



HAL
open science

Micro-antennes RMN implantables pour la spectroscopie et l'imagerie métabolique

Justine Deborne

► **To cite this version:**

Justine Deborne. Micro-antennes RMN implantables pour la spectroscopie et l'imagerie métabolique. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2022. Français. NNT : 2022BORD0256 . tel-03875872

HAL Id: tel-03875872

<https://theses.hal.science/tel-03875872>

Submitted on 28 Nov 2022

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ : BIO-IMAGERIE

Par **Justine Deborne**

**Micro-antennes RMN implantables pour
la spectroscopie et l'imagerie métabolique**

Sous la direction de : **Yannick Crémillieux**

Soutenue le 3 octobre 2022

Membres du jury :

Yannick CREMILLIEUX	Directeur de thèse
Directeur de recherche, ISM - CNRS UMR 5255, Université de Bordeaux	
Luisa CIOBANU	Présidente
Directrice de recherche, NeuroSpin - CEA/CNRS UMR 9027, Université de Paris-Saclay	
Florence FAUVELLE	Rapporteuse
Directrice de recherche, GIN - INSERM U1216, Université de Grenoble Alpes	
Jean-Christophe GINEFRI	Rapporteur
Maître de conférences, BioMaps - INSERM/CNRS/CEA UMR 9011, Université de Paris-Saclay	
Nicolau BECKMANN	Examineur
Directeur de recherche, Novartis Institutes for BioMedical Research, Bâle	
Bruno QUESSON	Examineur
Directeur de recherche, IHU Liryc - INSERM/CNRS U1045, Université de Bordeaux	
Philippe DE DEURWAERDERE	Invité
Professeur des universités, INCIA - CNRS UMR 5287, Université de Bordeaux	

Remerciements

Parce qu'une thèse ne se fait et ne se réussit jamais seule, je remercie, de tout mon coeur, toutes les personnes qui ont fait partie de ma vie professionnelle et personnelle durant ces trois belles années.

Je tiens, tout d'abord, à remercier mon directeur de thèse, **Yannick Crémillieux**. Merci infiniment de m'avoir offert la possibilité de réaliser ces travaux de recherche et pour ces trois années passées ensemble! Tu as été un excellent « boss » et encadrant! Merci d'avoir toujours été très disponible et de m'avoir toujours encouragée à publier et à aller aux congrès pour présenter nos jolis résultats! Merci aussi de m'avoir impliquée dans tes différents projets. J'ai beaucoup appris à tes côtés!

Je te remercie aussi pour tous les très bons moments passés hors du laboratoire, en particulier, les dîners d'équipe à chaque veille de vacances et toujours accompagnés de chouettes activités! Merci pour tout!

Je remercie sincèrement mes rapporteurs, **Florence Fauvelle** et **Jean-Christophe Ginefri**, pour leurs précieux retours sur mon manuscrit et le grand intérêt porté à mes travaux de thèse. Merci également à **Luisa Ciobanu**, **Nicolau Beckmann** et **Bruno Quesson** d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Tous nos échanges ont été très enrichissants et m'ont permis de prendre davantage de recul sur mes travaux. Merci beaucoup à **Philippe De Deurwaeredere** pour sa présence tout au long de ma thèse, tu as été un très bon tuteur de l'ED!

Un très grand merci à toi, **Noël**, d'avoir été un si bon binôme tout au long de ma thèse, je n'aurais pas pu espérer mieux! Tu m'as initié à la construction des micro-antennes implantables, aux manips et à la chirurgie mais aussi à la cristallographie et à la RMN (mais pas encore à la photographie...)! Merci pour ta motivation sans faille, ta patience (et oui, tu en as beaucoup!), ta gentillesse et bienveillance et ton énorme créativité qui m'impressionnera pour toujours. Tu es l'exemple parfait du célèbre proverbe « Quand on veut, on peut! », alors merci beaucoup pour tout ce que tu as pu m'apprendre tant sur le plan professionnel que personnel!

Audrey, tu as été bien plus qu'une super camarade de bureau! J'ai adoré partagé ce quotidien avec toi pendant plus d'un an et demi et ta présence a grandement contribué à la réussite de ma thèse. Nos bavardages sur tout et rien (mais, quand même, surtout sur nos petites boules de poils), nos pauses déjeuners ultra rapides et le partage de nos projets respectifs vont beaucoup me manquer! Je te souhaite une très belle thèse dans la meilleure équipe qui soit et n'oublie pas de m'envoyer mon carton d'invitation à ta

soutenance! Une pensée à la meilleure des stagiaires, **Léa**!

Tout au long de ma thèse, j'ai eu le plaisir de rencontrer et de travailler avec quelques personnes du Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques (RMSB) de Bordeaux.

Merci beaucoup à toi, **Véronique**, de nous avoir toujours préparé des cellules tumorales de très bonne qualité! Merci aussi pour ta grande gentillesse et bienveillance, j'ai été ravie de te rencontrer! **Marc** et **Philippe**, je vous remercie pour avoir toujours été très réactifs pour les petits et plus gros problèmes de l'IRM et pour toute l'organisation des créneaux. Sans vous, pas de manips, alors merci beaucoup! Merci à toi, **Stéphane**, de prendre si bien soin des pensionnaires de l'animalerie et pour tes conseils concernant la chirurgie et les soins apportés aux animaux. Une pensée toute particulière à toi, **Emeline**, tu es tellement motivante et inspirante! Merci beaucoup pour ta gentillesse et tes attentions toutes les fois où nous nous sommes croisées!

Je remercie aussi **Alan Wong** et **Fawzi Boumezbeur**, mes collaborateurs du NIMBE et de NeuroSpin, pour leurs aides et leurs conseils tout au long de ma thèse!

Il m'est impossible de ne pas penser à mes anciens encadrants de mes stages de fin d'études et de M2 qui m'ont si bien fait découvrir le monde de la recherche clinique et préclinique en IRM. Merci à vous, **Wafaa** et **Arnaud** (CRMBM - Marseille) et **Emmanuel** et **Jean-Christophe** (GIN - Grenoble) pour ces deux très belles expériences que je n'ai pas oubliées. C'est en grande partie grâce à vous que j'ai eu l'envie de poursuivre en thèse dans ce domaine!

Je voudrais, maintenant, remercier tous mes amis qui m'ont soutenue pendant cette thèse.

Amélie, un grand merci pour ta présence très solaire qui m'entoure depuis notre « vraie » rencontre à Grenoble! Merci beaucoup pour toutes les bonnes ondes et bons conseils que tu m'as envoyés pendant ces trois années! Merci beaucoup à toi aussi, **Samir**, le meilleur des Tapi! Très pressée de fêter vos deux soutenance et d'élire le plus beau couple de PhDs qui puisse exister! **Bassim**, merci beaucoup pour ton soutien! Hâte de venir enfin te rendre visite à Chambéry! **Hajar**, Bordeaux-Lyon, la fameuse transversale impraticable et encore plus en période de coronavirus et de rédaction... Merci mille fois pour ta présence au quotidien, pour nos vidéos et appels réconfortants et pour ton soutien indéfectible! Cela m'a réellement porté pendant ces trois années! Merci infiniment à toi aussi, **Khalid**, pour ta présence et ton soutien (et pour avoir été un reporter de choc le jour de ma soutenance)! **Maxime**, je n'oublierai pas le McDo du Bouscat, lieu favori de nos retrouvailles bordelaises! Merci beaucoup pour ton soutien et tes nombreux conseils! A défaut d'avoir raté ma soutenance (merci corona...), il te reste à lire ce beau petit manuscrit « de poche »! **Megane**, un grand merci à toi d'avoir toujours été là! Je suis si

fière de nous deux et de nos parcours depuis Marseille, deux belles doctresses! Merci à **Nafie**, à **Solène** et à **Xavier** pour ces très bons moments passés tous ensemble (dernier en date : l'excellente fondue (avec un peu trop de champagne...) pour fêter ma soutenance)! **Raïssa**, merci infiniment pour tous les conseils que tu m'as donné et que tu me donnes à chaque fois que j'en ai besoin! Tu es un véritable exemple de réussite et j'ai hâte d'être ta future collègue physicienne médicale! Et qui sait, peut-être qu'un jour, nous finirons par réellement monter notre entreprise... **Wafae**, je ne te remercierai jamais assez pour ton immense soutien au quotidien (et pour le coup, on peut vraiment parler de quotidien, très très rares ont été les journées où nous nous sommes pas parlées) depuis notre rencontre en stage! Merci de m'avoir fait découvrir la belle ville rose de Toulouse et j'ai hâte de venir m'y installer! Merci infiniment! Une grosse pensée à **Hanae**, à **Azeddine** et à **Diop**, ton si bel entourage que j'adore! Je pense très fort à mon quatuor de l'Ardèche : **Chloé**, **Gwendoline**, **Laurie** et **Ludivine**, mes copines de longues dates. Merci d'être à mes côtés depuis toutes ces années! J'espère de tout coeur que nous pourrons rattraper les longues périodes sans s'être vues.

Le meilleur pour la fin...

Maman, Papa, je vous rejoins enfin dans la team des Docteurs (on ne débattrà pas sur les différences entre une thèse de pharma et une thèse de sciences ahah!). Merci infiniment pour vos encouragements et votre soutien durant toutes ces années d'études et ce n'est pas encore tout à fait fini... mais promis, elles seront terminées avant votre retraite (enfin, normalement...)! Merci à toi, **Thomas**, pour ton soutien et pour m'avoir toujours poussé à faire de mon mieux! Vous m'avez offert, pendant cette thèse, le plus beau des cadeaux avec **Laure** (la meilleure des belles-soeurettes), un merveilleux neveu et filleul! Mon **Marin** chéri, j'espère que tu seras très fière de ta tata quand tu découvriras, dans quelques années (et oui, tu dois encore apprendre à lire), ce manuscrit! Je pense très très fort à mes grands-parents (**grand-mère et grand-père, mamie et papy**)!

Juju

Table des matières

Liste des figures	12
Liste des tableaux	13
Chapitre 1 Introduction générale	15
1.1 Contexte et objectifs	15
1.2 Organisation de la thèse	17
Chapitre 2 État de l'art	19
2.1 La résonance magnétique nucléaire (RMN)	19
2.1.1 Principes de base en RMN	19
2.1.1.1 Moment magnétique de spin	19
2.1.1.2 Aimantation macroscopique et champ magnétique statique \vec{B}_0	20
2.1.1.3 Excitation : phénomène de résonance	21
2.1.1.4 Équations de Bloch et relaxations longitudinale et transversale	22
2.1.1.5 Détection du signal RMN	24
2.1.2 L'imagerie par résonance magnétique (IRM)	25
2.1.2.1 Codage spatial 2D du signal	25
2.1.2.2 Reconstruction de l'image	27
2.1.2.3 Séquences conventionnelles	28
2.1.3 La spectroscopie par résonance magnétique (SRM)	30
2.1.3.1 Déplacement chimique et couplage spin-spin	31
2.1.3.2 Spectroscopie localisée et suppression du signal de l'eau	32
2.1.3.3 Métabolites d'intérêt en SRM ^1H	35
2.2 L'antenne radiofréquence (RF)	41
2.2.1 Paramètres caractéristiques	42
2.2.1.1 Modélisation électrique	42
2.2.1.2 Fréquence de résonance, accord et adaptation	44
2.2.1.3 Facteur de qualité	46
2.2.1.4 Facteur de remplissage	47
2.2.1.5 Sensibilité et volume de détection RF	47
2.2.2 Bruit de l'antenne et pertes durant la détection	47
2.2.2.1 Pertes propres dans l'antenne	48

2.2.2.2	Pertes diélectriques et magnétiques dans l'échantillon . . .	48
2.2.2.3	Définition du rapport signal-sur-bruit	49
2.2.2.4	Domaines de prédominance du bruit de l'antenne et de l'échantillon	50
2.3	Micro-imagerie et micro-spectroscopie des faibles volumes	52
2.3.1	Intérêt et enjeux	52
2.3.2	Micro-antennes existantes pour l'IRM et la SRM	53
2.3.2.1	Micro-solénoïdes	53
2.3.2.2	Micro-antennes planaires	59
2.3.2.3	Aiguilles implantables	63
2.3.2.4	Micro-antennes implantables sans fil	66
2.3.2.5	Micro-antennes monolithiques auto-résonantes	69
2.4	Méthodes d'injection intracérébrale	73
2.4.1	Microdialyse cérébrale	73
2.4.1.1	Fonctionnement et microdialyse inverse	73
2.4.1.2	Applications précliniques et cliniques de la microdialyse inverse	76
2.4.2	Autres méthodes d'injection intracérébrale	79

Chapitre 3 Conception et réalisation des micro-antennes RMN implantables 83

3.1	Modèle des micro-antennes RMN implantables	83
3.1.1	Cahier des charges	83
3.1.1.1	Contraintes géométriques et de performances électromagnétiques	84
3.1.1.2	Compatibilité avec l'environnement IRM	85
3.1.2	Modèle en forme de boucle	85
3.2	Processus de fabrication	86
3.2.1	Boucle résonante	86
3.2.2	Circuit d'accord et d'adaptation	87
3.2.3	Circuit final et complet des micro-antennes RMN implantables . . .	87
3.3	Modélisation électromagnétique par éléments finis	88
3.3.1	Logiciel COMSOL Multiphysics®	88
3.3.2	Géométrie et maillage des micro-antennes RMN implantables	89
3.3.3	Conditions physiques et conditions aux limites	93
3.3.4	Résultats des simulations électromagnétiques	95
3.3.4.1	Micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 µm . . .	95
3.3.4.2	Micro-antenne « loop » ayant une largeur de 700 µm . . .	99
3.4	Caractérisations électromagnétiques...	103

3.4.1	... par un analyseur de réseau vectoriel	103
3.4.2	... par des expériences <i>in vitro</i>	105
3.4.2.1	Estimations des volumes de détection par IRM	105
3.4.2.2	Comparaisons entre les micro-antennes RMN implantables et une antenne conventionnelle externe	108
3.5	Synthèse du chapitre	117

**Chapitre 4 Caractérisation cérébrale saine et tumorale chez le rat :
application *in vivo* des micro-antennes RMN implantables** **119**

4.1	Contexte	119
4.2	Matériel et méthodes	120
4.2.1	Cohorte d'animaux	120
4.2.1.1	Modèle du gliome C6	121
4.2.1.2	Injection des cellules C6 par chirurgie stéréotaxique	122
4.2.1.3	Suivi de la croissance tumorale	123
4.2.2	Protocole d'implantation des micro-antennes RMN	124
4.2.2.1	Conception des canules	124
4.2.2.2	Pose de la canule par chirurgie stéréotaxique	125
4.2.3	Protocole d'IRM et de SRM	127
4.2.4	Traitement des données spectroscopiques	129
4.2.4.1	Étape de pré-traitements	129
4.2.4.2	Étape d'identification et de quantification spectrales	132
4.3	Résultats et discussion	136
4.3.1	Expériences spectroscopiques sur des cerveaux d'animaux sains	136
4.3.2	Différenciations métaboliques et morphologiques entre le tissu céré- bral sain et le tissu cérébral tumoral	143
4.4	Conclusion et perspectives	153

**Chapitre 5 Micro-antenne RMN implantable couplée à un moyen d'ad-
ministration d'un composé d'intérêt : outil de détection et de l'évaluation
de l'efficacité thérapeutique de molécules anticancéreuses dans un modèle
de tumeurs cérébrales chez le rat** **155**

5.1	Contexte	155
5.2	Matériel et méthodes	158
5.2.1	Conception de l'outil combinant une micro-antenne RMN implan- table et un capillaire d'injection	158
5.2.2	Analyses préliminaires	159
5.2.2.1	Expériences <i>in vitro</i>	159
5.2.2.2	Expériences <i>in vivo</i> sur des cerveaux d'animaux sains	160

5.2.3	Expériences <i>in vivo</i> sur des cerveaux d'animaux porteurs d'un gliome C6	162
5.2.3.1	Métabolisme de la choline et pathologies cancéreuses	162
5.2.3.2	Inhibiteurs de la choline kinase α	163
5.2.4	Protocole expérimental <i>in vivo</i>	166
5.3	Résultats et discussion	167
5.3.1	Analyses préliminaires	167
5.3.1.1	Expériences <i>in vitro</i>	167
5.3.1.2	Expériences <i>in vivo</i> sur des cerveaux d'animaux sains	174
5.3.2	Expériences <i>in vivo</i> sur des cerveaux d'animaux porteurs d'un gliome C6	179
5.3.2.1	Détection et évaluation de l'efficacité thérapeutique de la molécule MN58b	179
5.3.2.2	Détection et évaluation de l'efficacité thérapeutique de la molécule RSM-932A	185
5.4	Conclusion et perspectives	190
Chapitre 6	Conclusion générale et perspectives	195
6.1	Conclusion générale	195
6.2	Perspectives	198
 Bibliographie		
 Annexes		
		I
 Publications et communications		
		I
 <i>Curriculum vitae</i>		
		II
 Résumé / Abstract		
		V

Nomenclature

Ala	Alanine
ARM	Angiographie par Résonance Magnétique
Asp	Aspartate
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
CED	Convection-Enhanced Delivery
CHESS	CHEmical Shift Selective
CHK	CHoline Kinase
Cho	Choline
CRLB	Cramér-Rao Lower Bounds
Cr	Créatine
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DNP	Dynamic Nuclear Polarization
EEG	ÉlectroEncéphaloGraphie
FEM	Finite Element Method
FID	Free Induction Decay
FLASH	Fast Low Angle SHot
FOG	Factor Of Gain
FOV	Field Of View
FWHM	Full Width at Half Maximum
GABA	Acide γ -aminobutyrique
Gd	Gadolinium
Glc	Glucose

Gln	Glutamine
Glu	Glutamate
GPC	GlycéroPhosphorylCholine
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
jMRUI	java-based MR User Interface
Lac	Lactate
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LNA	Low-Noise preAmplifier
LOD	Limit Of Detection
MIP	Maximal Intensity Projection
mI	myo-Inositol
MM	MacroMolécules
NAAG	N-AcétylAspartylGlutamate
NAA	N-AcétylAspartate
PCho	PhosphorylCholine
PCr	PhosphoCréatine
PRESS	Point RESolved Spectroscopy
QUEST	QUantum ESTimation
RARE	Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement
RF	RadioFréquence
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RSB	Rapport Signal-sur-Bruit
SRM	Spectroscopie par Résonance Magnétique
STEAM	Stimulated Echo Acquisition Mode
Tau	Taurine

tCho	Choline totale
tCr	Créatine totale
TE	Temps d'Écho
tNAA	NAA total
TR	Temps de Répétition
VAPOR	VARIABLE Pulse power and Optimized Relaxation delays
VNA	Vector Network Analyzer
ZTE	Zero Echo Time

Liste des figures

2.1	Spin et moment magnétique μ	20
2.2	Orientations des spins	21
2.3	Phénomène de RMN en quatre étapes : état d'équilibre, polarisation, excitation et relaxation.	22
2.4	Retour à l'équilibre des composantes longitudinale \vec{M}_z et transversale \vec{M}_{xy}	23
2.5	Détection du signal d'induction libre (FID) par l'antenne de détection RF placée dans un plan orthogonal à \vec{B}_0	24
2.6	Principe de la sélection de coupe.	26
2.7	Reconstruction de l'image à partir de l'espace K.	27
2.8	Chronogramme des événements d'une séquence d'écho de spin.	29
2.9	Chronogramme des événements d'une séquence d'écho de gradient.	29
2.10	Images IRM <i>in vivo</i> de coupes coronales d'un cerveau de rat.	30
2.11	Spectre RMN ^1H simulé du lactate.	32
2.12	Principe de la spectroscopie mono-voxel.	32
2.13	Principe de la séquence PRESS.	33
2.14	Principe de la séquence STEAM.	34
2.15	Intérêt de la suppression du signal de l'eau.	35
2.16	Spectre RMN ^1H <i>in vivo</i> du cerveau de rat sain.	35
2.17	Détection et suppression des résonances des macromolécules dans un spectre RMN ^1H <i>in vivo</i> du cerveau de rat.	41
2.18	Géométrie de base d'une antenne de détection RF avec un circuit RLC.	43
2.19	Schéma électronique du couplage inductif entre une boucle de couplage et une antenne RF.	45
2.20	Circuits électroniques d'une antenne de détection RF avec l'accord et l'adaptation par couplage capacitif.	45
2.21	Domaines de prédominance du bruit de l'échantillon et de l'antenne en fonction de la température de fonctionnement de l'antenne, de la taille de l'antenne et de la fréquence de résonance.	51
2.22	Micro-solénoïde de section circulaire entourant un capillaire en silice fondue revêtu de polyimide.	54
2.23	Montage expérimental de l'association d'une membrane de microdialyse cérébrale et d'un micro-solénoïde pour l'analyse du dialysat chez le rat.	55
2.24	Schéma de la micro-antenne solénoïdale implantable.	56

