Wermter FC, Mitschke N, Bock C, Dreher W. Temperature dependence of <sup>1</sup>H NMR chemical shifts and its influence on estimated metabolite concentrations. *Magn Reson Mater Phy*. 2017 Dec 1;30(6):579–90.
75. Moon R, Richards J. Determination of Intracellular pH by <sup>31</sup>P Magnetic Resonance. *Journal of Biological Chemistry*. 1973 Oct 25;248(20):7276–8.
76. Stejskal EO, Tanner JE. Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *J Chem Phys*. 1965 Jan 1;42(1):288–92.
77. Callaghan PT, Stepišnik J. Frequency-domain analysis of spin motion using modulated-gradient NMR. Academic Press; 1995.
78. Callaghan PT, MacGowan D, Packer KJ, Zelaya FO. High-resolution q-space imaging in porous structures. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*. 1990 Oct 15;90(1):177–82.
79. Basser PJ, Mattiello J, LeBihan D. MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophysical journal*. 1994;66(1):259–67.
80. Jensen JH, Helpert JA, Ramani A, Lu H, Kaczynski K. Diffusional kurtosis imaging: The quantification of non-gaussian water diffusion by means of magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2005;53(6):1432–40.
81. Stanisz GJ, Wright GA, Henkelman RM, Szafer A. An analytical model of restricted diffusion in bovine optic nerve. *Magnetic Resonance in Medicine*. 1997;37(1):103–11.

82. Behrens TEJ, Woolrich MW, Jenkinson M, Johansen-Berg H, Nunes RG, Clare S, et al. Characterization and propagation of uncertainty in diffusion-weighted MR imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2003;50(5):1077–88.
83. Assaf Y, Basser PJ. Composite hindered and restricted model of diffusion (CHARMED) MR imaging of the human brain. *NeuroImage*. 2005 Aug 1;27(1):48–58.
84. Zhang H, Schneider T, Wheeler-Kingshott CA, Alexander DC. NODDI: Practical in vivo neurite orientation dispersion and density imaging of the human brain. *NeuroImage*. 2012 Jul 16;61(4):1000–16.
85. Nilsson M, Lätt J, Ståhlberg F, Westén D van, Hagslätt H. The importance of axonal undulation in diffusion MR measurements: a Monte Carlo simulation study. *NMR in Biomedicine*. 2012;25(5):795–805.
86. Stanisz GJ. Diffusion MR in Biological Systems: Tissue Compartments and Exchange. *Israel Journal of Chemistry*. 2003;43(1–2):33–44.
87. Friedman R, Pellarin R, Caflich A. Amyloid Aggregation on Lipid Bilayers and Its Impact on Membrane Permeability. *Journal of Molecular Biology*. 2009 Mar 27;387(2):407–15.
88. Hashimoto M, Rockenstein E, Crews L, Masliah E. Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuromol Med*. 2003 Oct 1;4(1):21–35.
89. Beaulieu C, Fenrich FR, Allen PS. Multicomponent water proton transverse relaxation and T2-discriminated water diffusion in myelinated and nonmyelinated nerve. *Magnetic Resonance Imaging*. 1998 Dec 1;16(10):1201–10.
90. Nguyen V-D, Jansson J, Hoffman J, Li J-R. A partition of unity finite element method for computational diffusion MRI. *Journal of Computational Physics*. 2018 Dec 15;375:271–90.
91. Garimella HT, Kraft RH. Modeling the mechanics of axonal fiber tracts using the embedded finite element method. *International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering*. 2017;33(5):e2823.
92. Hall MG, Alexander DC. Convergence and Parameter Choice for Monte-Carlo Simulations of Diffusion MRI. *IEEE Transactions on Medical Imaging*. 2009 Sep;28(9):1354–64.
93. Nguyen K-V, Hernández-Garzón E, Valette J. Efficient GPU-based Monte-Carlo simulation of diffusion in real astrocytes reconstructed from confocal microscopy. *Journal of Magnetic Resonance*. 2018 Nov 1;296:188–99.
94. Waudby CA, Christodoulou J. GPU accelerated Monte Carlo simulation of pulsed-field gradient NMR experiments. *Journal of Magnetic Resonance*. 2011 Jul 1;211(1):67–73.
95. Gill SS, Small RK, Thomas DGT, Patel P, Porteous R, Bruggen NV, et al. Brain metabolites as <sup>1</sup>H NMR markers of neuronal and glial disorders. *NMR in Biomedicine*. 1989;2(5–6):196–200.
96. Chang L, Munsaka SM, Kraft-Terry S, Ernst T. Magnetic Resonance Spectroscopy to Assess NeuroInflammation and Neuropathic Pain. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013 Jun 1;8(3):576–93.
97. Assaf Y, Cohen Y. In vivo and in vitro bi-exponential diffusion of N -acetyl aspartate (NAA) in rat brain: a potential structural probe? *NMR in Biomedicine*. 1998;11(2):67–74.
98. Assaf Y, Cohen Y. Structural information in neuronal tissue as revealed by q-space diffusion NMR spectroscopy of metabolites in bovine optic nerve. *NMR in Biomedicine*. 1999;12(6):335–44.
99. Kroenke CD, Ackerman JJH, Neil JJ. Magnetic resonance measurement of tetramethylammonium diffusion in rat brain: Comparison of magnetic resonance and ionophoresis in vivo diffusion measurements. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2003;50(4):717–26.
100. Palombo M, Ligneul C, Valette J. Modeling diffusion of intracellular metabolites in the mouse brain up to very high diffusion-weighting: Diffusion in long fibers (almost) accounts for non-monoexponential attenuation. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2017 Jan 1;77(1):343–50.
101. Ligneul C, Palombo M, Valette J. Metabolite diffusion up to very high b in the mouse brain in vivo: Revisiting the potential correlation between relaxation and diffusion properties. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2017 Apr 1;77(4):1390–8.