2.25	Dispositif comprenant deux solénoïdes de phase opposée, de taille géométrique et de motifs d'enroulements identiques.	56
2.26	Image IRM <i>in situ</i> de l'aorte abdominale de porc obtenue avec le dispositif composé de deux micro-solénoïdes montés sur un cathéter angiographique.	57
2.27	Exemple de micro-solénoïde développé pour des applications intratissulaires.	58
2.28	Micro-solénoïde de section rectangulaire et IRM à haute-résolution.	58
2.29	Schéma d'un exemple de configuration d'une micro-antenne planaire multi-tours.	60
2.30	Micro-antenne planaire intégrée sur un substrat de verre avec un canal microfluidique permettant le positionnement de l'échantillon.	61
2.31	Image obtenue par microscopie électronique à balayage d'une micro-antenne planaire.	61
2.32	Image IRM d'une peau de banane obtenue avec une micro-antenne planaire.	62
2.33	Microscopie électronique à balayage d'une micro-antenne planaire.	62
2.34	Micro-antenne d'Helmhotz et visualisation du positionnement du canal microfluidique permettant le recueil de l'échantillon.	63
2.35	Image obtenue par microscopie électronique à balayage de la micro-antenne planaire rectangulaire.	64
2.36	Photographie et image par microscopie électronique à balayage de la micro-antenne planaire.	64
2.37	Représentations schématiques des 4 types d'aiguilles implantables.	65
2.38	Application d'une aiguille implantée dans le muscle de la cuisse du rat.	65
2.39	Positionnement de la micro-antenne implantée sur la colonne vertébrale du chat.	66
2.40	Micro-antenne implantable sans fil et obtention d'images IRM de la moelle épinière du rat.	67
2.41	Micro-antenne implantable auto-résonante revêtue d'élastomère et obtention d'images IRM de la moelle épinière du rat.	68
2.42	Modèle du résonateur multi-tours à lignes de transmission.	70
2.43	Micro-antenne flexible et obtention d'une image IRM d'une tumeur sous-cutanée chez la souris.	70
2.44	Micro-antenne monolithique développée pour la localisation du cathéter lors de procédures endovasculaires.	71
2.45	Image IRM <i>in vivo</i> du cerveau de rat obtenue à 7 T avec la micro-antenne monolithique auto-résonante implantée au niveau de la scissure interhémisphérique.	72
2.46	Schéma d'un exemple d'application <i>in vivo</i> de l'aiguille RMN monolithique implantable.	73
2.47	Schéma de la sonde de microdialyse concentrique.	74

2.48	Principe de fonctionnement d'une sonde de microdialyse cérébrale.	76
3.1	Boucles résonantes des micro-antennes RMN implantables « loop ».	86
3.2	Circuit électronique final des micro-antennes RMN implantables.	87
3.3	Vue d'ensemble des principaux éléments constitutifs de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 700 μm (boucle de détection implantable et circuit d'accord et d'adaptation).	88
3.4	Construction géométrique 3D du prototype de la boucle implantable de la micro-antenne « loop » ayant une longueur de 3 mm et une largeur de 450 μm	90
3.5	Construction géométrique 3D du prototype de la boucle implantable de la micro-antenne « loop » ayant une longueur de 3 mm et une largeur de 700 μm	90
3.6	Vue 3D du maillage utilisé pour la simulation électromagnétique des deux prototypes de la boucle implantable de la micro-antenne « loop ».	92
3.7	Vue 3D de la boucle implantable de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 700 μm placée au centre de la sphère d'air ayant un diamètre de 1 cm.	93
3.8	Circuit électronique modélisé de la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm	95
3.9	Champ magnétique \vec{B}_1 généré par la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm	95
3.10	Champ magnétique \vec{B}_1 généré dans les différents plans de la boucle réso- nante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm	96
3.11	Rendu surfacique (surface 2D) de l'amplitude de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 généré.	97
3.12	Rendu volumique (isosurface 3D) de l'amplitude de la composante trans- versale du champ magnétique \vec{B}_1 généré.	97
3.13	Division géométrique et estimation du volume de détection de la micro- antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm	98
3.14	(A) Axe passant par la zone de détection s'étendant de part et d'autre du plan (xOy). (B) Axe passant par la zone de détection s'étendant de part et d'autre du plan (yOz). (C) Norme de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 selon l'axe A. (D) Norme de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 selon l'axe B.	99
3.15	Champ magnétique \vec{B}_1 généré par la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 700 μm	100
3.16	Champ magnétique \vec{B}_1 généré dans les trois plans de la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 700 μm	100

3.17	Rendu surfacique (surface 2D) de l'amplitude de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 généré.	101
3.18	Rendu volumique (isosurface 3D) de l'amplitude de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 généré.	101
3.19	Division géométrique et estimation du volume de détection de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 700 μm	102
3.20	(A) Norme de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 selon l'axe passant par la zone de détection s'étendant de part et d'autre du plan (xOz). (B) Norme de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 selon l'axe passant par la zone de détection s'étendant de part et d'autre du plan (yOz).	102
3.21	Profil du coefficient de réflexion S11 de la micro-antenne RMN implantable ayant une largeur de 450 μm et immergée dans une solution de LCR artificiel.	103
3.22	Profil du coefficient de réflexion S11 de la micro-antenne RMN implantable ayant une largeur de 700 μm et immergée dans une solution de LCR artificiel.	104
3.23	Coupes sagittale, axiale et coronale des images IRM ZTE acquises avec la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm	105
3.24	Rendus volumiques sagittal, axial et coronal des images IRM ZTE acquises avec la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm	106
3.25	Division géométrique et estimation du volume de détection par l'image IRM ZTE acquise avec la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm	106
3.26	Coupes sagittale, axiale et coronale des images ZTE acquises avec la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 700 μm	107
3.27	Rendus volumiques sagittal, axial et coronal des images ZTE acquises avec la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 700 μm	107
3.28	Division géométrique et estimation du volume de détection par l'image IRM ZTE acquise avec la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm	108
3.29	Exemple d'un spectre RMN ^1H <i>in vitro</i> de la solution composée de LCR artificiel et de 7 métabolites cérébraux (Cho, Cr, Glu, Lac, mI, NAA et Tau) acquis avec la micro-antenne RMN à un champ magnétique statique de 7 T et avec une séquence PRESS.	112
3.30	Valeurs moyennes et écarts-types associés des FOGs pour les résonances du Lac, du NAA, de Cr et de Cho.	116
4.1	Injection des cellules tumorales C6 dans le cortex somatosensoriel primaire (S1HL).	123
4.2	Images anatomiques pondérées T_2 montrant la croissance tumorale.	124

4.3	Fabrication d'une canule à partir d'une pointe de pipette de 10 μ L.	125
4.4	Positionnement de la canule par chirurgie stéréotaxique	126
4.5	Images anatomiques pondérées T_2 montrant le positionnement de la canule.	126
4.6	Positionnement d'un rat dans le berceau du système RMN préclinique et après implantation de la micro-antenne RMN.	128
4.7	Correction manuelle de la phase d'ordre 0 effectuée par jMRUI d'un spectre RMN ^1H <i>in vivo</i> représentatif du tissu cérébral de rat sain acquis avec la micro-antenne RMN implantable.	130
4.8	Suppression du signal résiduel de l'eau par la technique HLSVD.	131
4.9	Apodisation lorentzienne avec une constante d'apodisation de 5 Hz par jMRUI.	132
4.10	Signaux de l'ensemble des métabolites simulés par mécanique quantique avec le module NMRScope-B pour une acquisition spectroscopique <i>in vivo</i> avec une séquence PRESS à 7 T.	134
4.11	Résultat de la quantification par l'algorithme Subtract-QUEST en utilisant la base de métabolites simulés.	135
4.12	Visualisation de la micro-antenne RMN implantée et du voxel d'acquisition de la séquence de spectroscopie PRESS sur une image anatomique pondérée T_2 du cerveau de rat sain.	137
4.13	Spectre RMN ^1H <i>in vivo</i> représentatif du tissu cérébral de rat sain acquis avec la micro-antenne RMN à 7 T et en utilisant une séquence de spectroscopie PRESS après une étape de pré-traitements effectuée par jMRUI.	138
4.14	Valeurs moyennes et écarts-types associés des FWHMs des 5 résonances pour des acquisitions effectuées avec l'antenne surfacique externe et pour des acquisitions effectuées avec les micro-antennes RMN implantées.	139
4.15	Valeurs moyennes et écarts-types associés des estimations des concentrations des différents métabolites obtenues par la procédure Subtract-QUEST du logiciel jMRUI à partir des données spectroscopiques des 12 rats sains	141
4.16	Spectre RMN ^1H <i>in vivo</i> représentatif du tissu d'un gliome C6 acquis avec la micro-antenne RMN à 7 T et en utilisant une séquence de spectroscopie PRESS après une étape de pré-traitements effectuée par jMRUI.	144
4.17	Superposition du spectre RMN ^1H <i>in vivo</i> typique du tissu cérébral sain et du spectre RMN ^1H <i>in vivo</i> typique du tissu cérébral tumoral.	145
4.18	Valeurs moyennes et écarts-types associés des estimations des concentrations des différents métabolites obtenues par la procédure Subtract-QUEST du logiciel jMRUI à partir des données spectroscopiques des 8 rats porteurs d'un gliome C6.	147

4.19	Valeurs moyennes et écarts-types associés des différents ratios de métabolites obtenus chez des rats sains et chez des rats porteurs d'un gliome C6 suite à des acquisitions effectuées avec les micro-antennes RMN implantables.	149
4.20	Image IRM sagittale pondérée T_1 acquise avec la micro-antenne RMN du tissu cérébral sain.	150
4.21	Image IRM sagittale pondérée T_1 acquise avec la micro-antenne RMN du gliome C6.	151
4.22	Images MIP 2D obtenues avec la micro-antenne RMN implantée (volume de détection = 1 μ L) du tissu cérébral sain et du tissu cérébral tumoral.	152
5.1	Association d'une micro-antenne RMN implantable ayant une largeur de 700 μ m et d'un capillaire d'injection ayant un diamètre externe de 230 μ m et un diamètre interne de 200 μ m.	158
5.2	Photographie du dispositif combinant une micro-antenne RMN implantable et un capillaire d'injection et de ses principaux éléments (circuit électronique de la micro-antenne RMN et connexion du capillaire d'injection).	159
5.3	Structure chimique du diméthylsulfoxyde (DMSO).	161
5.4	Structure chimique de la molécule MN58b, une molécule inhibitrice de première génération de la CHK α .	164
5.5	Spectres RMN ^1H <i>in vivo</i> représentatifs d'un tissu tumoral F98 non traité et d'un tissu tumoral F98 traité avec de la MN58b.	165
5.6	Structure chimique de la molécule RSM-932A, une molécule inhibitrice de deuxième génération de la CHK α .	165
5.7	Positionnement d'un rat dans le berceau du système RMN préclinique et après l'implantation du dispositif dans le tissu cérébral sain pour les rats sains et dans le gliome C6 pour les rats pathologiques.	167
5.8	Diffusion de la solution de bleu de méthylène dans le gel d'agarose à 1% au cours de la perfusion (débit = 0.4 μ L/min) par le capillaire ayant une longueur de 1.5 mm.	168
5.9	Diffusion de la solution de bleu de méthylène dans le gel d'agarose à 1% au cours de la perfusion (débit = 0.4 μ L/min) par le capillaire ayant une longueur couvrant la totalité de la longueur de la boucle de détection de la micro-antenne RMN implantable.	168
5.10	Images IRM sagittales pondérées T_1 acquises avec la micro-antenne RMN utilisée en réception RF au cours de la perfusion (débit = 0.1 μ L/min) de la solution d'agent de contraste à base de Gd (5 mM) par le capillaire.	169
5.11	Perfusion de la solution d'agent de contraste à base de Gd par le capillaire et détection RMN de la diffusion dans le gel d'agarose par la micro-antenne RMN implantable.	171

5.12	Images IRM axiales pondérées T_1 acquises avec la micro-antenne RMN avant et après la perfusion (débit = 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$) de la solution d'agent de contraste à base de Gd (5 mM) par le capillaire.	172
5.13	Spectres RMN ^1H acquis avec la micro-antenne RMN du dispositif préalablement implanté dans le gel d'agarose à 1% et contenant 25 mM de glutamine (Gln) et au cours de la perfusion (débit = 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$) de la solution composée de lactate (25 mM) et de créatine (25 mM) par le capillaire du dispositif.	173
5.14	Spectres RMN ^1H acquis avec la micro-antenne RMN du dispositif et au cours de la perfusion (débit = 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$) de la solution composée de LCR artificiel et de DMSO (20 mM) par le capillaire du dispositif.	174
5.15	Évolutions moyennes temporelles du rapport entre les amplitudes du signal de résonance du DMSO et du signal de résonance de tCr et du rapport entre les amplitudes du signal de résonance du complexe Lac+MM et du signal de résonance de tCr.	176
5.16	Comparaison spectrale entre le spectre RMN ^1H <i>in vivo</i> acquis avant le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de DMSO et le spectre RMN ^1H <i>in vivo</i> acquis 1 h 15 min après le début de la perfusion. .	178
5.17	Spectres RMN ^1H <i>in vivo</i> acquis avec la micro-antenne RMN implantable du dispositif durant la perfusion (débit = 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$) de la solution de LCR artificiel et de MN58b (10 mM).	180
5.18	Comparaison spectrale entre le spectre RMN ^1H <i>in vivo</i> acquis avant le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de MN58b et le spectre RMN ^1H <i>in vivo</i> acquis 3 h 45 min après le début de la perfusion .	182
5.19	Histogramme illustrant les variations des rapports entre les amplitudes du signal des différents métabolites (tCho/tCr, Lipides+Lac/tCr, Tau/tCr et mI/tCr) avant (barres grises) et 3 h 45 min après (barres blanches) le début de la perfusion intratumorale de la solution de LCR artificiel et de MN58b.	183
5.20	Spectres RMN ^1H <i>in vivo</i> acquis avec la micro-antenne RMN implantable du dispositif durant la perfusion (débit = 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$) de la solution de LCR artificiel et de RSM-932A (2 mM).	185
5.21	Comparaison spectrale entre le spectre RMN ^1H <i>in vivo</i> acquis avant le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de RSM-932A et le spectre RMN ^1H <i>in vivo</i> acquis 3 h 45 min après le début de la perfusion .	187
5.22	Histogramme illustrant les variations des rapports entre les amplitudes du signal des différents métabolites (tCho/tCr, Lipides+Lac/tCr, Tau/tCr et mI/tCr) avant (barres grises) et 3 h 45 min après (barres blanches) le début de la perfusion intratumorale de la solution de LCR artificiel et de RSM-932A.	188

5.23 Association d'une micro-antenne RMN implantable ayant une longueur de 3 mm et une largeur de 700 μm et d'une membrane de microdialyse ayant une longueur de 2 mm et un diamètre externe de 0.24 mm.	192
5.24 Diffusion de la solution de bleu de méthylène dans le gel d'agarose à 1% au cours de la perfusion (débit = 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$) par la membrane de microdialyse du dispositif.	194

Liste des tableaux

3.1	Valeurs des 5 caractéristiques des éléments du maillage effectué sur les deux prototypes du modèle de la micro-antenne « loop »	92
3.2	Valeurs moyennes des sensibilités, S_m et S_c , et des limites de détection, $nLOD_m$ et $nLOD_c$, pour la micro-antenne « loop » ayant un volume de détection de 550 nL pour les résonances du lactate (Lac), du N-acétylaspartate (NAA), de la créatine (Cr) et de la choline (Cho).	113
3.3	Valeurs moyennes des sensibilités, S_m et S_c , et des limites de détection, $nLOD_m$ et $nLOD_c$, pour la micro-antenne « loop » ayant un volume de détection de 1 μL pour les résonances du lactate (Lac), du N-acétylaspartate (NAA), de la créatine (Cr) et de la choline (Cho).	114
3.4	Valeurs moyennes des sensibilités, S_m et S_c , et des limites de détection, $nLOD_m$ et $nLOD_c$, pour l'antenne surfacique Bruker ayant un volume de détection de 16 μL pour les résonances du lactate (Lac), du N-acétylaspartate (NAA), de la créatine (Cr) et de la choline (Cho).	114
4.1	Valeurs moyennes et écarts-types des FWHMs et des RSBs des 5 résonances (tNAA, tCr, tCho et Glx).	139
4.2	Valeurs moyennes et écarts-types associés des estimations des concentrations des métabolites cérébraux chez des rats sains et valeurs obtenues dans la littérature (mmol/kg _{ww}).	142
4.3	Valeurs moyennes et écarts-types associés des estimations des concentrations des métabolites cérébraux chez des rats porteurs d'un gliome C6 et valeurs obtenues dans la littérature (mmol/kg _{ww}).	148
5.1	Valeurs moyennes et écarts-types associés des estimations des concentrations des différents métabolites cérébraux chez les deux rats sains avant le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de DMSO (mmol/kg _{ww}).	175
5.2	Valeurs des estimations des concentrations des différents métabolites cérébraux chez le rat porteur d'un gliome C6 avant le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de MN58b (mmol/kg _{ww}).	181
5.3	Valeurs des estimations des concentrations des différents métabolites cérébraux chez le rat porteur d'un gliome C6 avant le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de RSM-932A (mmol/kg _{ww}).	186

Introduction générale

1.1 Contexte et objectifs

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est devenue, au fil des années, un outil d'analyse indispensable dans un grand nombre de domaines divers et variés.

Le phénomène de RMN a principalement donné naissance à deux techniques, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la spectroscopie par résonance magnétique (SRM), maintenant couramment utilisées en médecine et en recherche biomédicale et qui consistent à exploiter les propriétés magnétiques intrinsèques des noyaux des atomes qui présentent un magnétisme nucléaire non nul.

Ces deux techniques dérivées de la RMN et très appréciées pour leur caractère non ionisant et non invasif ont, par exemple, permis, dans le domaine des neurosciences, de grandement améliorer la connaissance du cerveau humain, allant de sa morphologie à son fonctionnement en passant par son métabolisme, mais aussi des différentes pathologies pouvant l'affecter et notamment par la mise au point de modèles animaux pertinents pouvant mimer un grand nombre de ces dernières et accentuant alors le rôle considérable de l'imagerie et de la spectroscopie précliniques.

Néanmoins, bien qu'elles présentent de nombreux avantages, certaines limites doivent encore être surmontées et, en particulier, la faible sensibilité inhérente dont souffrent l'IRM *in vivo* et la SRM *in vivo*. Elle peut se manifester de différentes manières et essentiellement par un faible rapport signal-sur-bruit (RSB), une faible résolution spatiale et spectrale, une faible spécificité et une nécessité de réaliser, particulièrement en SRM *in vivo*, de longues acquisitions généralement incompatibles avec les études menées chez l'homme ou chez le petit animal. Cette faiblesse principale de la RMN restreint alors les champs d'applications en IRM et en SRM et notamment lors d'études réalisées sur des échantillons de faible volume comme cela peut être le cas en recherche préclinique.

L'amélioration de la sensibilité en RMN constitue donc un véritable défi que l'ensemble de la communauté scientifique cherche à relever. Depuis quelques années, les techniques d'IRM et de SRM utilisées en clinique et en préclinique ont connu des avancées et des innovations remarquables sur le plan technologique.

Un effort majeur s'est principalement concentré sur l'obtention et l'utilisation de champs magnétiques extrêmes. Cette voie d'amélioration a conduit à des systèmes RMN utilisés

pour l'*in vivo* possédant des champs magnétiques statiques compris entre 4.7 et 17.2 T pour des études précliniques et jusqu'à 7 T pour des études cliniques tandis que les systèmes RMN utilisés en routine clinique possèdent quant à eux des champs magnétiques statiques de 1.5 T et de 3 T. Tout dernièrement, un système RMN clinique corps entier de 11.7 T du projet Iseult a été installé à NeuroSpin, centre de recherche dédié à l'innovation en imagerie cérébrale situé sur le site du Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA) de Saclay, et représente, à ce jour, le système RMN le plus puissant du monde. Cette course aux hauts champs magnétiques est allée, cependant, de pair avec des coûts et des exigences très importantes en équipements de haute technologie, tout comme ce fut aussi le cas pour d'autres avancées telles que le déploiement d'antennes refroidies ou encore le développement de la technique de la polarisation nucléaire dynamique (DNP, pour *Dynamic Nuclear Polarization*, en anglais).