102. Palombo M, Ligneul C, Hernandez-Garzon E, Valette J. Can we detect the effect of spines and leaflets on the diffusion of brain intracellular metabolites? *NeuroImage*. 2018 Nov 15;182:283–93.
103. Ligneul C, Valette J. Probing metabolite diffusion at ultra-short time scales in the mouse brain using optimized oscillating gradients and “short”-echo-time diffusion-weighted MRS. *NMR in Biomedicine*. 2017;30(1):e3671.
104. Marchadour C, Brouillet E, Hantraye P, Lebon V, Valette J. Anomalous Diffusion of Brain Metabolites Evidenced by Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Spectroscopy in Vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012 Dec 1;32(12):2153–60.
105. Wick Markus, Nagatomo Yasushi, Prielmeier Franz, Frahm Jens. Alteration of Intracellular Metabolite Diffusion in Rat Brain In Vivo During Ischemia and Reperfusion. *Stroke*. 1995 Oct 1;26(10):1930–4.
106. Harada M, Uno M, Hong F, Hisaoka S, Nishitani H, Matsuda T. Diffusion-weighted in vivo localized proton MR spectroscopy of human cerebral ischemia and tumor. *NMR in Biomedicine*. 2002;15(1):69–74.
107. Dreher W, Busch E, Leibfritz D. Changes in apparent diffusion coefficients of metabolites in rat brain after middle cerebral artery occlusion measured by proton magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2001;45(3):383–9.
108. Toorn A van der, Dijkhuizen RM, Tulleken CAF, Nicolay K. Diffusion of metabolites in normal and ischemic rat brain measured by localized 1H MRS. *Magnetic Resonance in Medicine*. 1996;36(6):914–22.
109. Duong TQ, Ackerman JJH, Ying HS, Neil JJ. Evaluation of extra- and intracellular apparent diffusion in normal and globally ischemic rat brain via 19F NMR. *Magnetic Resonance in Medicine*. 1998 Jul 1;40(1):1–13.
110. Ercan E, Magro-Checa C, Valabregue R, Branzoli F, Wood ET, Steup-Beekman GM, et al. Glial and axonal changes in systemic lupus erythematosus measured with diffusion of intracellular metabolites. *Brain*. 2016 May 1;139(5):1447–57.
111. Genovese G, Palombo M, Santin MD, Valette J, Ligneul C, Aigrot M-S, et al. Inflammation-driven glial alterations in the cuprizone mouse model probed with diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy at 11.7 T. arXiv:200708400 [physics] [Internet]. 2020 Jul 16 [cited 2020 Nov 10]; Available from: <http://arxiv.org/abs/2007.08400>
112. Fieremans E, Burcaw LM, Lee H-H, Lemberskiy G, Veraart J, Novikov DS. In vivo observation and biophysical interpretation of time-dependent diffusion in human white matter. *NeuroImage*. 2016 Apr 1;129:414–27.
113. Jespersen SN, Olesen JL, Hansen B, Shemesh N. Diffusion time dependence of microstructural parameters in fixed spinal cord. *NeuroImage*. 2018;182:329–42.
114. Lee H-H, Fieremans E, Novikov DS. What dominates the time dependence of diffusion transverse to axons: Intra- or extra-axonal water? *NeuroImage*. 2018 Nov 15;182:500–10.
115. Novikov DS, Jensen JH, Helpert JA, Fieremans E. Revealing mesoscopic structural universality with diffusion. *PNAS*. 2014 Apr 8;111(14):5088–93.
116. Najac C, Marchadour C, Guillermier M, Houitte D, Slavov V, Brouillet E, et al. Intracellular metabolites in the primate brain are primarily localized in long fibers rather than in cell bodies, as shown by diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy. *NeuroImage*. 2014 Apr 15;90:374–80.
117. Najac C, Branzoli F, Ronen I, Valette J. Brain intracellular metabolites are freely diffusing along cell fibers in grey and white matter, as measured by diffusion-weighted MR spectroscopy in the human brain at 7 T. *Brain Struct Funct*. 2016 Apr 1;221(3):1245–54.
118. Palombo M, Ligneul C, Najac C, Douce JL, Flament J, Escartin C, et al. New paradigm to assess brain cell morphology by diffusion-weighted MR spectroscopy in vivo. *PNAS*. 2016 Jun 14;113(24):6671–6.
119. Ligneul C, Palombo M, Hernández-Garzón E, Carrillo-de Sauvage M-A, Flament J, Hantraye P, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy enables cell-specific monitoring of astrocyte reactivity in vivo. *NeuroImage*. 2019 May 1;191:457–69.
120. Godin AG, Varela JA, Gao Z, Danné N, Dupuis JP, Lounis B, et al. Single-nanotube tracking reveals the nanoscale organization of the extracellular space in the live brain. *Nature Nanotechnology*. 2017 Mar;12(3):238–43.

121. Thorne RG, Nicholson C. In vivo diffusion analysis with quantum dots and dextrans predicts the width of brain extracellular space. *PNAS*. 2006 Apr 4;103(14):5567–72.
122. Nicholson C, Syková E. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends in Neurosciences*. 1998 May 1;21(5):207–15.
123. Nicholson C, Hrabětová S. Brain Extracellular Space: The Final Frontier of Neuroscience. *Biophysical Journal*. 2017 Nov 21;113(10):2133–42.
124. Bikbaev A, Frischknecht R, Heine M. Brain extracellular matrix retains connectivity in neuronal networks. *Scientific Reports*. 2015 Sep 29;5(1):1–12.
125. Ruoslahti E. Brain extracellular matrix. *Glycobiology*. 1996 Jul 1;6(5):489–92.
126. Hladky SB, Barrand MA. Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence. *Fluids Barriers CNS*. 2014 Dec 2;11(1):26.
127. Syková E. Extrasynaptic volume transmission and diffusion parameters of the extracellular space. *Neuroscience*. 2004 Jan 1;129(4):861–76.
128. Marcoli M, Agnati LF, Benedetti F, Genedani S, Guidolin D, Ferraro L, et al. On the role of the extracellular space on the holistic behavior of the brain. *Reviews in the Neurosciences*. 2015;26(5):489–506.
129. Fox PT, Raichle ME, Mintun MA, Dence C. Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. *Science*. 1988;241:462–4.
130. Pellerin L, Magistretti PJ. Sweet Sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012 Jul 1;32(7):1152–66.
131. Bak LK, Walls AB. CrossTalk opposing view: lack of evidence supporting an astrocyte-to-neuron lactate shuttle coupling neuronal activity to glucose utilisation in the brain. *J Physiol*. 2018 Feb 1;596(3):351–3.
132. Barros LF, Weber B. CrossTalk proposal: an important astrocyte-to-neuron lactate shuttle couples neuronal activity to glucose utilisation in the brain. *The Journal of Physiology*. 2018;596(3):347–50.
133. Tang BL. Brain activity-induced neuronal glucose uptake/glycolysis: is the lactate shuttle not required? *Brain Research Bulletin*. 2018;137:225–8.
134. Mächler P, Wyss MT, Elsayed M, Stobart J, Gutierrez R, von Faber-Castell A, et al. In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons. *Cell Metabolism*. 2016 Jan 12;23(1):94–102.
135. Pfeuffer J, Tkáč I, Gruetter R. Extracellular–Intracellular Distribution of Glucose and Lactate in the Rat Brain Assessed Noninvasively by Diffusion-Weighted <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy In Vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000 Apr 1;20(4):736–46.
136. Kunz N, da Silva AR, Jelescu IO. Intra- and extra-axonal axial diffusivities in the white matter: Which one is faster? *NeuroImage*. 2018 Nov 1;181:314–22.
137. Jelescu IO, Veraart J, Fieremans E, Novikov DS. Degeneracy in model parameter estimation for multi-compartmental diffusion in neuronal tissue. *NMR in Biomedicine*. 2016;29(1):33–47.
138. Novikov DS, Veraart J, Jelescu IO, Fieremans E. Rotationally-invariant mapping of scalar and orientational metrics of neuronal microstructure with diffusion MRI. *NeuroImage*. 2018 Jul 1;174:518–38.
139. Tkáč I, Starčuk Z, Choi I-Y, Gruetter R. In vivo <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. *Magnetic Resonance in Medicine*. 1999;41:649–56.
140. Haase A, Frahm J, Hänicke W, Matthaei D. <sup>1</sup>H NMR chemical shift selective (CHESS) imaging. *Physics in Medicine and Biology*. 30(4):341–4.
141. De Graaf RA. Single-voxel localization and water suppression. In: *In vivo NMR spectroscopy- principles and techniques*. John Wiley & Sons; 1998. p. 270–1.
142. Frahm J, Merboldt K-D, Hänicke W. Localized proton spectroscopy using stimulated echoes. *Journal of Magnetic Resonance*. 1987;72:502–8.