D'autres stratégies ont également été étudiées et une attention particulière a été portée sur l'amélioration de la sensibilité de détection des antennes radiofréquences (RF) utilisées pour capter le signal RMN.

Lors d'expériences réalisées sur des échantillons de faible volume, une des façons les plus efficaces d'augmenter la sensibilité de l'antenne RF est d'adapter la taille de cette dernière à l'échantillon analysé et de la placer au plus près de celui-ci. La miniaturisation suivie parfois de l'implantation de l'antenne RF permet alors d'obtenir une meilleure localisation spatiale, un meilleur RSB de l'image ou du spectre résultant et ainsi d'approcher des résolutions spatiales poussées, généralement inférieures à 100 μm , optimisant l'analyse de régions d'intérêt de faible volume comme, par exemple, de structures cancéreuses induites chez un modèle animal de tumeurs cérébrales.

Le développement et l'utilisation d'antennes RF miniatures et implantables pourraient alors offrir la perspective d'une meilleure compréhension, accessible par une meilleure visualisation, des processus morphologiques et physiologiques en conditions saines et pathologiques mais aussi potentiellement contribuer à la recherche de biomarqueurs caractéristiques d'une pathologie et de nouvelles cibles thérapeutiques.

C'est dans cette optique que s'inscrit le projet de thèse dont fait état ce manuscrit. Le premier objectif a été de développer et de caractériser des antennes RF miniatures et implantables en portant une précaution particulière au caractère mini-invasif de ces dernières et aux performances électromagnétiques attendues. Le deuxième objectif a été de démontrer la faisabilité d'applications *in vivo* des micro-antennes RMN implantables chez le petit animal en nous intéressant tout particulièrement à la caractérisation métabolique et morphologique de tissus cérébraux sains et de tissus cérébraux pathologiques. Et, pour finir, et ouvrir d'autres champs d'applications à l'utilisation de ces micro-antennes RMN implantables ainsi développées, nous avons souhaité étudier le potentiel de ces dernières à évaluer, en temps réel, la réponse thérapeutique lors d'une administration intratumorale de médicaments. Pour cela, un dispositif implantable permettant l'utilisation conjointe

d'un système d'injection et d'une micro-antenne RMN a été développé. Cet outil, qui pourrait être mis à la disposition des chercheurs travaillant sur le développement de molécules thérapeutiques, permettrait alors une évaluation directe et locale de leur efficacité thérapeutique potentielle.

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe « IRM moléculaire » de l'Institut des Sciences Moléculaires (ISM), UMR CNRS 5255, institut pluridisciplinaire rassemblant une communauté de chercheurs travaillant notamment sur le développement de molécules et de techniques utilisées pour l'imagerie et la thérapie.

Les manipulations expérimentales ont été effectuées à l'Institut de Bio-Imagerie de Bordeaux (IBIO) disposant d'une plateforme proposant une offre allant de l'imagerie optique préclinique à l'IRM et la SRM précliniques (systèmes RMN de 4.7 T et de 7 T) et cliniques (système RMN de 3 T). L'ensemble des systèmes RMN est géré par l'Unité d'Appui et de Recherche (UAR) 3767.

La thèse a été financée par le LabEx TRAIL ANR-10-LABX-57 pour le projet Insight.

1.2 Organisation de la thèse

Ce manuscrit de thèse est organisé en 6 chapitres, incluant les chapitres d'introduction (**Chapitre 1**) et de conclusion (**Chapitre 6**).

- **Chapitre 2** : Ce chapitre expose, tout d'abord, le contexte et les enjeux de ces travaux de thèse. Les bases et les principes physiques de la résonance magnétique nucléaire incluant l'imagerie par résonance magnétique et la spectroscopie par résonance magnétique sont repris. Il aborde ensuite le concept d'antenne radiofréquence et, en particulier, les caractéristiques électroniques et électromagnétiques et les diverses problématiques de pertes, de signal et de rapport signal-sur-bruit. La troisième partie de ce chapitre fait un état de l'art des micro-antennes RMN existantes et utilisées pour la micro-imagerie et pour la micro-spectroscopie des faibles volumes. Et enfin, il se termine par une description de quelques méthodes et techniques employées pour l'injection intracérébrale de divers composés d'intérêt.
- **Chapitre 3** : Il décrit la méthodologie de conception et de spécification électromagnétique des micro-antennes RMN implantables développées dans ces travaux de thèse. Une partie importante de ce chapitre porte sur la modélisation électromagnétique par éléments finis de ces dernières. Des expériences *in vitro* ayant permis de vérifier le volume de détection estimé par les simulations radiofréquences et d'évaluer le gain en sensibilité obtenu par l'utilisation des micro-antennes RMN implantables par rapport à l'utilisation d'une antenne conventionnelle externe sont présentées.

- **Chapitre 4** : Un exemple d'application *in vivo*, chez le rat, des micro-antennes RMN implantables développées dans ces travaux est illustré dans ce chapitre. Ce dernier s'intéresse au potentiel des micro-antennes RMN implantables à effectuer des acquisitions *in vivo* d'IRM et de SRM sur des échantillons biologiques de faible volume en mettant l'accent sur l'observation des différences métaboliques et morphologiques entre un tissu cérébral sain et un tissu cérébral tumoral.
- **Chapitre 5** : Ce chapitre porte sur le développement d'un outil associant une micro-antenne RMN implantable et un système d'injection d'un composé d'intérêt. Les méthodologies de conception et de fonctionnement de cet outil sont décrites. A la suite d'une présentation des expériences préliminaires *in vitro* et *in vivo* ayant permis de valider la compatibilité de l'association de ces deux entités, un exemple d'application *in vivo* de cet outil avec la perfusion de différents composés d'intérêt, deux molécules anticancéreuses, et l'observation de l'effet, en temps réel, de ces dernières sur le métabolisme tumoral chez des rats porteurs d'une tumeur cérébrale est présenté.

CHAPITRE 2

État de l'art

Afin de permettre au lecteur de mieux appréhender notre projet d'étude portant sur le développement de micro-antennes RMN implantables pour la spectroscopie et l'imagerie métabolique, nous rappelons, tout d'abord, quelques éléments de base de la résonance magnétique nucléaire. Ensuite, nous abordons les notions d'antenne radiofréquence, de micro-imagerie et de micro-spectroscopie des faibles volumes. Et pour finir, nous présentons différentes techniques d'injection intracérébrale et quelques-unes de leurs applications.

2.1 La résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN est un phénomène découvert à la fin de 1945 par deux équipes américaines, celle de Félix Bloch, à Stanford, et celle de Edward M. Purcell, à Harvard. Ils développèrent davantage cette technique dans le but d'étudier les structures moléculaires en chimie analytique [Bloch *et al.* (1946); Purcell *et al.* (1946)].

Ce n'est que dans les années 1970 que les techniques de RMN furent étendues à l'imagerie suivant les travaux de Paul Lauterbur, Peter Mansfield et Raymond V. Damadian et que parurent les premières images d'objets [Lauterbur (1973)] et, en 1977, la première IRM du corps humain [Damadian *et al.* (1977)]. Cela marquera l'apparition de la RMN *in vivo* dans le domaine biomédical dont le développement et le progrès ne cessent de se poursuivre encore aujourd'hui.

Le principe physique de la RMN repose sur l'existence d'une propriété quantique intrinsèque du noyau appelée spin nucléaire et associée à un $\lambda\vec{\mu}$.

Les deux grandes applications majeures de la RMN, détaillées dans la suite de cette partie, sont l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la spectroscopie par résonance magnétique (SRM).

2.1.1 Principes de base en RMN

2.1.1.1 Moment magnétique de spin

Les noyaux ayant un nombre impair de nucléons (protons et neutrons) et/ou un nombre impair de protons tels que l'hydrogène ^1H , le carbone ^{13}C ou encore le fluor ^{19}F possèdent

des propriétés magnétiques qui sont à la base du fonctionnement de la RMN.

En général, l'atome d'hydrogène est l'élément le plus étudié en raison de sa forte abondance naturelle dans les tissus biologiques (99.985 %) et de sa forte sensibilité relative. C'est la raison pour laquelle nous nous focalisons principalement sur la RMN de l'atome d'hydrogène dont le noyau est couramment appelé proton.

Le noyau peut être considéré comme une particule ayant une masse spécifique et une charge électrique tournant autour de son axe. La première est caractérisée par son moment angulaire, également appelé moment cinétique, noté \vec{s} et la seconde est caractérisée par son moment magnétique noté $\vec{\mu}$. Le moment cinétique et le moment magnétique sont reliés par l'équation suivante :

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{s} \quad (1)$$

où γ est le rapport gyromagnétique (propre à chaque noyau, pour ^1H , $\gamma = 267.5 \times 10^6 \text{ rad.s}^{-1}.\text{T}^{-1}$).

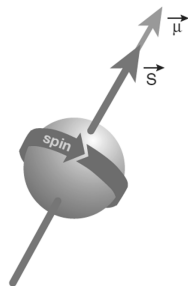


Figure 2.1. Spin et moment magnétique μ

Le moment magnétique de spin est un paramètre quantique intrinsèque rendant compte du mouvement de rotation d'une particule sur elle-même. Pour l'atome d'hydrogène, le spin nucléaire résultant de son proton correspond au moment angulaire qui est non nul ($I = \frac{1}{2}$) et qui induit ainsi le phénomène de RMN.

2.1.1.2 Aimantation macroscopique et champ magnétique statique \vec{B}_0

Comme expliqué précédemment, chaque proton est caractérisé par son moment magnétique $\vec{\mu}$.

En l'absence de champ magnétique statique, les moments magnétiques nucléaires d'un échantillon s'orientent de manière aléatoire et leur résultante, ou aimantation macroscopique, est nulle. Il est alors nécessaire de faire interagir les protons avec un champ magnétique intense, statique et externe, appelé \vec{B}_0 . L'intensité du champ magnétique statique \vec{B}_0 est généralement de 1.5 T ou 3 T pour les systèmes RMN utilisés en clinique et entre 4.7 T et 17.2 T pour ceux utilisés en préclinique (T signifie Tesla, l'unité de l'intensité des champs magnétiques). Sous l'action de \vec{B}_0 , les moments magnétiques nucléaires s'alignent selon la direction de ce dernier avec deux possibilités d'orientation décrites par la loi de Boltzmann : de façon parallèle (appelée *up* ou spin $+\frac{1}{2}$) ou anti-parallèle (appelée *down* ou

spin $-\frac{1}{2}$) (cf. **figure 2.2**). Les spins adoptent alors un mouvement de précession autour de l'axe de \vec{B}_0 avec une vitesse angulaire (ou pulsation) connue sous le nom de fréquence de Larmor notée ω_0 et proportionnelle à l'intensité du champ magnétique statique appliqué :

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (2)$$

avec γ est le rapport gyromagnétique et B_0 , l'amplitude du champ magnétique statique \vec{B}_0 .

Le niveau « parallèle », niveau d'énergie le plus bas et donc le plus stable, possède un excès de spins par rapport au niveau « antiparallèle », ce qui est suffisant pour générer un vecteur d'aimantation macroscopique noté \vec{M}_0 non nul et colinéaire à \vec{B}_0 .

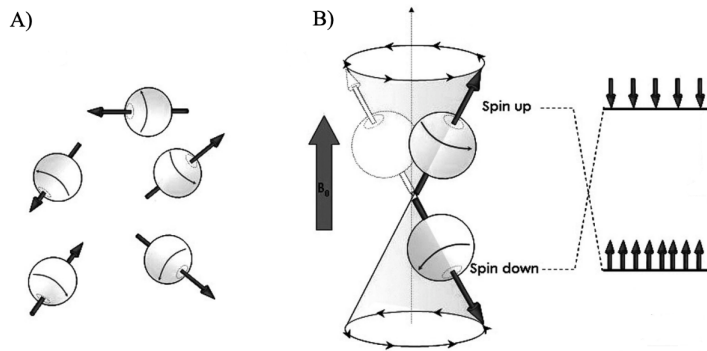


Figure 2.2. Orientations des spins en absence (A) et en présence (B) du champ magnétique statique \vec{B}_0 .

2.1.1.3 Excitation : phénomène de résonance

Cependant, la différence de populations de spins entre les deux états énergétiques étant relativement faible, il est difficile de différencier l'aimantation macroscopique \vec{M}_0 du champ magnétique statique \vec{B}_0 et il est donc nécessaire d'écarter cette aimantation macroscopique de \vec{B}_0 .

Cela est réalisable en appliquant une onde (ou impulsion) radiofréquence (RF) \vec{B}_1 perpendiculairement à \vec{B}_0 venant alors perturber l'équilibre des spins. Pour que ce phénomène appelé phénomène de résonance soit optimal, l'onde RF \vec{B}_1 doit osciller à la fréquence de Larmor ω_0 . L'impulsion \vec{B}_1 , produite par une antenne d'émission RF, peut être caractérisée par l'angle de basculement qu'elle peut imposer à l'aimantation macroscopique. Cet angle dépend de l'intensité et de la durée de l'application de l'onde RF \vec{B}_1 .

Lors de la phase d'excitation et dans le cas d'une impulsion de 90° , l'aimantation macroscopique est alors basculée dans le plan orthogonal à \vec{B}_0 . Cette bascule de l'aimantation macroscopique traduit deux processus distincts : la décroissance de la composante longitudinale notée \vec{M}_z (par le passage des spins de l'état de plus faible énergie à l'état de plus haute énergie) et l'apparition de la composante transversale notée \vec{M}_{xy} (par la mise en

cohérence des phases des spins).

Lors de l'arrêt de l'impulsion RF, les moments magnétiques nucléaires et donc l'aimantation macroscopique tendent à retrouver leur état d'équilibre. Ce retour à l'état d'équilibre est communément appelé phase de relaxation.

Par le retour des spins précédemment excités à l'état de plus faible énergie, la composante longitudinale \vec{M}_z recroît exponentiellement et simultanément, les moments magnétiques perdent leur cohérence de phase induisant une décroissance exponentielle de la composante transversale \vec{M}_{xy} .

La **figure 2.3** illustre les différentes étapes du phénomène de RMN.

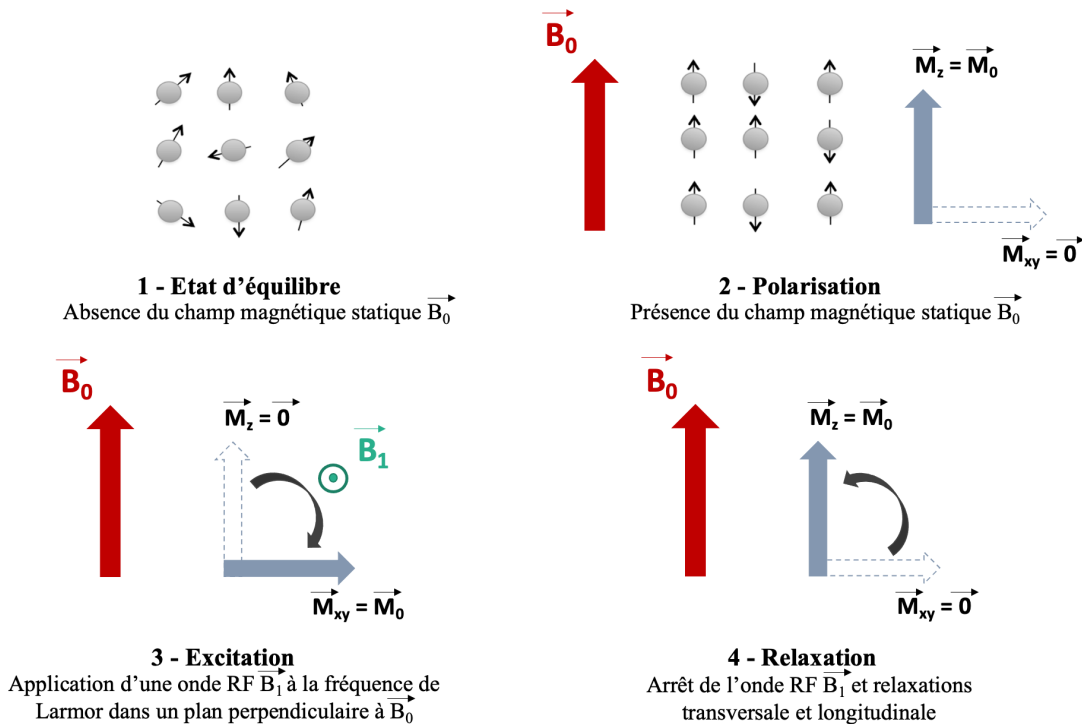


Figure 2.3. Phénomène de RMN en quatre étapes : état d'équilibre, polarisation, excitation et relaxation.

2.1.1.4 Équations de Bloch et relaxations longitudinale et transversale

La phase de relaxation peut être décrite selon deux phénomènes indépendants :

- La relaxation longitudinale correspondant à la repousse de la composante longitudinale \vec{M}_z .
- La relaxation transversale correspondant à la disparition de la composante transversale \vec{M}_{xy} .

C'est en 1946 que Félix Bloch introduit une série d'équations décrivant l'évolution temporelle de l'aimantation macroscopique avec \vec{B}_0 aligné selon l'axe z du référentiel et l'onde RF \vec{B}_1 appliquée dans le plan (xOy) [Bloch *et al.* (1946)].

En résolvant cette série d'équations, il est possible de connaître les évolutions temporelles de l'aimantation longitudinale $M_z(t)$ et de l'aimantation transversale $M_{xy}(t)$:

$$M_z(t) = M_z(t=0) e^{-\frac{t}{T_1}} + M_z(t=t_{eq})(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}) \quad (3)$$

$$M_{xy}(t) = M_z(t=t_{eq}) e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (4)$$

avec $M_z(t=0)$, l'aimantation longitudinale au moment de l'application de l'onde RF \vec{B}_1 et $M_z(t=t_{eq})$, l'aimantation à l'équilibre.

Ainsi, lors d'une impulsion \vec{B}_1 de 90° , la repousse de la composante longitudinale (ou relaxation spin-réseau) suit une loi exponentielle caractérisée par le temps de relaxation longitudinale T_1 . Il représente le temps nécessaire pour que la composante longitudinale \vec{M}_z retrouve 63% de sa valeur initiale, c'est-à-dire, $M_z(t=T_1) = 0.63 \times M_0$.

La disparition de la composante transversale (ou relaxation spin-spin) suit une loi exponentielle décroissante caractérisée par le temps de relaxation transversale T_2 . Il représente le temps nécessaire pour que le composante transversale \vec{M}_{xy} retrouve 37% de sa valeur initiale, c'est-à-dire, $M_{xy}(t=T_2) = 0.37 \times M_0$.

La relaxation transversale est beaucoup plus rapide que la relaxation longitudinale : T_2 est toujours inférieur à T_1 (de l'ordre d'un facteur 10).

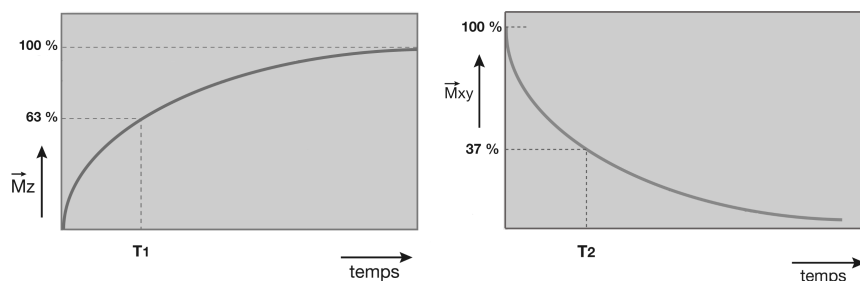


Figure 2.4. Retour à l'équilibre des composantes longitudinale \vec{M}_z et transversale \vec{M}_{xy} [Kastler (2018a)].