143. Shemesh N, Rosenberg JT, Dumez J-N, Muniz JA, Grant SC, Frydman L. Metabolic properties in stroked rats revealed by relaxation-enhanced magnetic resonance spectroscopy at ultrahigh fields. *Nature Communications*. 2014 Sep 17;5:4958.
144. Garwood M, DelaBarre L. The Return of the Frequency Sweep: Designing Adiabatic Pulses for Contemporary NMR. *Journal of Magnetic Resonance*. 2001;153:155–77.
145. De Graaf RA. Radiofrequency Pulses. In: *In Vivo NMR Spectroscopy* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2019 [cited 2021 Apr 1]. p. 253–91. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119382461.ch5>
146. Kunz N, Cudalbu C, Mlynarik V, Hüppi PS, Sizonenko SV, Gruetter R. Diffusion-weighted spectroscopy : a novel approach to determine macromolecule resonances in short-echo time 1H-MRS. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2010;64(4):939–46.
147. Lopez-Kolkovsky AL, Mériaux S, Boumezbear F. Metabolite and macromolecule T1 and T2 relaxation times in the rat brain in vivo at 17.2T. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2016;75(2):503–14.
148. Povasan M, Hangel G, Strasser B, Gruber S, Chmelik M, Trattnig S, et al. Mapping of brain macromolecules and their use for spectral processing of 1H MRSI data with an ultra-short acquisition delay at 7 T. *NeuroImage*. 2015;121:126–35.
149. Posse S, Cuenod CA, Le Bihan D. Human brain: proton diffusion MR spectroscopy. *Radiology*. 1993 Sep 1;188(3):719–25.
150. Pijnappel WWF, van den Boogaart A, de Beer R, van Ormondt D. SVD-based quantification of magnetic resonance signals. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*. 1992;97(1):122–34.
151. van den Boogaart A, van Ormondt D, Pijnappel WWF, de Beer R, Ala-Korpela M, McWhirter JG. Removal of the water resonance from 1H magnetic resonance spectra. In: *Mathematics in signal processing III*. Clarendon Press, Oxford. 1994. p. 175–95.
152. Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magnetic resonance in medicine*. 1993;30(6):672–9.
153. Provencher SW. Automatic quantification of localized in vivo 1H spectra with LCModel. *NMR in Biomedicine*. 2001;14(4):260–4.
154. Govindaraju V, Young K, Maudsley AA. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR in Biomedicine*. 2000;13:129–53.
155. Govindaraju V, Young K, Maudsley AA. Corrigendum: Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR in Biomedicine*. 2015;28:923–4.
156. Novikov DS, Kiselev VG, Jespersen SN. On modeling. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2018;79(6):3172–93.
157. Coelho S, Pozo JM, Jespersen SN, Jones DK, Frangi AF. Double Diffusion Encoding Prevents Degeneracy in Parameter Estimation of Biophysical Models in Diffusion MRI. 2018 Sep 13 [cited 2020 Apr 12]; Available from: <https://arxiv.org/abs/1809.05059v1>
158. Özarslan E, Basser PJ. Microscopic anisotropy revealed by NMR double pulsed field gradient experiments with arbitrary timing parameters. *The Journal of Chemical Physics*. 2008 Apr 21;128(15):154511.
159. Özarslan E. Compartment shape anisotropy (CSA) revealed by double pulsed field gradient MR. *Journal of Magnetic Resonance*. 2009 Jul 1;199(1):56–67.
160. Mitra PP. Multiple wave-vector extensions of the NMR pulsed-field-gradient spin-echo diffusion measurement. *Physical Review B*. 1995;51(21):15074.
161. Shemesh N, Rosenberg JT, Dumez J-N, Grant SC, Frydman L. Distinguishing neuronal from astrocytic subcellular microstructures using in vivo Double Diffusion Encoded 1H MRS at 21.1 T. *PLoS One*. 2017;12(10).
162. Callaghan PT. A Simple Matrix Formalism for Spin Echo Analysis of Restricted Diffusion under Generalized Gradient Waveforms. *Journal of Magnetic Resonance*. 1997 Nov 1;129(1):74–84.

163. Drobnyak I, Siow B, Alexander DC. Optimizing gradient waveforms for microstructure sensitivity in diffusion-weighted MR. *Journal of Magnetic Resonance*. 2010 Sep 1;206(1):41–51.
164. Drobnyak I, Zhang H, Hall MG, Alexander DC. The matrix formalism for generalised gradients with time-varying orientation in diffusion NMR. *Journal of Magnetic Resonance*. 2011 May 1;210(1):151–7.
165. İanuş A, Siow B, Drobnyak I, Zhang H, Alexander DC. Gaussian phase distribution approximations for oscillating gradient spin echo diffusion MRI. *Journal of Magnetic Resonance*. 2013 Feb 1;227:25–34.
166. Kroenke CD, Ackerman JHH, Yablonskiy DA. On the nature of the NAA diffusion attenuated MR signal in the central nervous system. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2004;52(5):1052–9.
167. Ronen I, Ercan E, Webb A. Axonal and glial microstructural information obtained with diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy at 7T. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. 2013;7(13).
168. Burcaw LM, Fieremans E, Novikov DS. Mesoscopic structure of neuronal tracts from time-dependent diffusion. *NeuroImage*. 2015;1(114):18–37.
169. Shemesh N. Axon diameters and myelin content modulate microscopic fractional anisotropy at short diffusion times in fixed rat spinal cord. *Frontiers in Physics*. 2018;6(49).
170. İanuş A, Jespersen SN, Serradas Duarte T, Alexander DC, Drobnyak I, Shemesh N. Accurate estimation of microscopic diffusion anisotropy and its time dependence in the mouse brain. *NeuroImage*. 2018;183:934–49.
171. Palombo M, Alexander DC, Zhang H. A generative model of realistic brain cells with application to numerical simulation of the diffusion-weighted MR signal. *NeuroImage*. 2019;188:391–402.
172. Cook PA, Bai Y, Nedjati-Gilani S, Seunarine KK, Hall MG, Parker GJ, et al. Camino: open-source diffusion-MRI reconstruction and processing. In: *Proc of the Int Soc of Mag Res in Medicine*. 2006. p. 2759.
173. Chvatal A, Anderova M, Kirchoff F. Three-dimensional confocal morphometry- a new approach for studying dynamic changes in cell morphology in brain slices. *Journal of Anatomy*. 2007;210(6):671–83.
174. Chklovskii DB, Schikorski T, Stevens CF. Wiring optimization in cortical circuits. *Neuron*. 2002;34:341–7.
175. Sherwood CC, Holloway RL, Erwin JM, Schleicher A, Zilles K, Hof PR. Cortical orofacial motor representation in Old World monkeys, great apes, and humans: I. Quantitative analysis of cytoarchitecture. *Brain, Behavior and Evolution*. 2004;63(2):61–81.
176. Brabec J, Lasic S, Nilsson M. Time-dependent diffusion in undulating thin fibers: impact on axon diameter estimation. *NMR in Biomedicine*. 2020;33(3).
177. Özarlan E, Yolcu C, Herberthson M, Knutsson H, Westin C-F. Influence of the size and curvedness of neural projections on the orientationally averaged diffusion MR signal. *Frontiers in Physics*. 2018;6(17).
178. Jespersen SN, Fieremans E, Novikov DS. Effective medium theory of multiple diffusion encoding. In: *Proc of the Int Soc of Mag Res in Medicine*. 2019.
179. Koch MA, Finsterbusch J. Compartment size estimation with double wave vector diffusion-weighted imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2008;52:1052–9.
180. Rensonnet G, Scherrer B, Girard G, Jankovski A, Warfield SK, Macq B, et al. Towards microstructure fingerprinting: estimation of tissue properties from a dictionary of Monte Carlo diffusion MRI simulations. *NeuroImage*. 184(964–980).
181. Skinner NP, Kurpad SN, Schmit BD, Muftuler LT, Budde MD. Rapid in vivo detection of rat spinal cord injury with double-diffusion-encoded magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2017;77(4):1639–49.
182. Dhital B, Reisert M, Kellner E, Kiselev VG. Intra-axonal diffusivity in brain white matter. *NeuroImage*. 2019;189:543–50.
183. Jespersen SN, Olesen JL, Hansen B, Shemesh N. Diffusion time dependence of microstructural parameters in fixed spinal cord. *NeuroImage*. 2018 Nov 15;182:329–42.