En raison de l'inhomogénéité du champ magnétique statique \vec{B}_0 , la désynchronisation des phases des moments magnétiques s'effectue suivant une constante de temps plus courte que la valeur théorique T_2 . Cette constante de temps est notée T_2^* ($T_2^* < T_2$).

Chaque tissu possède un T_1 et un T_2 dépendant de sa composition en protons et du milieu dans lequel ce dernier se trouve.

Ainsi, lors de l'acquisition d'images IRM, l'utilisateur peut choisir de créer un contraste particulier entre les différents tissus en fonction de la pondération, T_1 ou T_2 , de l'image en modifiant deux paramètres de la séquence IRM : le temps de répétition (TR) et/ou le temps d'écho (TE). Il est à noter qu'une multitude d'autres contrastes peuvent être

obtenus en jouant sur les paramètres d'acquisition et sur les séquences utilisées (densité de protons, séquences pondérées en diffusion, FLAIR (pour *FLuid-Attenuated Inversion Recovery*, en anglais), ...).

2.1.1.5 Détection du signal RMN

La détection du signal RMN s'effectue pendant la phase de relaxation précédemment décrite et à l'aide d'une antenne de réception RF, également appelée antenne de détection RF, dont le plan est colinéaire à \vec{B}_0 , et accordée à la fréquence de Larmor.

Lors de la phase de relaxation, la précession de la composante transversale \vec{M}_{xy} produit un flux magnétique variable induisant ainsi, par la loi de Faraday, une force électromotrice aux bornes de l'antenne de détection RF (cf. **figure 2.5**).

Il s'agit du signal d'induction libre ou FID (pour *Free Induction Decay*, en anglais). Ce signal, mesuré en RMN, correspond donc à la décroissance de l'aimantation transversale \vec{M}_{xy} et représente une sinusoïde amortie par une exponentielle avec la constante de temps T_2^* . Ce signal est généralement faible.

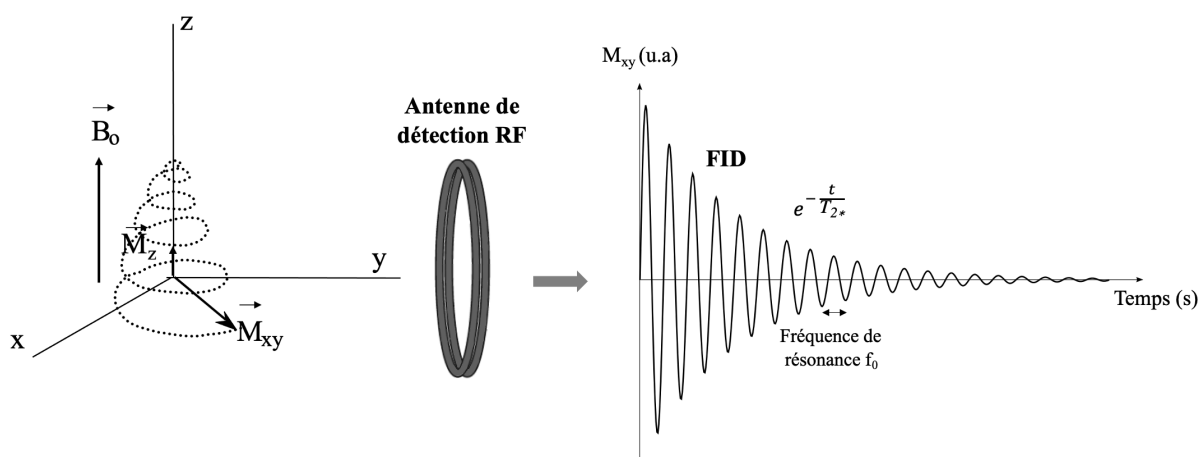


Figure 2.5. Détection du signal d'induction libre (FID) par l'antenne de détection RF placée dans un plan orthogonal à \vec{B}_0 [Kastler (2018a)].

Par l'application du principe de réciprocité [Hoult & Richards (1976); Chen & Hoult (1989)], qui stipule qu'une antenne de détection RF possède une sensibilité proportionnelle à son champ d'émission (c'est-à-dire que la force électromotrice induite dans l'antenne RF par un point donné de l'espace est proportionnelle au champ magnétique \vec{B}_1 produit au même point par un courant I circulant dans l'antenne RF), le signal S généré par les spins à la suite d'une excitation uniforme dans un volume δV et réceptionné par l'antenne de détection RF peut s'exprimer par :

$$S = w_0 M_0 \sin \alpha \frac{B_1}{I} \delta V \quad (5)$$

avec α , l'angle de basculement de l'aimantation, M_0 , l'amplitude de l'aimantation

macroscopique \vec{M}_0 , ω_0 , la fréquence de Larmor et $\frac{B_1}{T}$, le coefficient d'induction traduisant l'aptitude de l'antenne à créer un champ magnétique lorsqu'elle est parcourue par un courant I .

2.1.2 L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

Au cours de ces dernières années, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est devenue la modalité d'imagerie de référence pour l'étude non invasive et non irradiante des tissus mous chez l'homme et l'animal.

L'IRM regroupe, en réalité, plusieurs techniques d'imagerie comprenant, par exemple, des technologies relativement connues telles que l'IRM anatomique et l'IRM fonctionnelle mais aussi des techniques plus originales telles que l'IRM de diffusion et l'IRM de perfusion. Ces techniques permettent d'accéder à différentes informations telles que, entre autres, l'orientation des fibres de la matière blanche pour l'IRM de diffusion ou la microvascularisation du tissu imagé pour l'IRM de perfusion.

Les micro-antennes RMN implantables, développées dans cette thèse, ont été principalement utilisées pour l'IRM anatomique conventionnelle reposant sur la cartographie de la teneur en protons en utilisant diverses pondérations de relaxation T_1 et T_2/T_2^* afin d'accentuer le contraste entre les différents types de tissus et entre ceux normaux et anormaux.

2.1.2.1 Codage spatial 2D du signal

Le signal RMN recueilli provient de tous les voxels contenus dans le volume observé par l'antenne de détection RF. L'obtention d'une image IRM, à partir de ce signal, nécessite alors de connaître précisément sa localisation spatiale.

Pour cela, des variations linéaires de champ magnétique appelés gradients sont utilisés. Ces gradients sont produits par trois bobines électromagnétiques générant une variation spatiale linéaire du champ magnétique dans les trois directions de l'espace (x , y et z).

Le codage spatial s'effectue selon trois étapes distinctes : la sélection du plan de coupe, le codage de phase et le codage par la fréquence.

Sélection du plan de coupe

Cette première étape consiste à appliquer un gradient de sélection de coupe nommé GSC dans une direction perpendiculaire à la coupe que l'expérimentateur souhaite sélectionner.

Ce gradient va alors se superposer au champ magnétique statique \vec{B}_0 , modifiant ainsi la fréquence de précession des spins selon leur position sur l'axe de l'application du gradient de sélection de coupe.

Simultanément à ce gradient, une impulsion RF, caractérisée par une fréquence centrale

et une largeur de bande spectrale, est appliquée.

La combinaison de ces deux procédés permet de s'assurer que seuls les protons situés dans une coupe donnée seront excités. La position de la coupe dépend de la fréquence centrale de l'impulsion RF et l'épaisseur dépend de la largeur de la bande spectrale de l'impulsion RF et de l'amplitude de GSC.

La **figure 2.6** illustre, par exemple, le principe de la sélection de coupe avec l'application d'un gradient GSC selon l'axe z (par convention, l'axe cranio-caudal en IRM clinique) [Kastler & Vetter (2018)]. La fréquence angulaire ω va croître de façon linéaire selon z et les protons vont alors précesser à des fréquences angulaires croissantes par coupes perpendiculaires à la direction du gradient. Seuls les protons contenus dans la coupe P4 qui précessent à la fréquence angulaire ω_0 (condition de résonance) basculeront de 90° (suite à l'impulsion sélective) et contribueront donc à la formation du signal RMN.

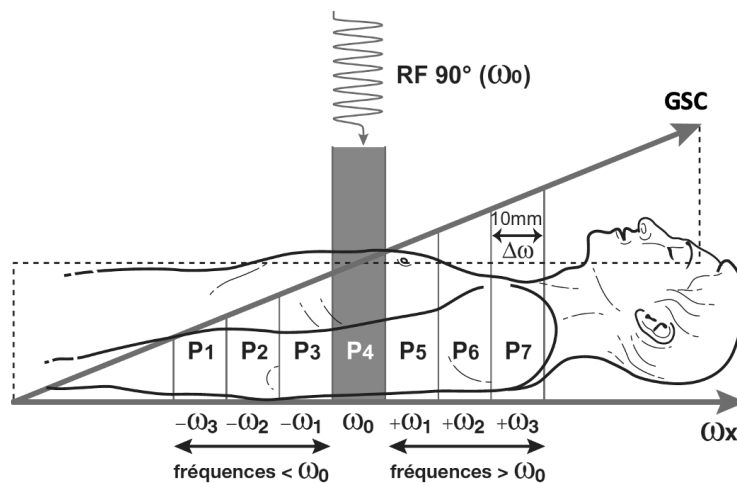


Figure 2.6. Application d'un gradient GSC selon l'axe z. Seuls les protons contenus dans la coupe P4 qui précessent à la fréquence angulaire ω_0 (condition de résonance) basculeront de 90° (suite à l'impulsion sélective) et contribueront donc à la formation du signal RMN [Kastler & Vetter (2018)].

Codage de phase

La deuxième étape consiste à appliquer un gradient de codage de phase nommé GCP perpendiculairement au gradient précédent GSC.

Ce gradient GCP va, comme le gradient de sélection de coupe, modifier la fréquence de précession des spins perpendiculairement à la direction d'application du gradient et va également provoquer des déphasages. Ces derniers persistent lorsque le gradient est arrêté et jusqu'à l'acquisition du signal.

Ainsi, les protons sur une même ligne précessionnent à la même fréquence mais avec des phases différentes.

Codage par la fréquence

La dernière étape consiste à appliquer un gradient de codage par la fréquence nommé GCF pendant l'acquisition du signal et dans la dernière direction.

Ce gradient modifie les fréquences de précession selon la dernière direction pendant toute la durée de son application créant ainsi des colonnes de protons ayant une vitesse de précession identique.

Ce gradient est également nommé gradient de lecture car il est appliqué simultanément à l'acquisition du signal RMN afin de bénéficier de la distinction parfaite des spins (phase et fréquence de résonance propres à chaque spin).

2.1.2.2 Reconstruction de l'image

Le codage spatial dans le plan de coupe précédemment décrit et réalisé d'abord dans une direction par la phase, puis dans l'autre direction par la fréquence, permet de coder sous forme fréquentielle et par la phase la position des voxels.

Ces données fréquentielles ou fréquences spatiales sont enregistrées dans une matrice appelée espace K ou plan de Fourier.

Un déplacement dans le plan de Fourier s'effectue alors grâce à l'application des gradients de codage de l'espace avec le gradient de sélection de coupe permettant de sélectionner la coupe, le gradient de codage de phase permettant de sélectionner la ligne de l'espace K et le gradient de codage par la fréquence permettant de sélectionner la colonne de l'espace K.

Le gradient de codage de phase et le gradient de codage de fréquence sont appliqués autant de fois qu'il faut de projections pour construire l'image, correspondant au nombre de lignes et de colonnes de l'espace K.

Il existe alors un outil mathématique permettant de convertir les données fréquentielles en informations spatiales, afin de constituer une image 2D facilement interprétable, appelé transformée de Fourier 2D inverse (cf. **figure 2.7**).

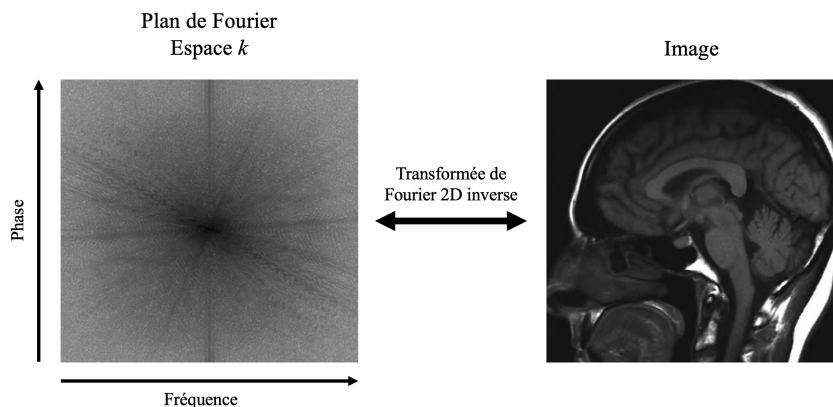


Figure 2.7. Reconstruction de l'image à partir de l'espace K.

Il est important de noter que chaque point de l'image 2D est codé par l'ensemble de l'es-

pace K et que les régions centrale et périphérique de ce dernier contribuent différemment à la construction de l'image.

En effet, la région centrale contient les basses fréquences de l'image et informe principalement sur le signal et le contraste tandis que la région périphérique concentre les hautes fréquences renseignant sur les détails et les contours.

2.1.2.3 Séquences conventionnelles

En IRM, il existe deux grandes familles de séquences : les séquences de type écho de spin et les séquences de type écho de gradient.

Ces séquences se composent d'impulsions RF, permettant d'exciter ou de rephaser les spins, de gradients, permettant d'encoder spatialement le signal, et de délais, appelés temps d'écho (TE) et temps de répétition (TR).

Séquence de type écho de spin

C'est en 1950, en essayant de supprimer les inhomogénéités du champ magnétique statique \vec{B}_0 , que Erwin Hahn présenta la séquence d'écho de spin [Hahn (1950)].

Cette séquence est composée d'une première impulsion de 90° permettant de basculer l'aimantation dans le plan transversal et d'une deuxième impulsion de 180° au temps $t = \frac{TE}{2}$ permettant de s'affranchir des inhomogénéités du champ magnétique, responsables de déphasages importants des spins (cf. **figure 2.8**). Cette impulsion de 180° , couramment appelée impulsion de rephasage, inverse les phases des spins sans modifier le sens de précession entraînant un rephasage progressif à $t = TE$.

Au temps TE, le signal réapparaît sous la forme d'un écho purement pondéré en T_2 et c'est à ce moment là que la lecture d'une ligne de l'espace K est effectuée.

Il est ainsi nécessaire de répéter ce train d'ondes - impulsions 90° et 180° et gradients - autant de fois qu'il y a de lignes dans l'espace K (correspondant au nombre de pixels dans la direction du codage de phase).

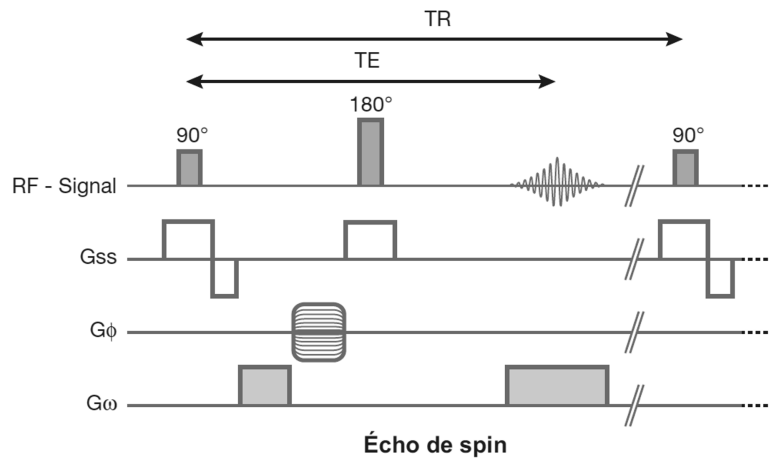


Figure 2.8. Chronogramme des événements (impulsions RF, gradients d'encodage spatial et recueil du signal) d'une séquence d'écho de spin [Kastler (2018b)].

Séquence de type écho de gradient

La séquence d'écho de gradient se différencie de la séquence d'écho de spin par un angle de basculement θ inférieur à 90° et par l'absence de l'impulsion de rephasage de 180° (cf. **figure 2.9**).

Après l'impulsion RF inférieure à 90° , l'aimantation longitudinale \vec{M}_z n'est pas tout à fait nulle et le retour à l'équilibre s'effectue donc plus rapidement. Cela permet d'utiliser des temps, TE et TR, plus courts et ainsi diminuer le temps d'acquisition.

Cependant, pour éviter la perte de signal qui est présente lorsque le TR est inférieur au T_1 du tissu, il existe un angle, appelé angle de Ernst défini par $\cos(\theta_E) = e^{-\frac{TR}{T_1}}$ donnant alors un niveau de signal optimum.

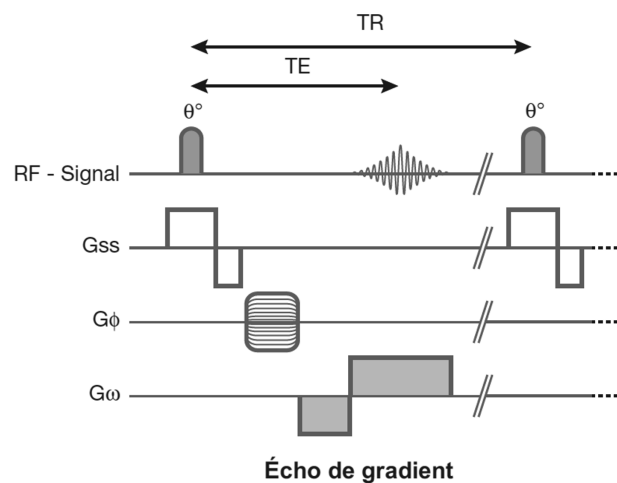


Figure 2.9. Chronogramme des événements (impulsions RF, gradients d'encodage spatial et recueil du signal) d'une séquence d'écho de gradient [Kastler (2018b)].

Comme déjà évoqué dans le **paragraphe 2.1.1.4**, les réglages du TE et du TR per-

mettent d'accéder à un contraste souhaité.

Le TR conditionne la pondération en T_1 . Plus le TR est court, plus la séquence est pondérée en T_1 et le tissu ayant le T_1 le plus court donne le signal le plus important (= hypersignal).

Le TE conditionne la pondération en T_2 . Plus le TE est long, plus la séquence est pondérée en T_2 et le tissu ayant le T_2 le plus court donne le signal le moins important (= hyposignal).

Pour résumer, un TR court et un TE court donneront une image pondérée T_1 , un TR long et un TE long donneront une image pondérée T_2 .

Il existe également une pondération dite en densité de protons obtenue avec un TR long (dépondération en T_1) et un TE court (dépondération en T_2).

La **figure 2.10** illustre deux images IRM *in vivo* d'un cerveau de rat avec un contraste T_1 (à gauche) et avec un contraste T_2 (à droite).

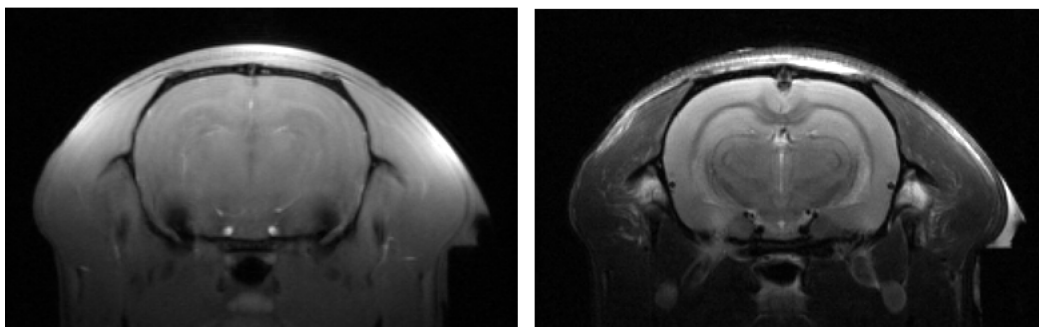


Figure 2.10. Coupes coronales d'un cerveau de rat *in vivo* avec un contraste T_1 (à gauche) et un contraste T_2 (à droite) acquises avec une résolution dans le plan de $136 \times 136 \mu\text{m}^2$ et à une intensité de champ magnétique statique de 7 T.

2.1.3 La spectroscopie par résonance magnétique (SRM)

La spectroscopie par résonance magnétique (SRM) représente la deuxième application dérivée de la RMN en comptant l'IRM.

De la même manière que pour l'IRM, une expérience de SRM est établie en appliquant une impulsion d'excitation suivie de la détection du signal RMN, la FID (ou écho), par une antenne de détection RF.