184. Dehghani M, Kunz N, Lanz B, Yoshihara HAI, Gruetter R. Diffusion-weighted MRS of acetate in the rat brain. *NMR in Biomedicine*. 2017;30(10):e3768.
185. Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, et al. Astrocyte-Neuron Lactate Transport Is Required for Long-Term Memory Formation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):810–23.
186. Hrabetova S, Cognet L, Rusakov DA, Nägerl UV. Unveiling the Extracellular Space of the Brain: From Super-resolved Microstructure to In Vivo Function. *J Neurosci*. 2018 Oct 31;38(44):9355–63.
187. Voříšek I, Syková E. Ischemia-Induced Changes in the Extracellular Space Diffusion Parameters, K<sup>+</sup>, and pH in the Developing Rat Cortex and Corpus Callosum. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997 Feb 1;17(2):191–203.
188. Syková E, Mazel T, Vargová L, Voříšek I, Prokopová-Kubinová Š. Extracellular space diffusion and pathological states. In: *Progress in Brain Research*. Elsevier; 2000. p. 155–78.
189. Levin V, Fenstermacher J, Patlak C. Sucrose and inulin space measurements of cerebral cortex in four mammalian species. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1970 Nov 1;219(5):1528–33.
190. Fenstermacher JD, Li C-L, Levin VA. Extracellular space of the cerebral cortex of normothermic and hypothermic cats. *Experimental Neurology*. 1970 Apr 1;27(1):101–14.
191. Fenstermacher J, Kaye T. Drug “Diffusion” within the Brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1988;531(1):29–39.
192. Nicholson C, Phillips JM. Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum. *The Journal of Physiology*. 1981;321(1):225–57.
193. Lundbæk JA, Hansen AJ. Brain interstitial volume fraction and tortuosity in anoxia. Evaluation of the ion-selective micro-electrode method. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1992 Dec 1;146(4):473–84.
194. Lehmenkühler A, Syková E, Svoboda J, Zilles K, Nicholson C. Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis. *Neuroscience*. 1993 Jul 1;55(2):339–51.
195. Voříšek I, Syková E. Evolution of Anisotropic Diffusion in the Developing Rat Corpus Callosum. *Journal of Neurophysiology*. 1997 Aug 1;78(2):912–9.
196. Perez-Pinzon MA, Tao L, Nicholson C. Extracellular potassium, volume fraction, and tortuosity in rat hippocampal CA1, CA3, and cortical slices during ischemia. *Journal of Neurophysiology*. 1995 Aug 1;74(2):565–73.
197. McBain CJ, Traynelis SF, Dingledine R. Regional variation of extracellular space in the hippocampus. *Science*. 1990 Aug 10;249(4969):674–7.
198. Nicholson C, Tao L. Hindered diffusion of high molecular weight compounds in brain extracellular microenvironment measured with integrative optical imaging. *Biophysical Journal*. 1993 Dec 1;65(6):2277–90.
199. Tønnesen J, Inavalli VVGK, Nägerl UV. Super-Resolution Imaging of the Extracellular Space in Living Brain Tissue. *Cell*. 2018 Feb 22;172(5):1108–1121.e15.
200. Magzoub M, Zhang H, Dix JA, Verkman AS. Extracellular Space Volume Measured by Two-Color Pulsed Dye Infusion with Microfiberoptic Fluorescence Photodetection. *Biophysical Journal*. 2009 Mar 18;96(6):2382–90.
201. Zhang H, Verkman AS. Microfiberoptic Measurement of Extracellular Space Volume in Brain and Tumor Slices Based on Fluorescent Dye Partitioning. *Biophysical Journal*. 2010 Aug 9;99(4):1284–91.
202. Zheng K, Jensen TP, Savtchenko LP, Levitt JA, Suhling K, Rusakov DA. Nanoscale diffusion in the synaptic cleft and beyond measured with time-resolved fluorescence anisotropy imaging. *Scientific Reports*. 2017 Feb 9;7(1):1–10.
203. Wolak DJ, Pizzo ME, Thorne RG. Probing the extracellular diffusion of antibodies in brain using in vivo integrative optical imaging and ex vivo fluorescence imaging. *Journal of Controlled Release*. 2015 Jan 10;197:78–86.
204. Paviolo C, Soria FN, Ferreira JS, Lee A, Groc L, Bezard E, et al. Nanoscale exploration of the extracellular space in the live brain by combining single carbon nanotube tracking and super-resolution imaging analysis. *Methods*. 2020 Mar 1;174:91–9.