La transformée de Fourier de la FID fournit alors le spectre RMN donnant ainsi des informations sur les molécules constitutives de l'échantillon.

Bien que cette technique s'applique majoritairement à l'*in vitro* et à l'*ex vivo* dans différents domaines tels que la chimie et la biologie avec la métabolomique [Johnson *et al.* (2016)], elle est aussi utilisée en *in vivo*. Elle peut alors permettre d'obtenir la composition biochimique de divers tissus en identifiant certains constituants moléculaires, les métabolites, et son aspect quantitatif représente un réel intérêt dans le domaine médical. En effet,

en fonction de leurs concentrations proportionnelles à l'aire de la signature spectrale, les métabolites peuvent intervenir dans différents processus physiologiques ou pathologiques.

2.1.3.1 Déplacement chimique et couplage spin-spin

La fréquence de résonance des protons n'est pas uniquement déterminée par l'intensité du champ magnétique statique \vec{B}_0 appliqué et de leur rapport gyromagnétique.

En réalité, le champ magnétique statique \vec{B}_0 induit des courants dans l'environnement électronique du noyau créant ainsi un champ magnétique qui vient s'opposer à \vec{B}_0 . Les spins nucléaires subissent un «blindage» magnétique dont les caractéristiques dépendent de la molécule à laquelle appartient le noyau.

Chaque noyau perçoit alors un champ magnétique local B_{eff} défini par :

$$B_{eff} = B_0(1 - \sigma) \quad (6)$$

avec B_{eff} , l'amplitude du champ magnétique local B_{eff} , B_0 , l'amplitude du champ magnétique statique \vec{B}_0 et σ , la constante d'écran (ou de blindage) dépendante de l'environnement du noyau (atomes et liaisons chimiques, présence de cycles aromatiques, ...).

La fréquence de résonance du noyau diffère donc légèrement de la fréquence de Larmor. Cette différence est, la plupart du temps, de quelques hertz et est définie par une nouvelle grandeur appelée déplacement chimique et notée δ :

$$\delta_{ppm} = \frac{\nu_0 - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \times 10^6 \quad (7)$$

avec ν_{ref} , la fréquence de résonance de la molécule de référence et ν_0 , la fréquence de résonance du noyau étudié. L'indice ppm désigne « parties par million ».

Pour le noyau ^1H , la molécule de référence est le Tétraméthylsilane (TMS) et son déplacement chimique vaut, par convention, 0 ppm.

De plus, outre le déplacement chimique, la fréquence de résonance des noyaux peut être modifiée par une autre interaction moléculaire connue sous le nom de couplage scalaire ou couplage spin-spin.

En effet, ce couplage, indépendant du champ magnétique statique \vec{B}_0 , est dû à l'interaction entre les spins de deux noyaux impliqués dans une liaison covalente et se traduit par une décomposition de chaque raie en plusieurs raies (doublet, triplet ou multiplet) sur le spectre RMN. L'espacement entre deux raies a une valeur fixe et qui est appelée constante de couplage J.

Ainsi, le spectre RMN, obtenu par la transformée de Fourier du signal de la FID, permet de visualiser les pics fréquentiels correspondant aux déplacements chimiques et aux constantes de couplage J de la molécule observée.

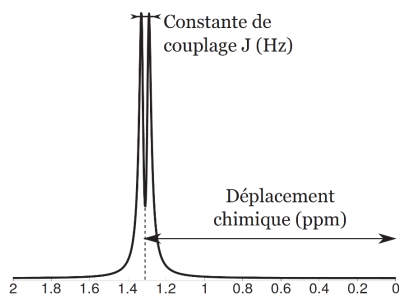


Figure 2.11. Spectre RMN ^1H simulé du lactate : doublet à 1.31 ppm avec une constante de couplage J de 6.9 Hz.

2.1.3.2 Spectroscopie localisée et suppression du signal de l'eau

La spectroscopie localisée ou spectroscopie mono-voxel (SVS pour *Single Voxel Spectroscopy*, en anglais) est l'une des deux méthodes de localisation en SRM.

Cette technique, fondée sur la sélection d'un volume d'intérêt (voxel) par l'application de trois impulsions sélectives associées à des gradients de sélection de coupe (cf. **paragraphe 2.1.2.1**), présente de nombreux avantages. En effet, la localisation spatiale permet de réceptionner uniquement le signal issu du volume d'intérêt et ainsi éliminer les signaux indésirables provenant de l'extérieur du voxel comme, par exemple, le signal des lipides extra-crâniens lors d'une expérience de SRM cérébrale. De plus, la spectroscopie mono-voxel permet de réduire les phénomènes d'hétérogénéité des tissus et des champs magnétiques \vec{B}_0 et \vec{B}_1 améliorant la précision de la caractérisation du volume étudié et la résolution spectrale.

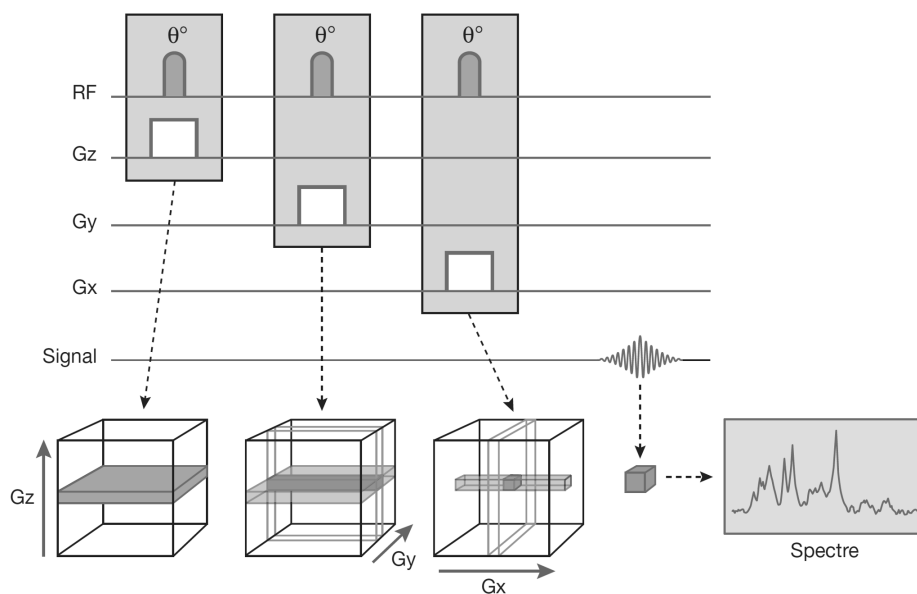


Figure 2.12. Principe de la spectroscopie mono-voxel [Vetter *et al.* (2018)]. Sélection du volume d'intérêt par trois impulsions RF sélectives (θ°) couplées à des gradients de sélection de coupe (G_z , G_y et G_x) dans les trois directions de l'espace.

Les deux séquences les plus utilisées pour les acquisitions de SRM mono-voxel sont les séquences PRESS (pour *Point RESolved Spectroscopy*, en anglais) et STEAM (pour *STimulated Echo Acquisition Mode*, en anglais).

Séquence PRESS

La séquence PRESS, dont le chronogramme est présenté à la **figure 2.13**, a été introduite par Paul Bottomley en 1987 [Bottomley (1987)].

Cette méthode, dite à double écho de spin, se comporte d'une impulsion RF d'excitation (90°) et de deux impulsions RF de refocalisation (180°). Pour permettre la sélection du volume d'intérêt, ces trois impulsions sont associées à des gradients dans les trois directions de l'espace (x , y et z).

Le premier écho de spin produit au temps TE_1 et à la suite des deux premières impulsions n'est pas mesuré. Seul le deuxième écho de spin, produit au temps TE_2 et correspondant au signal mesuré dans le volume d'intérêt, est enregistré et échantillonné.

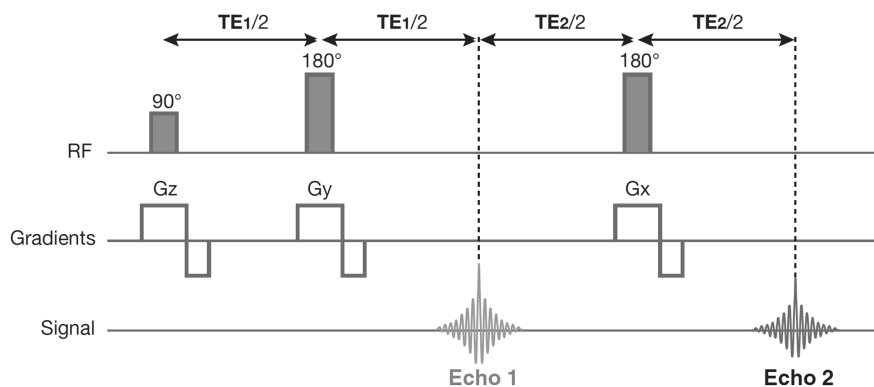


Figure 2.13. Principe de la séquence PRESS [Vetter *et al.* (2018)]. Cette séquence est composée d'un train d'impulsions RF (90° , 180° et 180°), chacune associée à un gradient de sélection de coupe (G_z , G_y et G_x) permettant la sélection du voxel.

Séquence STEAM

La séquence STEAM, dont le chronogramme est présenté à la **figure 2.14**, a été décrite par Jens Frahm en 1987 et est basée sur le principe de l'écho stimulé [Frahm *et al.* (1987)].

Elle comporte une succession de trois impulsions RF de 90° associées à des gradients dans chaque direction (x , y et z).

Seul l'écho stimulé produit par les trois impulsions successives de 90° est réceptionné. Le temps séparant la deuxième et la troisième impulsion est appelé temps de mélange (TM).

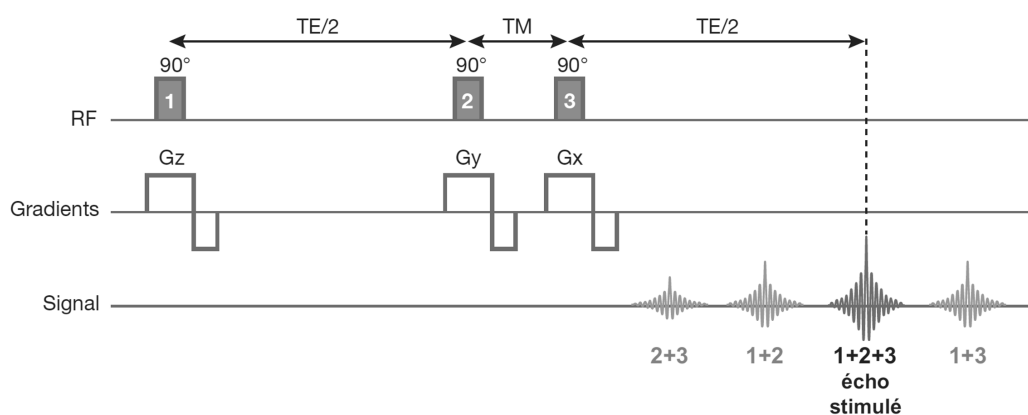


Figure 2.14. Principe de la séquence STEAM [Vetter *et al.* (2018)]. Cette séquence est composée d'un train d'impulsions RF (90° , 90° et 90°), chacune associée à un gradient de sélection de coupe (Gz, Gy et Gx) permettant la sélection du voxel.

Ces deux séquences possèdent principalement deux différences qui demeurent être les temps d'écho utilisés et le rapport signal-sur-bruit (RSB) qu'elles fournissent [Moonen *et al.* (1989)].

En effet, la séquence STEAM rend possible l'utilisation de temps d'écho courts mais avec un RSB plus faible que la séquence PRESS car l'amplitude de l'écho stimulé réceptionné est divisée par deux par rapport à un écho de spin.

Suppression du signal de l'eau

Dans les tissus biologiques, la concentration de l'eau est beaucoup plus élevée que celle de tout autre composant et donc les spectres RMN ^1H de ces tissus sont généralement dominés par une résonance possédant une forte amplitude et un déplacement chimique de 4.7 ppm correspondant au signal des deux protons de l'eau.

Pour visualiser les résonances des métabolites possédant une plus faible concentration et ayant des déplacements chimiques proches de 4.7 ppm, il est alors nécessaire de supprimer le signal de l'eau (cf. **figure 2.15**).

La technique CHESS (pour *CHEmical Shift Selective*, en anglais) constitue le motif de base pour saturer le signal de l'eau [Haase *et al.* (1985)].

Cette technique est basée sur l'application de trois impulsions RF de 90° suivies de trois gradients déphaseurs dans chacune des directions de l'espace (x, y et z). Les impulsions RF sont centrées sur la fréquence de résonance de l'eau et de bande passante étroite afin de basculer uniquement l'aimantation relative aux spins des protons des molécules d'eau. La suppression du signal de l'eau est réalisée avant la première impulsion RF des séquences PRESS et STEAM et le délai entre les deux doit être le plus court possible afin d'éviter le retour de l'aimantation des protons.

En réalité, le motif précédemment décrit est souvent répété afin d'améliorer la suppression du signal de l'eau. C'est le cas pour la technique utilisée dans ces travaux et nommée VA-

POR (pour *V*ariable *P*ulse power and *O*ptimized *R*elaxation delays, en anglais) [Tkáč *et al.* (1999)]. Cette technique se compose de 7 motifs CHESS. Afin d'obtenir une aimantation induite par le signal des protons de l'eau pratiquement nulle, les angles de basculement et les délais séparant les motifs sont optimisés.

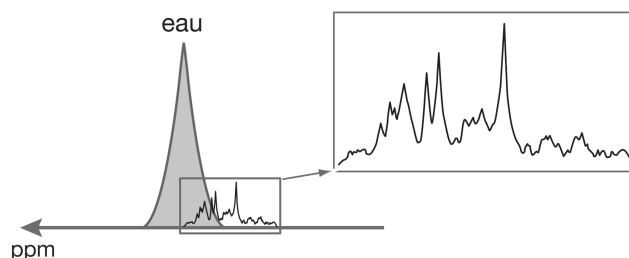


Figure 2.15. Intérêt de la suppression du signal de l'eau [Vetter *et al.* (2018)].

2.1.3.3 Métabolites d'intérêt en SRM ^1H

Le métabolisme représente l'ensemble des réactions biochimiques nécessaires aux processus physiologiques d'un organe ou tissu. Les substances formées au cours du métabolisme ou qui y participent sont appelées métabolites et la SRM ^1H représente une technique relativement puissante pour en observer un grand nombre. En effet, il est, par exemple, possible d'extraire 15 à 20 métabolites cérébraux différents à partir de spectres RMN ^1H de cerveaux de rats sains acquis à TE court (cf. **figure 2.16**) [Pfeuffer *et al.* (1999)]. De plus, le profil métabolique, obtenu par SRM ^1H , est propre à chaque organe ou tissu et peut fluctuer en fonction de phénomènes physiopathologiques.

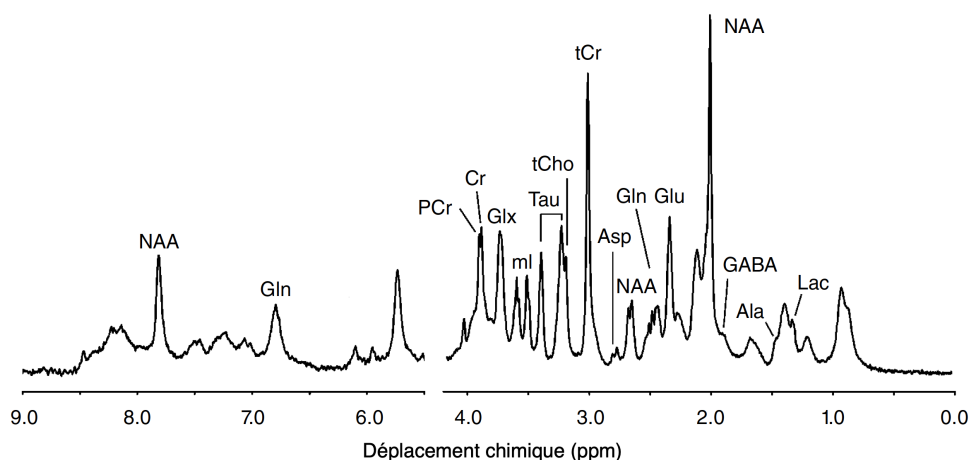


Figure 2.16. Spectre RMN ^1H *in vivo* du cerveau de rat sain (11.7 T, TR/TE = 4000/12 ms, taille du volume d'intérêt = 100 μl) [De Graaf (1998)]. La bonne résolution spectrale obtenue à des intensités de champ magnétique statique élevées permet la distinction et l'identification d'une quinzaine de métabolites.

Chaque métabolite présente différents déplacements chimiques mais, en pratique, seulement un (ou parfois deux) est utilisé pour la quantification. Govindaraju *et al.* (2000) a énuméré les déplacements chimiques et les constantes de couplage J des principaux métabolites d'intérêt.

Au cours de cette thèse, nous avons seulement réalisé de la SRM ^1H du cerveau, c'est la raison pour laquelle nous présentons uniquement les principaux métabolites cérébraux :

- Le **N-AcétylAspartate (NAA)** est un acide aminé présent majoritairement dans le système nerveux central et périphérique et a des concentrations relativement importantes. Tkáč *et al.* (2003) ont mesuré une concentration moyenne comprise entre 7.6 et 10 mM dans le cerveau de rat sain.

Le NAA possède sept protons donnant des signaux entre 2 et 8 ppm avec une résonance principale en forme de singulet à 2.01 ppm provenant des trois protons d'un groupe N-acétyle CH_3 .

Bien qu'il existe un grand nombre de publications sur la synthèse, la distribution et les fonctions possibles du NAA [Birken & Oldendorf (1989); Edden & Harris (2016)], sa fonction exacte reste relativement inconnue.

En SRM ^1H , l'intensité du signal du NAA est utilisé comme marqueur de l'intégrité neuronale incluant généralement la densité neuronale et le fonctionnement neuronal. En effet, dans certaines pathologies s'accompagnant d'une perte neuronale et/ou d'un dysfonctionnement neuronal telles que les tumeurs ou les accidents vasculaires cérébraux (AVC), une diminution de l'amplitude du signal de résonance du NAA a été observée [Frahm *et al.* (1991); Gideon *et al.* (1992)].

- Le **N-AcétylAspartylGlutamate (NAAG)** est un dipeptide de l'aspartate et du glutamate.

Il est réparti de manière inégale dans le cerveau du rat et une concentration comprise entre 0.6 et 3 mM a été rapportée [Fuhrman *et al.* (1994)].

La résonance la plus importante du NAAG se situe à 2.04 ppm et est souvent confondue avec la résonance du NAA à 2.01 ppm. Pour différencier les deux métabolites, il est nécessaire d'avoir une excellente homogénéité du champ magnétique mais dans le cas où cette séparation n'est pas possible, les signaux de résonance du NAA et du NAAG sont définis comme étant le signal de résonance du **NAA total** noté **tNAA**. Le NAAG semble être impliqué dans la neurotransmission excitatrice et être une source de glutamate [Coyle (1997)].

- L'**Alanine (Ala)** est un acide aminé non essentiel présent dans le cerveau des mammifères à une concentration inférieure à 0.5 mM.

Il possède deux résonances qui ressemblent fortement aux résonances du lactate, avec

un doublet présent à 1.47 ppm et un quadruplet présent à 3.77 ppm. Le doublet de l'alanine est souvent observable comme un épaulement au niveau de la résonance des macromolécules à 1.4 ppm sur les spectres RMN ^1H acquis à haut champ magnétique et ayant une haute résolution spectrale.

Une augmentation du niveau de l'alanine a été observée dans les méningiomes [Pop-tani *et al.* (1995)] et après une ischémie cérébrale [Higuchi *et al.* (1997)].

- **L'acide γ -aminobutyrique (GABA)** est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central.

Sa faible concentration cérébrale (de l'ordre de 1 mM) et sa superposition avec d'autres résonances de métabolites plus abondants le rendent difficilement détectable dans un cerveau sain [Govindaraju *et al.* (2000); Pfeuffer *et al.* (1999)].

En effet, le GABA possède trois groupes méthylène dont les résonances sont centrées à 1.89 ppm (quintuplet), à 2.28 ppm (triplet) et à 3.01 ppm (triplet). Afin de les distinguer, il est alors nécessaire de faire appel à des techniques particulières d'édition [Mescher *et al.* (1998)].

L'augmentation de la concentration de GABA dans le cerveau a, par exemple, été utilisée pour le traitement des crises d'épilepsie et des spasmes musculaires notamment présents chez les patients atteints de la maladie de Huntington [Petroff (2002)].

- **L'Aspartate (Asp)** est un acide aminé non essentiel qui agit comme un neurotransmetteur excitateur et présent, dans le cerveau du rat, à une concentration comprise entre 1 et 2 mM [Govindaraju *et al.* (2000)].

Les groupements chimiques de l'aspartate donnent des résonances constituées d'un doublet de doublets à 3.89 ppm et d'une paire de doublet de doublets à 2.67 ppm et à 2.80 ppm.

Il participe au cycle de l'urée et à la gluconéogenèse.

- Les **composés à Choline (tCho)** formant le signal de résonance de la choline totale notée tCho, sont la **Choline libre (Cho)**, la **GlycéroPhosphorylCholine (GPC)** et la **PhosphorylCholine (PCho)** [Miller *et al.* (1996)].

Les composés à choline ont une concentration généralement inférieure à 1 mM [Pfeuffer *et al.* (1999)].

En SRM ^1H , le signal de résonance de la choline totale est principalement observé sous la forme d'un important singulet à 3.2 ppm.

Les composés contenant de la choline sont impliqués dans les voies de synthèse et de dégradation des phospholipides reflétant ainsi le renouvellement des membranes et les changements de la densité cellulaire. Une forte augmentation de la choline est couramment observée dans les cancers [Gillies & Morse (2005)] alors qu'une diminution est particulièrement associée aux AVC [Malisza *et al.* (1998)]. Les variations

de la concentration de la choline totale sont ainsi généralement associées à des altérations de la composition membranaire. Toutefois, l'interprétation biochimique de ces variations demeure compliquée à cause des nombreuses contributions du signal de résonance de la choline totale.

- La **Créatine (Cr)** et la **PhosphoCréatine (PCr)** ont un rôle central dans le métabolisme énergétique cellulaire [Wallimann *et al.* (1992)].

En SRM ^1H , les résonances, composées de singulets à 3.03 ppm et à 3.91 ppm, proviennent des protons des groupements méthyle et méthylène de la créatine et de la phosphocréatine (créatine phosphorylée). Ensembles, elles sont souvent désignées sous le nom de **créatine totale** notée **tCr**.

Il a été rapporté que la créatine totale sert de tampon énergétique, en maintenant des niveaux constants d'ATP (nucléotide fondamental dans la production de l'énergie cellulaire), et de navette énergétique, en diffusant depuis les sites producteurs d'énergie vers les sites utilisateurs d'énergie.

La concentration cérébrale de tCr, chez le petit animal, est généralement comprise entre 8 et 9 mM [Pfeuffer *et al.* (1999); Tkáč *et al.* (2003)]. Cette concentration, étant relativement constante en dépit de l'âge et de plusieurs pathologies, est fréquemment utilisée comme une référence de concentration interne pour la quantification. Toutefois, il est nécessaire de rester prudent sur l'utilisation d'une référence de concentration interne car, en effet, dans le cas de la créatine totale, une diminution de son signal de résonance a pu être observée dans certaines pathologies telles que les tumeurs et les AVC.

- Le **Glucose (Glc)** est un composant essentiel en tant que principale source d'énergie et comme précurseur d'un certain nombre de composés et sa régulation demeure être un enjeu physiologique majeur.

La concentration cérébrale de glucose est d'environ 1 mM mais peut être augmentée jusqu'à 5 mM par une perfusion intraveineuse de glucose.

Son spectre RMN ^1H se compose d'un multiplet complexe situé entre 3.2 et 3.9 ppm et qui se visualise généralement par deux larges résonances à 3.43 ppm et à 3.8 ppm [Govindaraju *et al.* (2000)].

- Le **Glutamate (Glu)** est l'acide aminé non essentiel le plus abondant dans le cerveau et est connu pour être un neurotransmetteur excitateur majeur jouant un rôle dans les mécanismes d'apprentissage et de mémorisation [Erecinska (1990)]. Il est également le précurseur direct du principal neurotransmetteur inhibiteur, le GABA.

Le glutamate est présent à une concentration moyenne comprise entre 6 et 12.5 mM dans le cerveau du rat [Pfeuffer *et al.* (1999); Tkáč *et al.* (2003)].

Il possède deux groupes méthylène et un groupe méthine donnant lieu à un spectre complexe avec des résonances de faibles intensités. La résonance du proton unique du groupe méthine apparaît comme un doublet de doublets à 3.74 ppm tandis que les résonances des autres protons des groupes méthylène apparaissent comme des multiplets entre 2.04 et 2.35 ppm.

- La **Glutamine (Gln)** est l'un des acides aminés utilisés dans le métabolisme intermédiaire et la biosynthèse des protéines et est localisée dans les astrocytes. Elle est également un précurseur et une forme de stockage du glutamate et se trouve à une concentration comprise entre 2 et 4 mM dans le cerveau du rat.

La glutamine possède une structure chimique similaire au glutamate avec un groupe méthine et deux groupes méthylène. Par conséquent, leurs déplacements chimiques et leurs interactions de couplage scalaire sont également similaires donnant lieu à une contribution combinée nommée **complexe glutamine + glutamate** et notée **Glx** [Ross (1991)]. Son signal présente des résonances multiples situées entre 2 et 3.8 ppm causant un élargissement du pied gauche du signal de résonance du NAA.

- Le **Lactate (Lac)** est le produit final de la glycolyse anaérobie et est naturellement présent dans le tissu cérébral à une faible concentration (environ 0.5 mM) le rendant difficilement observable en SRM ^1H .

De fortes augmentations de la concentration de lactate ont pu être observées dans une grande variété de pathologies dans lesquelles le flux sanguin (et donc l'apport en oxygène) est restreint. C'est le cas, par exemple, des AVC ischémiques [Muñoz Maniega *et al.* (2008)] et des tumeurs [Bruhn *et al.* (1989a)]. Des augmentations transitoires de lactate ont également été observées dans le cerveau humain à la suite d'une activation fonctionnelle [Sappey-Marinier *et al.* (1992)].

La résonance caractéristique du lactate est un doublet présent à 1.31 ppm. Cependant, cette région spectrale étant polluée par la présence des résonances des lipides et des macromolécules, des séquences d'édition du lactate ont été développées afin d'améliorer la justesse de sa quantification [Wild & Marshall (1999)].

- Le **myo-Inositol (mI)** est la forme isomère de l'inositol la plus abondante trouvée dans les tissus.

En raison de sa concentration élevée (de l'ordre de 4 à 8 mM), il est facilement détectable par SRM ^1H .

Le myo-inositol possède six protons qui donnent lieu à quatre groupes de résonances. Les deux multiplets les plus importants sont sous la forme d'un doublet de doublets centré à 3.52 ppm et d'un triplet à 3.61 ppm. Un triplet à 3.27 ppm est généralement masqué par la résonance de la choline totale et un autre à 4.05 ppm n'est généralement pas observé en raison de la suppression du signal de l'eau.

La fonction du myo-inositol n'est pas encore bien comprise bien qu'il semble jouer un rôle dans la régulation osmotique, dans la croissance cellulaire et dans le stockage du glucose [Ross (1991)]. Il a également été proposé comme marqueur glial [Brand *et al.* (1993)], bien que cette caractéristique ait été remise en question par sa détection dans divers types de cellules neuronales [Sherman *et al.* (1977)].

- La **Taurine (Tau)** est un acide aminé possédant un rôle d'osmorégulateur et de modulateur de l'action des neurotransmetteurs [Oja & Saransaari (1996)]. Elle est principalement obtenue à partir des aliments, bien qu'elle puisse également être synthétisée dans le cerveau à partir d'autres acides aminés contenant du soufre.

La concentration de la taurine dépend fortement de l'âge, passant d'environ 12 mM à la naissance à entre 6 et 8 mM dans le cerveau du rat adulte [Tkáč *et al.* (2003)]. La taurine possède deux groupes méthylène avec des protons non équivalents donnant deux triplets centrés à 3.25 ppm et à 3.42 ppm. Lors de la quantification des composés à choline, il est nécessaire de prendre des précautions car le signal de résonance de la taurine peut constituer une fraction significative du signal de résonance de tCho par le chevauchement de leurs résonances respectives.

De plus, il est important de noter qu'une fraction significative du signal observé, par SRM ^1H , doit être attribuée aux résonances macromoléculaires sous-jacentes à celles des métabolites (cf. **figure 2.17**).

Les travaux de Behar & Ogino (1993) ont étudié de manière approfondie les résonances macromoléculaires dans le cerveau du rat et un minimum de dix résonances macromoléculaires a pu être observé ((M1) à 0.93 ppm, (M2) à 1.24 ppm, (M3) à 1.43, (M4) à 1.72 ppm, (M5) à 2.05 ppm, (M6) à 2.29 ppm, (M7) à 3.00 ppm, (M8) à 3.20 ppm, (M9) à 3.8-4.0 ppm et (M10) à 4.3 ppm).

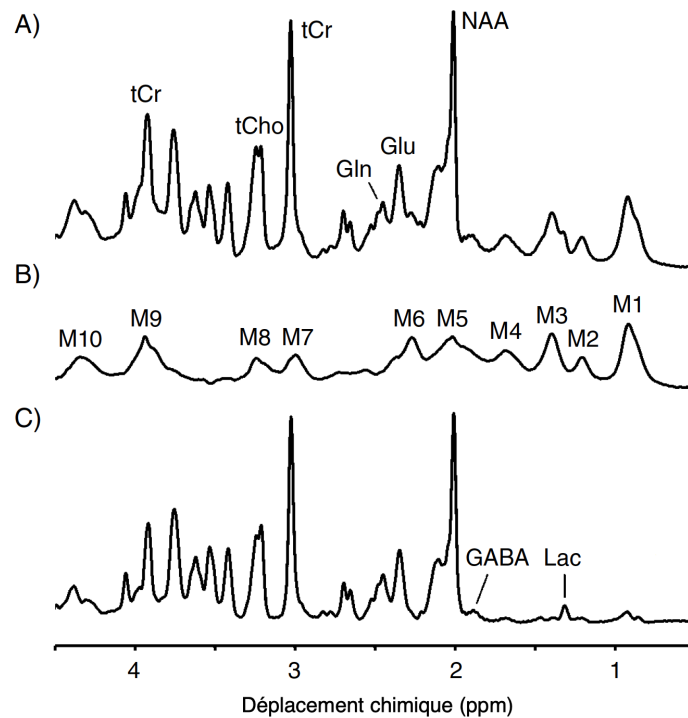


Figure 2.17. Détection et suppression des résonances des macromolécules dans un spectre RMN ^1H *in vivo* du cerveau de rat [De Graaf (1998)]. (A) Spectre RMN ^1H du cerveau de rat acquis avec une séquence de spectroscopie localisée à 9.4 T (TR/TE = 4000/12 ms, volume du voxel = 180 μl). Les résonances des métabolites sont superposées à une ligne de base comprenant les résonances des macromolécules plus larges. (B) Même protocole de spectroscopie que (A) avec l'application de deux impulsions d'inversion non sélectives (TR/TI₁/TI₂ = 3250/2100/630 ms). (C) Spectre exempt des résonances des macromolécules suite à la soustraction de (A)-(B) permettant de faciliter, par exemple, l'observation des résonances du lactate et du GABA.

2.2 L'antenne radiofréquence (RF)

Le développement de la RMN, présentée dans la partie précédente, ne cesse de s'accroître et l'intérêt porté à la conception de nouvelles antennes radiofréquences (RF), composants cruciaux des systèmes RMN, est indiscutable.

Les antennes RF sont généralement classées en deux voire trois catégories : les antennes d'émission RF (Tx pour *transmit coil*, en anglais), les antennes de réception RF (Rx pour *receive coil*, en anglais) et les antennes d'émission et de réception RF (Tx/Rx pour *transceiver coil*, en anglais).

L'antenne d'émission est responsable de la production de l'onde RF \vec{B}_1 qui fait basculer l'aimantation macroscopique (cf. **paragraphe 2.1.1.2**) dans le plan orthogonal au champ magnétique statique \vec{B}_0 . Le champ magnétique \vec{B}_1 doit être le plus homogène possible afin que tous les spins présents dans le volume étudié reçoivent la même quantité d'énergie RF.

L'antenne de réception est responsable de la détection du signal de la FID (cf. **paragraphe 2.1.1.5**) produit par la décroissance de l'aimantation transversale pendant la phase de relaxation. Elle doit être sensible et posséder la meilleure sélectivité spatiale et temporelle possible.

Généralement, deux antennes distinctes (une antenne d'émission et une antenne de réception) sont utilisées pour effectuer les expériences RMN mais il est, toutefois, faisable d'utiliser une seule et même antenne pour effectuer ces deux fonctions et cela se base sur le principe de réciprocité (cf. **paragraphe 2.1.1.5**).

Deux types d'antennes sont principalement distinguables par leur volume de détection (appelé aussi volume de sensibilité) caractéristique : les antennes volumiques et les antennes surfaciques.

Les antennes volumiques entourent complètement l'échantillon observé et sont caractérisées par une réponse spatiale homogène et donc un champ \vec{B}_1 relativement homogène.

Leur grand volume de détection permet l'observation de la totalité des structures, qu'elles soient profondes ou superficielles.

L'inconvénient de ce type d'antennes réside dans le fait qu'elles collectent le bruit provenant de tout le volume de l'échantillon impactant ainsi la sensibilité de détection et le RSB de l'image ou du spectre résultant.

Contrairement aux antennes volumiques, les antennes surfaciques sont placées au contact de la zone d'intérêt.

La meilleure concordance entre la taille de l'antenne et la taille de l'échantillon présente un double intérêt augmentant ainsi le RSB : l'amélioration du couplage magnétique entre l'échantillon et l'antenne et la diminution du bruit en provenance de l'échantillon.

En revanche, les antennes surfaciques sont principalement adaptées pour l'observation de structures peu profondes car elles génèrent un champ magnétique \vec{B}_1 moins homogène entraînant un volume de détection plus restreint que celui des antennes volumiques.

La mise en réseau de plusieurs antennes surfaciques permet alors de conserver un volume de détection comparable à celui des antennes volumiques tout en bénéficiant de la forte sensibilité locale des antennes surfaciques. Le signal final est alors reconstitué par la combinaison des signaux individuels de chaque antenne.

Dans la suite de cette partie restreinte aux antennes RF surfaciques, une description de leurs caractéristiques et de leurs composants est effectuée.

2.2.1 Paramètres caractéristiques

2.2.1.1 Modélisation électrique

Une antenne de détection RF se représente habituellement par un circuit RLC résonant couplé inductivement à l'échantillon observé, avec R, une résistance, L, une inductance et C, une capacité.

En réalité, l'antenne de détection RF représente l'inductance L qui dépend de la taille et de la forme de la boucle constituant l'antenne et R , l'ensemble des pertes de cette dernière.

La capacité C peut être placée en parallèle ou en série de l'inductance L pour former un circuit RLC (**figure 2.18**).

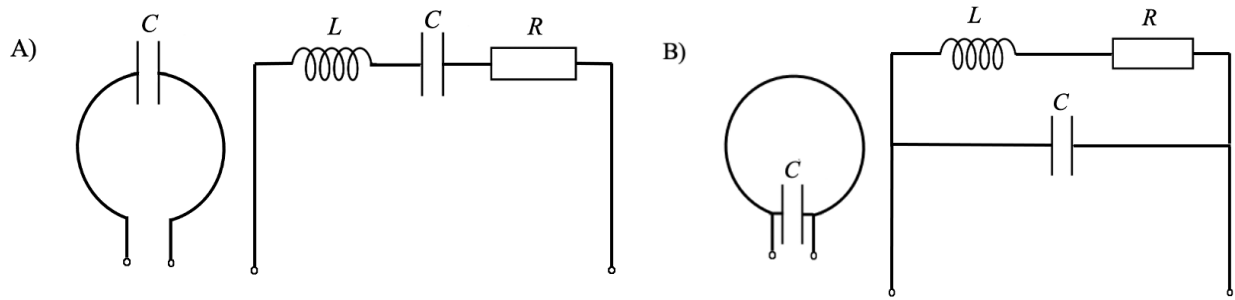


Figure 2.18. Géométrie de base d'une antenne de détection RF avec un circuit RLC (A) Circuit RLC en série. (B) Circuit RLC en parallèle.

Les impédances $Z_{série}$ et $Z_{parallèle}$ des circuits RLC en série et en parallèle sont données par :

$$Z_{série} = R + jL\omega + \frac{1}{jC\omega} = R + j\left(L\omega - \frac{1}{C\omega}\right) \quad (8)$$

$$\frac{1}{Z_{parallèle}} = \frac{1}{R + jL\omega} + jC\omega \quad (9)$$

avec R , l'impédance de la résistance R , $jL\omega$, l'impédance de la bobine d'inductance L , $\frac{1}{jC\omega}$, l'impédance de l'élément capacitif de capacité C et ω , la pulsation.

En posant $X_C = \frac{1}{C\omega}$ et $X_L = L\omega$, l'impédance $Z_{parallèle}$ est égale à :

$$Z_{parallèle} = \frac{RX_C^2}{R^2 + (X_L - X_C)^2} - jX_C \frac{R^2 + X_L(X_L - X_C)}{R^2 + (X_L - X_C)^2} \quad (10)$$

Les circuits sont résonants lorsque les parties imaginaires de $Z_{série}$ et de $Z_{parallèle}$ sont nulles, c'est-à-dire, lorsque :

$$Im(Z_{série}) = 0 \rightarrow LC\omega^2 = 1 \quad (11)$$

$$Im(Z_{parallèle}) = 0 \rightarrow LC\omega^2 = 1 - \frac{R^2C}{L} \approx 1 \quad (12)$$

En IRM, le terme $\frac{R^2L}{C}$ est très inférieur à 1 et peut donc être négligé [Mispelter *et al.* (2015)].

2.2.1.2 Fréquence de résonance, accord et adaptation

Pour optimiser la conversion du champ magnétique émis par les spins du volume observé en tension induite dans l'antenne de détection RF tout en effectuant un filtrage fréquentiel, l'antenne de détection RF doit être parfaitement accordée à la fréquence de Larmor ω_0 (cf. **paragraphe 2.1.1.2**).

Par la condition de résonance déterminée à la section précédente, nous devons donc avoir :

$$LC\omega_0^2 = 1 \rightarrow \omega_0 = \frac{1}{\sqrt{LC}} \rightarrow f_0 = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}} \quad (13)$$

avec $f_0 = 298$ MHz, pour une intensité du champ magnétique statique \vec{B}_0 de 7 T.

L'accord de l'antenne de détection RF à la fréquence de Larmor peut être effectué par l'ajustement de l'inductance L et/ou de la capacité C en rajoutant des composants discrets sur le circuit électronique de l'antenne.

Habituellement, l'antenne RF est accordée par la présence d'un condensateur variable appelé condensateur d'accord placé, soit en série, soit en parallèle de la boucle formant l'antenne RF.

De plus, les connexions entre l'antenne de détection RF et le spectromètre (système de résonance magnétique responsable de la production d'images et de spectres incluant la chaîne d'amplification, de numérisation et de traitement des signaux) sont généralement réalisées par des câbles coaxiaux ayant une impédance caractéristique nommée Z_0 et égale à 50 Ω .

Afin d'optimiser et de maximiser le transfert de puissance de l'antenne à la chaîne du spectromètre, il est nécessaire que l'antenne de détection RF et le câble coaxial aient la même impédance. Cette étape est nommée adaptation en puissance.

Une désadaptation de l'impédance rend la chaîne de détection moins efficace car une partie de l'onde est réfléchi entraînant une diminution de la puissance transmise.

Comme pour l'accord de l'antenne de détection RF, l'adaptation en puissance peut s'effectuer par l'ajustement d'un condensateur variable appelé condensateur d'adaptation. Une autre méthode peut également être utilisée et se base sur un couplage inductif entre l'antenne de détection RF et une boucle de couplage accordée à la fréquence de Larmor et positionnée à proximité de l'antenne de détection RF (cf. **figure 2.19**) [Mispelter *et al.* (2015)].