205. Chen KC, Nicholson C. Changes in brain cell shape create residual extracellular space volume and explain tortuosity behavior during osmotic challenge. *PNAS*. 2000 Jul 18;97(15):8306–11.
206. Hrabě J, Hrabětová S, Segeth K. A Model of Effective Diffusion and Tortuosity in the Extracellular Space of the Brain. *Biophysical Journal*. 2004 Sep 1;87(3):1606–17.
207. Hrabětová S, Nicholson C. Contribution of dead-space microdomains to tortuosity of brain extracellular space. *Neurochemistry International*. 2004 Sep 1;45(4):467–77.
208. Tao A, Tao L, Nicholson C. Cell cavities increase tortuosity in brain extracellular space. *Journal of Theoretical Biology*. 2005 Jun 21;234(4):525–36.
209. Thorne RG, Lakkaraju A, Rodriguez-Boulan E, Nicholson C. In vivo diffusion of lactoferrin in brain extracellular space is regulated by interactions with heparan sulfate. *PNAS*. 2008 Jun 17;105(24):8416–21.
210. Duong TQ, Sehy JV, Yablonskiy DA, Snider BJ, Ackerman JJH, Neil JJ. Extracellular apparent diffusion in rat brain. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2001;45(5):801–10.
211. Quirk JD, Bretthorst GL, Duong TQ, Snyder AZ, Springer CS, Ackerman JJH, et al. Equilibrium water exchange between the intra- and extracellular spaces of mammalian brain. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2003;50(3):493–9.
212. Goodman JA, Kroenke CD, Bretthorst GL, Ackerman JJH, Neil JJ. Sodium ion apparent diffusion coefficient in living rat brain. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2005;53(5):1040–5.
213. Reed RA, Mattai J, Shipley GG. Interaction of cholera toxin with ganglioside GM1 receptors in supported lipid monolayers [Internet]. American Chemical Society; 2002 [cited 2020 Jul 21]. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00377a025>
214. Nicholson C, Kamali-Zare P, Tao L. Brain extracellular space as a diffusion barrier. *Comput Visual Sci*. 2011 Oct 1;14(7):309–25.
215. Shemesh N, Özarlan E, Komlosh ME, Bassar PJ, Cohen Y. From single-pulsed field gradient to double-pulsed field gradient MR: gleaned new microstructural information and developing new forms of contrast in MRI. *NMR in Biomedicine*. 2010;23(7):757–80.
216. Vincent M, Palombo M, Valette J. Revisiting double diffusion encoding MRS in the mouse brain at 11.7T: Which microstructural features are we sensitive to? *NeuroImage*. 2020 Feb 15;207:116399.
217. Schmid F, Barrett MJP, Jenny P, Weber B. Vascular density and distribution in neocortex. *NeuroImage*. 2019 Aug 15;197:792–805.
218. Sweeney MD, Kisler K, Montagne A, Toga AW, Zlokovic BV. The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. *Nature Neuroscience*. 2018 Oct;21(10):1318–31.
219. Iadecola C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*. 2017 Sep 27;96(1):17–42.
220. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid  $\beta$ . *Science Translational Medicine*. 2012 Aug 15;4(147):147ra111–147ra111.
221. Iliff JJ, Wang M, Zeppenfeld DM, Venkataraman A, Plog BA, Liao Y, et al. Cerebral Arterial Pulsation Drives Paravascular CSF–Interstitial Fluid Exchange in the Murine Brain. *J Neurosci*. 2013 Nov 13;33(46):18190–9.
222. Jessen NA, Munk ASF, Lundgaard I, Nedergaard M. The Glymphatic System: A Beginner’s Guide. *Neurochem Res*. 2015 Dec 1;40(12):2583–99.
223. Verheggen ICM, Van Boxtel MPJ, Verhey FRJ, Jansen JFA, Backes WH. Interaction between blood-brain barrier and glymphatic system in solute clearance. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2018 Jul 1;90:26–33.
224. Plog BA, Nedergaard M. The Glymphatic System in Central Nervous System Health and Disease: Past, Present, and Future. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2018;13(1):379–94.