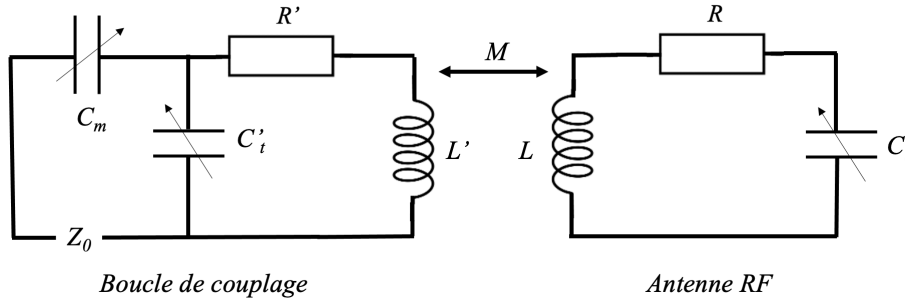


Figure 2.19. Schéma électronique du couplage inductif entre une boucle de couplage et une antenne RF. Le couplage se produit entre les inductances L' et L . R' et R sont des résistances traduisant les pertes et C_t , C'_t et C_m correspondent respectivement aux condensateurs d'accord et d'adaptation.

L'ajustement de la position de la boucle de couplage permet alors, par l'interception des lignes de champ magnétique par la boucle de couplage, de modifier l'inductance mutuelle M entre cette dernière et l'antenne RF et ainsi transformer l'impédance équivalente pour atteindre la valeur de 50Ω [Hoult & Tomanek (2002)].

Bien que l'adaptation par couplage inductif présente différents avantages comme, par exemple, un meilleur équilibrage du champ électrique, nous avons choisi d'adapter l'impédance par un couplage capacitif plus facile à mettre en oeuvre dans le cas de nos micro-antennes RMN implantables développées.

Ainsi, le circuit d'accord et d'adaptation de base, par couplage capacitif, d'une antenne de détection RF est composé de deux condensateurs variables, un condensateur d'accord placé en parallèle (**figure 2.20.A**) ou en série (**figure 2.20.B**) du circuit résonant et un condensateur d'adaptation.

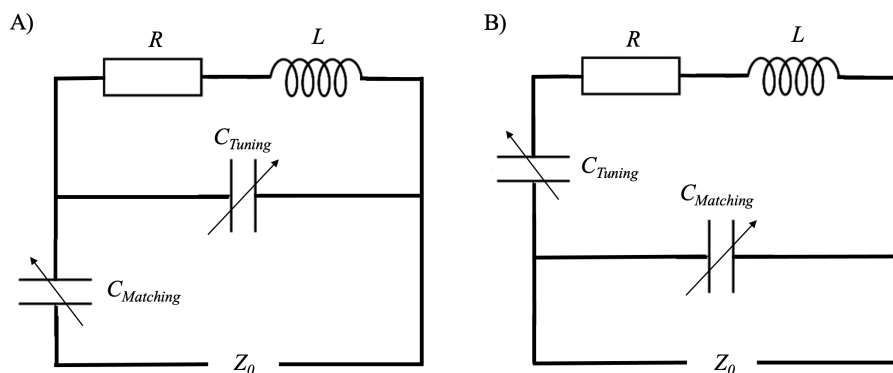


Figure 2.20. Circuits électroniques d'une antenne de détection RF avec l'accord et l'adaptation par couplage capacitif. (A) Accord en parallèle. (B) Accord en série.

Il est, cependant, important de noter que les deux étapes d'accord et d'adaptation, réalisées en présence de l'échantillon, sont liées et que l'ajustement de la valeur du condensateur d'accord aura un léger impact sur l'adaptation en puissance et que l'ajustement de la valeur du condensateur d'adaptation aura un léger impact sur la fréquence de résonance de

l'antenne.

2.2.1.3 Facteur de qualité

Le facteur de qualité, Q , est l'une des grandeurs utilisées pour décrire et évaluer les performances d'une antenne RF.

Il est défini comme le rapport entre l'énergie magnétique emmagasinée dans l'inductance de l'antenne RF et l'énergie dissipée dans la résistance équivalente de l'antenne RF.

Le facteur de qualité peut alors être relié aux paramètres électriques du circuit de l'antenne de détection RF par l'équation suivante :

$$Q = \frac{1}{R} \sqrt{\frac{L}{C}} = \frac{\omega_0 L}{R} \quad (14)$$

avec L , l'inductance équivalente, ω_0 , la fréquence de résonance et R , la résistance équivalente représentant la somme des résistances des pertes induites dans l'antenne.

En fonction de la présence ou non de l'échantillon observé lors de la mesure du facteur de qualité, il est possible de définir deux grandeurs appelées facteur de qualité à vide, notée Q_v et facteur de qualité en charge, notée Q_c .

En présence de l'échantillon, la résistance équivalente comprend la résistance propre de l'antenne, notée R_a , et la résistance induite par l'échantillon, notée R_i , et qui seront discutées dans le **paragraphe 2.2.2**.

Le facteur Q_c s'exprime donc :

$$Q_c = \frac{\omega_0 L}{R_a + R_i} \quad (15)$$

En l'absence de l'échantillon, seule la résistance propre de l'antenne intervient dans la définition du facteur Q_v :

$$Q_v = \frac{\omega_0 L}{R_a} \quad (16)$$

Il est alors possible de déterminer la contribution de la résistance des pertes induites dans l'antenne par l'échantillon en soustrayant le facteur de qualité en charge du facteur de qualité à vide.

De plus, la qualité d'un circuit résonant se caractérise également par sa capacité à transmettre et à amplifier le signal à la fréquence de résonance tout en atténuant le bruit et en n'amplifiant pas le signal aux autres fréquences.

Le facteur Q est ainsi défini par l'équation suivante :

$$Q = \frac{\omega_0}{\Delta\omega_{3dB}} \quad (17)$$

avec ω_0 , la fréquence de résonance et $\Delta\omega_{3dB}$, la bande passante à -3 dB de l'antenne.

Ainsi, une antenne de détection RF doit posséder le facteur Q le plus élevé possible. En effet, en termes de sélectivité fréquentielle, l'amplification du signal n'aura lieu que dans une bande passante très étroite autour de la fréquence de résonance et, en termes d'énergie, la tension mesurée aux bornes de l'antenne de détection RF étant proportionnelle au facteur Q et à la force électromotrice, un facteur Q élevé contribuera à une meilleure détection du signal [Redpath (1998)].

2.2.1.4 Facteur de remplissage

Le facteur de remplissage, noté η , est une grandeur permettant d'introduire le concept de correspondance géométrique entre l'antenne de détection RF et l'échantillon.

Il est défini comme le rapport entre l'énergie magnétique stockée dans l'échantillon et l'énergie magnétique totale stockée par l'antenne de détection RF [Hoult & Richards (1976)].

Généralement, cela peut s'exprimer comme le rapport entre le volume total de l'antenne de détection RF et le volume de l'échantillon placé dans l'antenne [Hoult & Richards (1976)].

En pratique, un facteur de remplissage élevé est obtenu par le placement de l'antenne de détection RF au plus près de l'échantillon expliquant alors l'intérêt d'utiliser des antennes extracorporelles souples ou des antennes implantées.

2.2.1.5 Sensibilité et volume de détection RF

La sensibilité d'une antenne de détection RF est généralement décrite par un facteur de sensibilité noté S_{RF} et qui est dépendant du facteur de qualité Q et du facteur de remplissage η selon l'équation suivante [Darrasse & Ginefri (2003)] :

$$S_{RF} \approx \sqrt{\eta Q} \quad (18)$$

2.2.2 Bruit de l'antenne et pertes durant la détection

Au cours d'une acquisition RMN, deux principaux mécanismes de pertes sont à l'origine du bruit obtenu durant la réception du signal.

Nous pouvons dissocier ces mécanismes en fonction de leur origine, un relatif à l'antenne et les deux autres, relatifs à l'échantillon.

Toutes ces différentes notions sont extraites des travaux de Hoult & Richards (1976) et de Chen & Hoult (1989).

2.2.2.1 Pertes propres dans l'antenne

Les pertes propres dans l'antenne proviennent de l'agitation thermique des charges présentes dans le conducteur constituant l'antenne de détection RF.

A haute fréquence, un phénomène appelé effet de peau réduit la pénétration du courant dans les milieux conducteurs augmentant ainsi la résistance propre de l'antenne R_a lorsque l'intensité du champ magnétique statique \vec{B}_0 augmente.

La résistance propre R_a d'une antenne de forme circulaire de rayon a , faite avec un fil d'un matériau conducteur (comme le cuivre, par exemple) de rayon r et de résistivité ρ_c est donnée par l'expression suivante :

$$R_a = \sqrt{\frac{\rho_c \mu_0 \omega_0 \xi a}{2r}} \quad (19)$$

avec μ_0 , la perméabilité magnétique du vide, ω_0 , la fréquence de Larmor et ξ , un facteur de proximité.

2.2.2.2 Pertes diélectriques et magnétiques dans l'échantillon

En plus des pertes précédemment décrites et propres à l'antenne de détection RF, il existe également des pertes induites dans l'antenne et qui peuvent être réparties en deux catégories : les pertes magnétiques induites par l'échantillon et les pertes diélectriques dans les tissus.

Pertes magnétiques induites par l'échantillon

Sous l'effet de l'agitation thermique, les charges contenues dans le volume de l'échantillon produisent du bruit dans l'antenne dû à la circulation de courants de Foucault. L'échantillon et l'antenne de détection étant couplés inductivement, le bruit est induit dans l'antenne par ce même couplage, également responsable de la réception de l'aimantation constituant le signal RMN.

De façon générale, ces pertes représentent le bruit du couplage magnétique à l'antenne et sont associées à une résistance induite R_i qui, pour une antenne de forme circulaire de rayon a et placée contre un échantillon de surface plane et de conductivité σ , s'exprime par :

$$R_i = \frac{1}{3} \sigma \mu_0^2 \omega_0^2 a^3 \quad (20)$$

avec μ_0 , la perméabilité magnétique du vide et ω_0 , la fréquence de Larmor.

Pertes diélectriques dans les tissus

Les pertes diélectriques dans les tissus sont occasionnées par le couplage capacitif présent entre les tissus et l'antenne de détection RF.

En effet, la différence de potentiel créée par le courant RF provoque une traversée des

lignes de champ électrique qui atteignent la surface de l'échantillon induisant ainsi des pertes diélectriques.

Ce bruit n'étant pas couplé à l'antenne RF par le couplage inductif, il est possible de le réduire par la conception de l'antenne de détection RF, notamment en répartissant les capacités le long du conducteur afin d'équilibrer le potentiel électrique par rapport à l'échantillon [Decorps *et al.* (1985)].

2.2.2.3 Définition du rapport signal-sur-bruit

Le rapport signal-sur-bruit (RSB) est un paramètre permettant de caractériser la qualité des acquisitions RMN en imagerie et en spectroscopie.

En effet, lors d'une acquisition RMN, le signal reçu par l'antenne de détection RF se compose à la fois du signal RMN contenant de l'information utile mais aussi d'un signal parasite représentant le bruit.

Il est défini, dans le domaine temporel, par la formule suivante :

$$RSB = \frac{\text{Amplitude du signal RMN}}{\text{Valeur quadratique moyenne du bruit}} \quad (21)$$

Parmi les pertes décrites ci-dessus, les pertes propres à l'antenne et les pertes magnétiques induites par l'échantillon sont prédominantes devant les pertes diélectriques dans les tissus. Il existe également des pertes dans l'environnement qui sont généralement négligeables par la construction des systèmes RMN.

C'est la raison pour laquelle nous considérons uniquement les pertes propres à l'antenne et les pertes magnétiques induites par l'échantillon pour exprimer la valeur quadratique moyenne du bruit.

Ces deux mécanismes de pertes reposent sur l'agitation thermique des porteurs de charges évoquant la notion de bruit thermique. Ce phénomène peut être modélisé par le bruit de Johnson-Nyquist exprimé à travers la tension de bruit ν définie par [Johnson (1928)] :

$$\nu = \sqrt{4k_b(R_i T_i + R_a T_a)\Delta f} \quad (22)$$

avec k_b , la constante de Boltzmann, R_i , la résistance induite par l'échantillon, T_i , la température locale de l'échantillon, R_a , la résistance propre de l'antenne, T_a , la température locale de l'antenne et Δf , la bande passante.

Ainsi, en combinant, les **équations 5 et 22**, l'expression du RSB est la suivante :

$$RSB \approx \frac{\omega_0 M_0 \sin \alpha \frac{B_1}{T} \delta V}{\sqrt{4k_b(R_i T_i + R_a T_a)\Delta f}} \quad (23)$$

avec α , l'angle de basculement de l'aimantation, M_0 , l'amplitude de l'aimantation macroscopique initiale \vec{M}_0 , ω_0 , la fréquence de Larmor, $\frac{B_1}{T}$, le coefficient d'induction, δV ,

le volume de l'échantillon analysé, k_b , la constante de Boltzmann, R_i , la résistance induite par l'échantillon, T_i , la température locale de l'échantillon, R_a , la résistance propre de l'antenne, T_a , la température locale de l'antenne et Δf , la bande passante.

De cette expression du RSB, il est également possible d'exprimer le facteur de sensibilité S_{RF} , déjà défini au **paragraphe 2.2.1.5**, par :

$$S_{RF} = \frac{\omega_0 \frac{B_1}{I}}{\sqrt{4k_b(R_i T_i + R_a T_a)}} \quad (24)$$

avec ω_0 , la fréquence de Larmor, $\frac{B_1}{I}$, le coefficient d'induction, δV , le volume de l'échantillon analysé, k_b , la constante de Boltzmann, R_i , la résistance induite par l'échantillon, T_i , la température locale de l'échantillon, R_a , la résistance propre de l'antenne, T_a , la température locale de l'antenne et Δf , la bande passante.

Comme le montre l'équation précédente, la sensibilité de l'antenne RF dépend linéairement du coefficient d'induction, $\frac{B_1}{I}$.

En utilisant la loi de Biot-Savart, il est alors possible de calculer l'amplitude du champ \vec{B}_1 produit par une antenne parcourue par un courant I . Pour une antenne circulaire de rayon a , l'amplitude du champ \vec{B}_1 créé à une distance d le long de l'axe de l'antenne et normalisé par le courant I , s'exprime par [Jackson (1998)] :

$$\frac{B_1}{I} = \frac{\mu_0}{2} \frac{a^2}{(a^2 + d^2)^{\frac{3}{2}}} \quad (25)$$

avec μ_0 , la perméabilité magnétique du vide.

Toutefois, ce coefficient d'induction ne tient pas compte des pertes résistives dans l'antenne. Par le théorème de réciprocité, la sensibilité de l'antenne est définie par sa capacité à créer un champ magnétique en fonction de la puissance dissipée et elle peut donc être relié au rapport suivant :

$$\frac{B_1}{\sqrt{P}} = \frac{B_1}{I\sqrt{R}} \quad (26)$$

avec R , la résistance équivalente de l'antenne.

2.2.2.4 Domaines de prédominance du bruit de l'antenne et de l'échantillon

Lors du développement d'antennes RF utilisées pour la micro-imagerie et la micro-spectroscopie par résonance magnétique des faibles volumes, il est nécessaire de connaître les différentes zones de prédominance du bruit.

En effet, en fonction de la température locale de l'antenne, T_a , du rayon de l'antenne de forme circulaire, a , et de la fréquence de résonance de cette dernière, le bruit propre de l'antenne, proportionnel à $R_a T_a$, peut être prédominant par rapport au bruit induit par

l'échantillon, proportionnel à $R_i T_i$, et vis-versa.

La **figure 2.21** présente les domaines de prédominance du bruit de l'échantillon et de l'antenne en fonction des trois caractéristiques de cette dernière, sa température de fonctionnement, sa taille et sa fréquence de résonance.

Cette figure, tirée des travaux de [Darrasse & Ginefri \(2003\)](#), a été obtenue en utilisant les **équations 19 et 20** définissant R_a , la résistance propre de l'antenne, et R_i , la résistance induite par l'échantillon. Un échantillon de conductivité $\sigma = 0.66$ S/m, conductivité moyenne des tissus biologiques, et de température égale à 310 K, et une antenne surfacique classique de rayon a et en cuivre de qualité standard ont été considérés pour les calculs. La distance entre l'échantillon et l'antenne a été définie comme étant nulle.

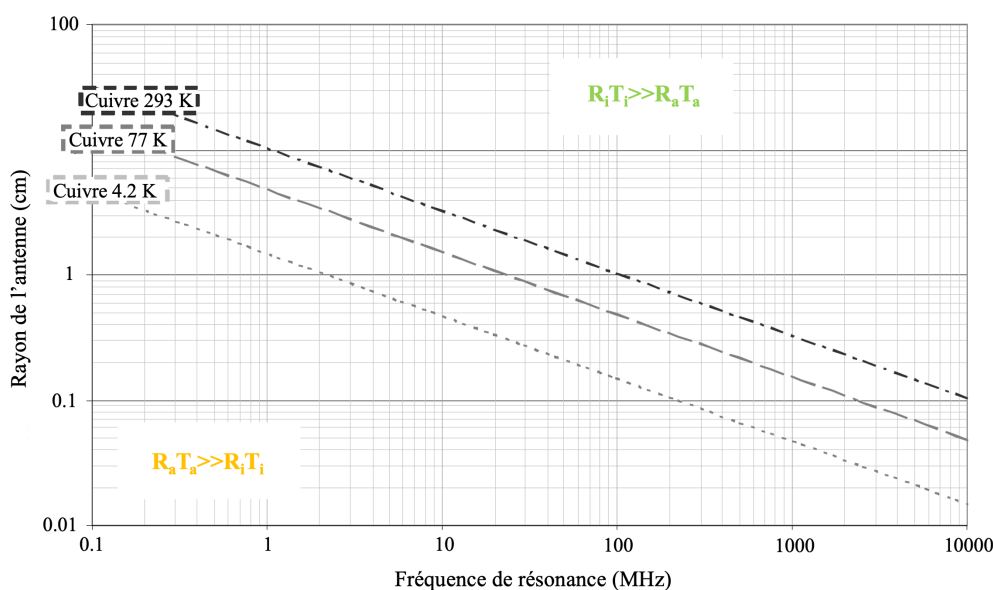


Figure 2.21. Domaines de prédominance du bruit de l'échantillon et de l'antenne en fonction de la température de fonctionnement de l'antenne, de la taille de l'antenne et de la fréquence de résonance [[Darrasse & Ginefri \(2003\)](#)].

Pour les trois températures de l'antenne (293 K, 77 K, la température classiquement utilisée avec l'azote liquide, et 4.2 K, la température classiquement utilisée avec l'hélium liquide), les lignes en pointillés représentent une frontière définie par l'égalité $R_a T_a = R_i T_i$. Cette égalité délimite les zones de dominance soit du bruit propre de l'antenne ($R_a T_a \gg R_i T_i$), soit du bruit induit par l'échantillon ($R_i T_i \gg R_a T_a$).

Ce graphique a mis en avant l'intérêt potentiel de l'utilisation d'une antenne refroidie. En effet, lorsque le taille de l'antenne ou la fréquence de résonance diminue, le bruit propre de l'antenne augmente jusqu'à devenir prédominant par rapport au bruit induit par l'échantillon.

Différentes stratégies ont été mises en oeuvre pour diminuer le bruit propre de l'antenne telles que le refroidissement par cryogénie ou l'utilisation de nouveaux matériaux supraconducteurs. Toutefois, ces techniques de cryogénie ne sont pas compatibles avec

l'utilisation d'antennes RMN implantables.

Alors, par la taille (quelques micromètres, cf. **paragraphe 3.2**) et par le matériau constitutif (le cuivre, cf. **paragraphe 3.2**) des micro-antennes RMN implantables développées dans ces travaux et par le champ magnétique statique utilisé (7 T, soit une fréquence de résonance de 298 MHz), nous nous sommes donc situés dans le domaine où le bruit propre de l'antenne était prédominant.

Ainsi, par l'équation 24, la sensibilité S_{RF} varie proportionnellement à l'inverse du rayon de l'antenne RF. Cela démontre donc que l'utilisation de micro-antennes RMN possédant une sensibilité de détection plus importante que les antennes conventionnelles de plus grande taille peut grandement faciliter l'acquisition de données RMN hautement résolues sur des échantillons de faible volume.

2.3 Micro-imagerie et micro-spectroscopie des faibles volumes

Dans cette partie, nous présentons les concepts de micro-imagerie et de micro-spectroscopie des faibles volumes et les antennes miniatures déjà utilisées en micro-IRM et SRM chez l'homme et le petit animal.