225. Bak LK, Walls AB. Rebuttal from Lasse K. Bak and Anne B. Walls. *The Journal of Physiology*. 2018;596(3):357–357.
226. Ray L, Iliff JJ, Heys JJ. Analysis of convective and diffusive transport in the brain interstitium. *Fluids and Barriers of the CNS*. 2019 Mar 6;16(1):6.
227. Hladky SB, Barrand MA. Is solute movement within the extracellular spaces of brain gray matter brought about primarily by diffusion or flow? A commentary on “Analysis of convective and diffusive transport in the brain interstitium” *Fluids and Barriers of the CNS* (2019) 16:6 by L. Ray, J.J. Iliff and J.J. Heys. *Fluids Barriers CNS*. 2019 Jul 12;16(1):24.
228. Ray L, Iliff JJ, Heys JJ. In response to “Is solute movement within the extracellular spaces of brain gray matter brought about primarily by diffusion or flow?” *Fluids and Barriers of the CNS*. 2019 Jul 12;16(1):23.
229. Hirschler L, Runderkamp BA, Franklin SL, van Harten T, Nederveen A, Caan MW, et al. The driving force of glymphatics: influence of the cardiac cycle on CSF-mobility in perivascular spaces in humans. In: *Proc of the Int Soc of Mag Res in Medicine*. 2020.
230. Seppehrband F, Barisano G, Sheikh-Bahaei N, Cabeen RP, Choupan J, Law M, et al. Image processing approaches to enhance perivascular space visibility and quantification using MRI. *Scientific Reports*. 2019;9(12351).
231. Seppehrband F, Ma S, Choupan J, Liew S-L, Toga AW. Mesoscopic imaging of perivascular spaces at 7T. In: *Proc of the Int Soc of Mag Res in Medicine*. 2020.
232. Seppehrband F. Perivascular space fluid contribute to diffusion signal attenuation at low b-value, revisiting extracellular space diffusion. In: *Proc of the Int Soc of Mag Res in Medicine*. 2020.
233. Pepin J. Développement de l'imagerie métabolique par IRM-CEST : application à la maladie de Huntington [Internet] [Theses]. Université Paris Saclay (COMUE); 2018 [cited 2021 Mar 2]. Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01740330>
234. Zaiss M, Bachert P. Chemical exchange saturation transfer (CEST) and MRZ-spectroscopy in vivo: a review of theoretical approaches and methods. *Phys Med Biol*. 2013 Nov;58(22):R221–69.
235. McConnell HM. Reaction Rates by Nuclear Magnetic Resonance. *J Chem Phys*. 1958 Mar 1;28(3):430–1.
236. Woessner DE, Zhang S, Merritt ME, Sherry AD. Numerical solution of the Bloch equations provides insights into the optimum design of PARACEST agents for MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2005;53(4):790–9.
237. Novikov DS, Fieremans E, Jespersen SN, Kiselev VG. Quantifying brain microstructure with diffusion MRI: Theory and parameter estimation. *NMR in Biomedicine*. 2019 Apr 1;32(4):e3998.
238. Silva MD, Omae T, Helmer KG, Li F, Fisher M, Sotak CH. Separating changes in the intra- and extracellular water apparent diffusion coefficient following focal cerebral ischemia in the rat brain. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2002;48(5):826–37.
239. Quirk JD, Bretthorst GL, Duong TQ, Snyder AZ, Springer CS, Ackerman JJH, et al. Equilibrium water exchange between the intra- and extracellular spaces of mammalian brain. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2003;50(3):493–9.
240. Cai K, Haris M, Singh A, Kogan F, Greenberg JH, Hariharan H, et al. Magnetic resonance imaging of glutamate. *Nature Medicine*. 2012 Feb;18(2):302–6.
241. Topgaard D. Director orientations in lyotropic liquid crystals: diffusion MRI mapping of the Saupe order tensor. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2016;18(12):8545–53.
242. Jelescu IO, Novikov DS. Water exchange time between gray matter compartments in vivo. In: *Proceedings of the International Society of Magnetic Resonance in Medicine Conference*. 2020.
243. Zhou J, Lal B, Wilson DA, Larterra J, van Zijl PCM. Amide proton transfer (APT) contrast for imaging of brain tumors. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2003 Dec 1;50(6):1120–6.
244. Zhou J, Payen J-F, Wilson DA, Traystman RJ, van Zijl PCM. Using the amide proton signals of intracellular proteins and peptides to detect pH effects in MRI. *Nature Medicine*. 2003 Aug;9(8):1085–90.

245. van Zijl PCM, Lam WW, Xu J, Knutsson L, Stanisz GJ. Magnetization Transfer Contrast and Chemical Exchange Saturation Transfer MRI. Features and analysis of the field-dependent saturation spectrum. *NeuroImage*. 2018 Mar 1;168:222–41.
246. Liu D, Zhou J, Xue R, Zuo Z, An J, Wang DJJ. Quantitative characterization of nuclear overhauser enhancement and amide proton transfer effects in the human brain at 7 tesla. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2013;70(4):1070–81.
247. Mougín O, Clemence M, Peters A, Pitiot A, Gowland P. High-resolution imaging of magnetisation transfer and nuclear Overhauser effect in the human visual cortex at 7 T. *NMR in Biomedicine*. 2013;26(11):1508–17.
248. Jin T, Wang P, Zong X, Kim S-G. MR imaging of the amide-proton transfer effect and the pH-insensitive nuclear overhauser effect at 9.4 T. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2013 Mar 1;69(3):760–70.
249. Ahn CB, Kim JH, Cho ZH. High-Speed Spiral-Scan Echo Planar NMR Imaging-I. *IEEE Transactions on Medical Imaging*. 1986 Mar;5(1):2–7.
250. Delattre BMA, Heidemann RM, Crowe LA, Vallée J-P, Hyacinthe J-N. Spiral demystified. *Magnetic Resonance Imaging*. 2010 Jul 1;28(6):862–81.
251. Lee Y, Wilm BJ, Brunner DO, Gross S, Schmid T, Nagy Z, et al. On the signal-to-noise ratio benefit of spiral acquisition in diffusion MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2021;85(4):1924–37.
252. Veraart J, Novikov DS, Christiaens D, Ades-aron B, Sijbers J, Fieremans E. Denoising of diffusion MRI using random matrix theory. *NeuroImage*. 2016 Nov 15;142:394–406.
253. Kingsley PB. Introduction to diffusion tensor imaging mathematics: Part III. Tensor calculation, noise, simulations, and optimization. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*. 2006;28A(2):155–79.
254. Tsai C-M, Nishimura DG. Reduced aliasing artifacts using variable-density k-space sampling trajectories. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2000;43(3):452–8.
255. Liu C, Bammer R, Kim D, Moseley ME. Self-navigated interleaved spiral (SNAILS): Application to high-resolution diffusion tensor imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2004;52(6):1388–96.
256. Le Page LM, Guglielmetti C, Taglang C, Chaumeil MM. Imaging Brain Metabolism Using Hyperpolarized <sup>13</sup>C Magnetic Resonance Spectroscopy. *Trends in Neurosciences*. 2020 May 1;43(5):343–54.



**Titre : Nouveaux outils de RMN pondérée en diffusion pour la caractérisation des différents compartiments tissulaires dans le cerveau de rongeur *in vivo***

**Mots clés :** Spectroscopie RMN *in vivo*, Diffusion, Microstructure, Espace Extracellulaire, Lactate

**Résumé :** Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par des altérations de la microstructure cellulaire (hypertrophie astrocytaire, atrophie neuronale) ainsi que du métabolisme cérébral. Le signal RMN pondéré en diffusion reflète l'environnement exploré localement à l'échelle microscopique par un ensemble de molécules, constituant ainsi un outil de mesure non-invasif de la microstructure cérébrale. L'imagerie de diffusion de l'eau s'est donc imposée comme une approche prometteuse pour mieux comprendre et diagnostiquer les pathologies neurodégénératives. En outre, des mesures de spectroscopie pondérée en diffusion pourraient aider à clarifier la distribution au sein des différents types cellulaires de métabolites impliqués dans le métabolisme cérébral, tels que le lactate. Dans le contexte de l'hypothèse de la navette astrocyte-neurone, cette information est en effet cruciale afin d'éclaircir le rôle métabolique de ces molécules en conditions saine et pathologique. Cependant, l'analyse des données de diffusion de l'eau en terme de microstructure, ou bien des données de diffusion du lactate en termes de distribution cellulaire, suppose d'une part la connaissance précise des propriétés de diffusion au sein des différents compartiments tissulaires, en particulier les compartiments intracellulaires (ICS) et extracellulaire (ECS), et d'autre part que ces propriétés soient suffisamment différentes entre ces compartiments, afin de les discriminer. Par exemple, la diffusion est-elle plus rapide dans l'ECS ou l'ICS ? La diffusion dans l'ECS est-elle libre ou bien est-on au contraire sensible à des phénomènes de restriction et de tortuosité ?

Le but de ce travail de thèse est de répondre en partie à ces questions. Dans un premier temps, nous étudions la sensibilité de la spectroscopie RMN à double encodage en diffusion (DDE) aux différents aspects de la microstructure cellulaire, montrant ainsi que le « signal » DDE des métabolites endogènes purement intracellulaire reflète non seulement la diffusion dans des prolongements cellulaire fibreux, mais aussi vraisemblablement la présence d'embranchements de ces prolongements cellulaires. Dans un second temps, nous caractérisons les propriétés de diffusion du sucrose, un marqueur exogène injecté dans l'ECS, grâce à des outils de spectroscopie RMN pondérée en diffusion permettant de collecter des informations complémentaires telles que le coefficient de diffusion apparent, la tortuosité, la restriction et l'anisotropie microscopique. Les mesures DDE se révèlent particulièrement à même de discriminer l'ECS et l'ICS. Enfin, nous explorons le potentiel d'une approche originale utilisant le transfert de saturation par échange chimique (CEST) afin de filtrer la contribution de l'ICS lors des mesures de diffusion. Pour conclure, nous évoquons comment des expériences de  $^{13}\text{C}$  hyperpolarisé pourraient permettre d'affiner la connaissance des propriétés de diffusion du lactate dans les différents compartiments.

**Title : Novel diffusion-weighted NMR tools for the characterization of tissue compartments in the rodent brain *in vivo***

**Keywords :** In vivo NMR spectroscopy, Diffusion, Microstructure, Extracellular Space, Lactate

**Abstract :** Neurodegenerative diseases lead to alterations in both cell microstructure (astrocytic hypertrophy, neuronal atrophy) and brain metabolism. The diffusion-weighted NMR signal reflects the environment locally explored by an ensemble of molecules at a microscopic scale, thus allowing to non-invasively probe brain microstructure. Diffusion imaging of water is therefore a promising method to better understand and diagnose neurodegenerative diseases. Besides, diffusion-weighted NMR spectroscopy could help clarifying the biodistribution within cell types of key molecules involved in brain metabolism, such as lactate. In the framework of the astrocyte-to-neuron lactate shuttle hypothesis, this information could indeed be crucial to elucidate the metabolic role of these molecules in both healthy and pathological conditions. The analysis of water diffusion data in terms of microstructure, or lactate diffusion data in terms of cell type distribution, however requires a precise knowledge of the diffusion properties within the different tissue compartments, in particular within the intracellular space (ICS) and the extracellular space (ECS). For example, is diffusion faster in ECS or ICS? Can diffusion in ECS be considered as free or is it sensitive to restriction and/or tortuosity?

The goal of this work is to partly answer those questions. First, we study the sensitivity of double diffusion encoding (DDE) experiments to several features of cell microstructure, showing that the DDE signal of intracellular metabolites not only reflect diffusion in cell fibers, but also the presence of branching along those fibers. We then characterize the diffusion properties of sucrose, an exogenous marker of the ECS, using complementary diffusion-weighted NMR tools. These measurements allow us to capture several aspects of the ECS microstructure such as the apparent diffusion coefficient, tortuosity, restriction and microscopic anisotropy. Lastly, we explore the potential of an original approach using chemical exchange saturation transfer (CEST) to filter out the ICS contribution during water diffusion measurements. We conclude by mentioning how hyperpolarized  $^{13}\text{C}$  experiments could allow us to better characterize lactate diffusion properties within the different compartments.