2.3.1 Intérêt et enjeux

Depuis le développement de ces deux méthodes de RMN, l'IRM et la SRM ne cessent d'être utilisées en recherche biomédicale et principalement dans la compréhension des processus physiopathologiques et dans l'exploration de nouveaux biomarqueurs caractéristiques de l'évolution d'une pathologie et de nouvelles cibles thérapeutiques. Le diagnostic précoce et le suivi thérapeutique représentent, en effet, deux enjeux fondamentaux permettant d'améliorer considérablement la prise en charge des pathologies.

Le ciblage précis de zones très spécifiques de certaines pathologies (comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer avec le noyau pédonculopontin et le noyau tegmental latérodorsal [Van Erum *et al.* (2019)] ou encore l'épilepsie avec l'hippocampe [Harms *et al.* (2022)]), le diagnostic précoce de tumeurs ou de lésions et le développement quasi-systématique de modèles animaux de pathologies humaines [Robinson *et al.* (2019)] entraînent l'exploration et l'analyse de régions d'intérêt de très faible volume (en général, de l'ordre du μL). Afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité de ces méthodes de RMN, de nombreuses stratégies d'amélioration du RSB ont été mises en oeuvre.

Les efforts technologiques visant à améliorer la sensibilité de la RMN ont consisté, par exemple, à augmenter l'intensité du champ magnétique statique \vec{B}_0 [Wada *et al.* (2010)], à développer des antennes refroidies par cryogénie [Darrasse & Ginefri (2003)], à utiliser le principe de l'imagerie parallèle avec le développement de réseaux d'antennes [Roemer

et al. (1990)] ou à modifier l'aimantation transversale moyenne par l'utilisation de produits de contraste [Yan *et al.* (2007)] ou par des techniques d'hyperpolarisation [Ebert *et al.* (1996)].

Une autre approche, qui s'inscrit dans ces travaux de thèse, consiste à développer des antennes RMN miniatures et implantables permettant d'améliorer la sensibilité de détection [Hoult & Richards (1976)].

En effet, depuis quelques années, la miniaturisation de l'antenne RF représente la meilleure façon d'adapter cette dernière à la taille de la zone d'intérêt de faible volume et ainsi d'améliorer le facteur de remplissage et la sensibilité de l'antenne.

En raison du volume de détection très restreint des antennes RMN miniatures et afin de pouvoir visualiser et explorer des structures profondes en RMN, il est alors nécessaire de les implanter dans les tissus d'intérêt. Elles deviennent, par conséquent, des dispositifs invasifs et leur conception doit le prendre en considération de manière à minimiser cet aspect. Pour cela, une attention particulière est généralement portée sur plusieurs facteurs tels que la taille, la géométrie et les matériaux constitutifs des antennes RMN miniatures implantables.

2.3.2 Micro-antennes existantes pour l'IRM et la SRM

Le terme « micro-antenne » est conventionnellement utilisé pour définir des antennes RMN possédant des dimensions inférieures à 1 mm, bien que d'autres antennes classiques ayant des tailles pouvant atteindre plusieurs centimètres peuvent également être qualifiées avec le terme « miniature ».

Comme nous l'avons vu précédemment et comme plusieurs travaux l'ont démontré [Wu *et al.* (1994); Olson *et al.* (1995); Peck *et al.* (1995)], l'utilisation de micro-antennes RMN (implantables ou non) présente un réel intérêt dans l'exploration d'échantillons de faible volume et dans l'amélioration de la sensibilité de détection.

Dans cette partie, nous tâchons de faire une description non exhaustive des principales micro-antennes RMN existantes, leurs différentes applications en IRM et en SRM ainsi que leur intérêt par rapport à l'utilisation d'antennes conventionnelles.

2.3.2.1 Micro-solénoïdes

Les micro-antennes solénoïdales, de section circulaire ou rectangulaire, possèdent une forme qui a été l'une des plus approfondies dans la littérature.

De nombreuses études portant sur l'influence des paramètres géométriques telles que les travaux de Hoult & Richards (1976) et de Peck *et al.* (1995) ont permis de relever la pertinence de cette géométrie, en RMN, offrant la plus grande sensibilité et la plus grande homogénéité du champ magnétique produit par rapport à d'autres types d'antennes RMN. Olson *et al.* (1995) ont étudié l'amélioration de la sensibilité par l'utilisation d'une micro-

antenne solénoïdale constituée d'un fil de cuivre de 50 μm de diamètre, d'une longueur de 1 mm, d'un diamètre extérieur de 470 μm et d'un volume de détection de 5 nL (cf. **figure 2.22**) par rapport à l'utilisation d'une antenne solénoïdale conventionnelle possédant un diamètre de 5 mm et un volume de détection d'environ 275 μL .

L'amélioration moyenne de la sensibilité par unité de masse (définie comme le rapport entre la sensibilité de la micro-antenne solénoïdale et la sensibilité de l'antenne conventionnelle) reportée était de 129.

Ainsi, l'amélioration moyenne de la sensibilité de 129 obtenue par l'utilisation de la micro-antenne solénoïdale peut être exploitée par la diminution du temps d'acquisition de 16 600 (129^2) ou par la possibilité d'effectuer une acquisition RMN avec seulement 0.8 % ($\frac{1}{129}$) de la masse de l'échantillon pour l'obtention de la même quantité et de la même qualité des données RMN et durant le même temps d'acquisition que lors de l'utilisation de l'antenne solénoïdale conventionnelle.

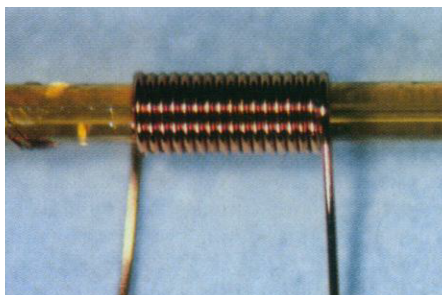


Figure 2.22. Micro-solénoïde de section circulaire entourant un capillaire en silice fondue revêtu de polyimide. Le micro-solénoïde est constitué d'un fil de cuivre de 50 μm de diamètre, d'une longueur de 1 mm, d'un diamètre extérieur de 470 μm et ayant un volume de détection (volume compris par la micro-antenne) de 5 nL. [Olson *et al.* (1995)].

Les micro-solénoïdes possèdent des domaines d'applications divers et variés comme, par exemple, en SRM à très haute résolution, avec les travaux de Subramanian & Webb (1998) qui ont démontré qu'en adaptant la taille du micro-solénoïde pour un échantillon possédant un volume de 1 μL , il a été possible d'obtenir des spectres ^{13}C ayant des résonances présentant une largeur à mi-hauteur de 2 Hz à une intensité de champ magnétique statique de 11.7 T.

Deux études *in vivo*, réalisées au sein de notre équipe, se sont basées sur l'utilisation d'un micro-solénoïde entourant un capillaire dont l'entrée était reliée à la sortie d'une membrane de microdialyse implantée dans le cerveau du rat [Crémillieux *et al.* (2018, 2019)].

Le dispositif expérimental est illustré à la **figure 2.23**.

Le micro-solénoïde, utilisé durant ces deux travaux, était constitué d'un fil de cuivre de 220 μm de diamètre et enroulé à la main (17 enroulements) autour d'un capillaire en polyimide ayant un diamètre intérieur et extérieur, de 750 μm et de 780 μm , respectivement. Il avait

une longueur de 4.8 mm et un volume de détection interne, de 2.1 μL .

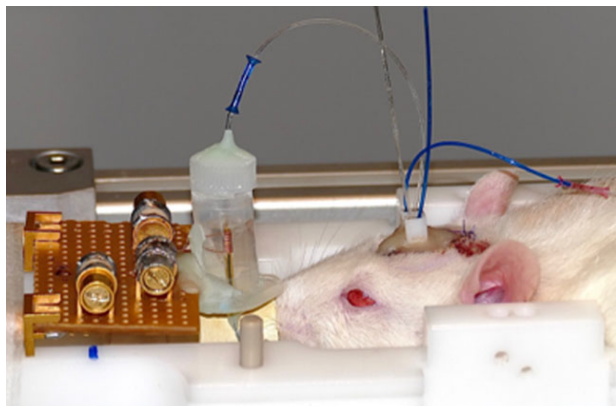


Figure 2.23. Une solution d'intérêt est perfusée par la membrane de microdialyse implantée dans le cerveau d'un rat anesthésié et placé dans le berceau du système RMN préclinique de 7 T. Le dialysat, en sortie de la membrane de microdialyse, passe dans le capillaire entouré par le micro-solénoïde (à gauche et positionné à l'isocentre de l'aimant) pour des acquisitions de SRM en temps réel [Crémillieux *et al.* (2018, 2019)].

Les objectifs de la première étude étaient de mettre en œuvre un protocole de SRM pour le profilage, en temps réel, de la concentration de lactate prélevé dans le fluide extracellulaire à l'aide d'une membrane de microdialyse implantée chez des rats porteurs de gliomes pendant l'administration d'un médicament antitumoral, l'oxamate, un inhibiteur du lactate déshydrogénase, couramment utilisé comme molécule antitumorale dans plusieurs modèles de cancers [García-Castillo *et al.* (2017); Yang *et al.* (2014)].

Durant la perfusion d'oxamate, une diminution régulière de la concentration de lactate a été observée chez tous les animaux avec une constante de temps moyenne de 4 minutes. La deuxième étude portait également sur le suivi, en temps réel, de la concentration de lactate lors d'une activation cérébrale entraînée par la stimulation de la vibrisse du rat. La membrane de microdialyse était alors implantée au niveau du cortex somatosensoriel associé à la vibrisse stimulée. Une augmentation de 40% de la concentration de lactate a été mesurée lors de la stimulation de la vibrisse dans le cortex somatosensoriel.

Ces deux travaux ont démontré le potentiel des micro-solénoïdes à suivre des fluctuations, en temps réel, de la concentration de divers métabolites afin d'obtenir notamment des informations plus précises sur les rôles propres à chaque métabolite en conditions physiopathologiques ou en neurosciences.

De plus, les micro-solénoïdes peuvent parfois être utilisés comme micro-antennes implantables et particulièrement pour la SRM *in vivo* [Berry *et al.* (2001)], l'IRM intravasculaire [Hillenbrand *et al.* (2004)] ou d'autres applications nécessitant l'introduction d'antennes RMN au sein d'un organe ou tissu [Rivera *et al.* (2008)].

Dans leur papier, Berry *et al.* (2001) ont décrit la conception d'un micro-solénoïde implantable ayant un diamètre extérieur d'environ 200 μm , une longueur de 580 μm et une

profondeur d'implantation d'environ 1 cm (cf. **figure 2.24**).

Le micro-solénoïde étant collé par une résine adhésive, l'échantillon observé se trouvait alors autour de la micro-antenne solénoïdale et seuls des essais *in vitro* dans un échantillon ayant un volume de 0.33 cm^3 ont été effectués et une bonne concordance entre les simulations et les expériences a été obtenue.

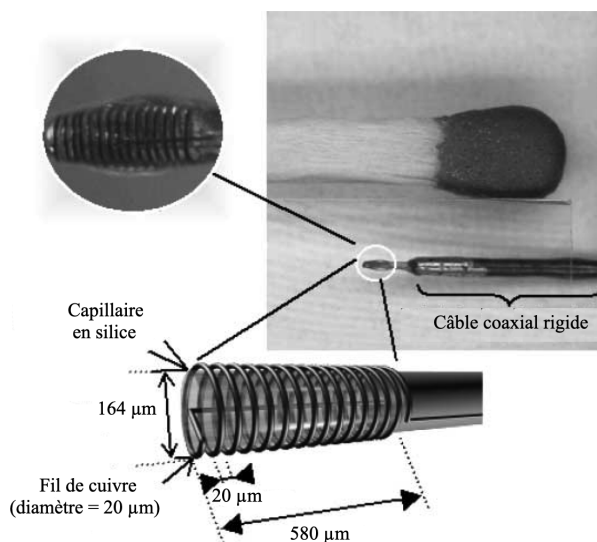


Figure 2.24. Schéma de la micro-antenne solénoïdale implantable [Berry *et al.* (2001)].

Afin d'améliorer les procédures endovasculaires guidées par l'IRM comprenant les étapes suivantes : le guidage par IRM du dispositif d'intervention vers la région cible, l'imagerie haute résolution de la région cible pour le diagnostic et enfin, la réalisation de l'intervention thérapeutique, Hillenbrand *et al.* (2004) ont mis au point un dispositif se composant de deux micro-solénoïdes indépendants enroulés dans des directions opposées, connectés à des canaux de réception séparés et montés colinéairement sur un cathéter angiographique (cf. **figure 2.25**).

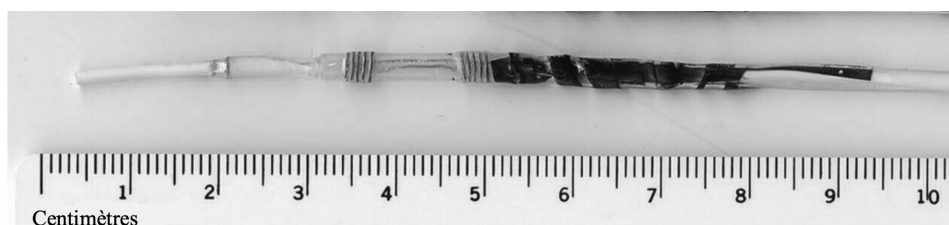


Figure 2.25. Dispositif comprenant deux solénoïdes de phase opposée, de taille géométrique et de motifs d'enroulement identiques (5 enroulements, espace de 1 cm entre les deux solénoïdes, diamètre du fil de cuivre : $255 \mu\text{m}$) [Hillenbrand *et al.* (2004)].

La **figure 2.26** représente une image IRM *in situ* de l'aorte abdominale de porc obtenue

par ce dispositif avec une résolution spatiale de $160 \times 160 \mu\text{m}^2$ dans le plan et avec un temps d'acquisition par coupe de 9 s.

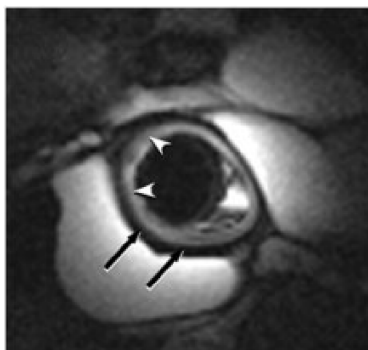


Figure 2.26. Image IRM *in situ* de l'aorte abdominale de porc obtenue avec le dispositif composé de deux micro-solénoïdes montés sur un cathéter angiographique. Un affaissement de l'aorte et un épaississement prononcé de la média (bord gris, pointes de flèches) et de l'adventice (bord noir, flèches), la couche centrale et externe de la paroi de l'aorte, ont été observés chez l'animal décédé [Hillenbrand *et al.* (2004)].

A noter que le caractère invasif de ce type d'antennes RMN utilisées lors de procédures endovasculaires peut être décrit comme moins important puisque ces dernières se placent dans la lumière des vaisseaux.

Plus récemment, Rivera *et al.* (2011) se sont appliqués à développer des micro-solénoïdes implantables ayant un volume de détection de l'ordre du microlitre et pour deux applications cliniques pour l'IRM (cf. **figure 2.27**).

La première application a été de comprendre les corrélations entre les formes épileptiques du lobe temporal et les changements métaboliques en associant le micro-solénoïde à une électrode intracrânienne afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique de l'épilepsie.

La deuxième application a été ciblée sur la détection précoce du cancer du sein en distinguant, avec une grande spécificité et sensibilité, le tissu mammaire sain et le tissu mammaire bénin.

La construction du micro-solénoïde a été basée sur l'enroulement d'un fil de cuivre de $100 \mu\text{m}$ de diamètre sur un tube en silicone de 1 mm de diamètre et implantable jusqu'à une profondeur de 4 cm .

Des images du tissu neural *ex vivo* ont été obtenues avec une résolution de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ dans le plan pour un temps d'acquisition de 4 h et avec une résolution de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ dans le plan pour un temps d'acquisition de 5 min.

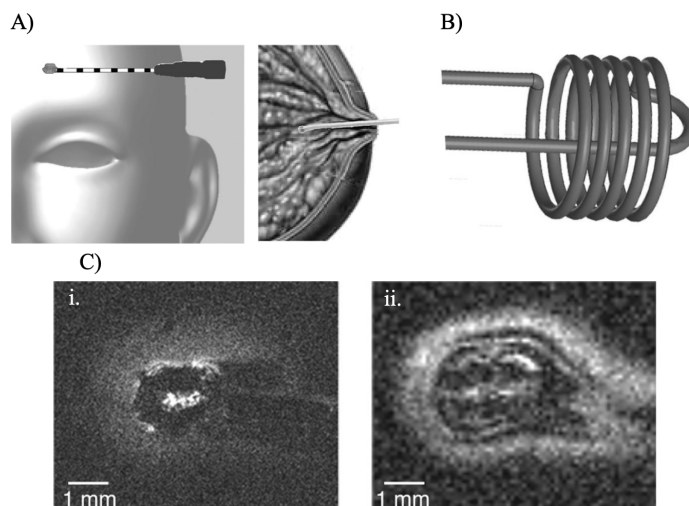


Figure 2.27. (B) Géométrie du micro-solénoïde développé pour les deux applications cliniques ciblées (A) comprenant l'intégration avec des électrodes intracrâniennes pour l'étude de l'épilepsie et l'utilisation intracanaulaire en oncologie mammaire. (C) Images du tissu neural obtenues *ex vivo* avec le micro-solénoïde. (i) avec une séquence turbo écho de spin (résolution dans le plan : $20 \times 20 \mu\text{m}^2$, épaisseur de la coupe : $170 \mu\text{m}$, temps d'acquisition : 4 h) (ii) avec une séquence écho de gradient (résolution dans le plan : $100 \times 100 \mu\text{m}^2$, épaisseur de la coupe : $400 \mu\text{m}$, temps d'acquisition : 5 min) [Rivera *et al.* (2011)].

En plus, des micro-solénoïdes de section circulaire, des micro-antennes solénoïdales de section rectangulaire ont également été étudiées et ce fut notamment le cas de Dohi *et al.* (2007) qui ont développé plusieurs micro-solénoïdes de section rectangulaire avec des tailles et un nombre d'enroulements différents (tailles de 2 mm, 4.5 mm et 8 mm pour un nombre d'enroulements de 6, 4 et 3, respectivement).

Des images IRM d'aiguilles de pin (cf. **figure 2.28**) ont été acquises avec le micro-solénoïde de 4.5 mm et de 4 enroulements et des résolutions de $23 \times 23 \mu\text{m}^2$ et de $12 \times 12 \mu\text{m}^2$ dans le plan ont été obtenues. L'épaisseur des coupes était de $1000 \mu\text{m}$.

Ainsi, des micro-solénoïdes de section rectangulaire, ayant des sensibilités élevées et une bonne uniformité, ont pu également permettre de réaliser de l'IRM à haute résolution.

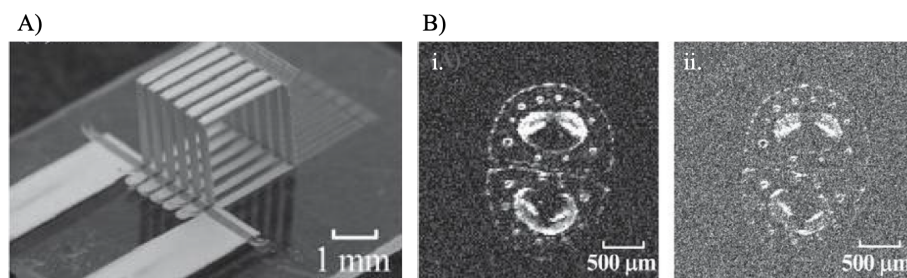


Figure 2.28. (A) Photographie du micro-solénoïde possédant une taille de 2 mm et 6 enroulements. (B) Images IRM d'aiguilles de pin acquises avec le micro-solénoïde de 4.5 mm et de 4 enroulements. Les résolutions des images étaient (i) de $23 \times 23 \times 1000 \mu\text{m}^3$ et (ii) de $12 \times 12 \times 1000 \mu\text{m}^3$. [Dohi *et al.* (2007)].

D'autres études utilisant des micro-antennes solénoïdales ont également permis d'obtenir de très bonnes résolutions spatiales en IRM.

Ciobanu *et al.* (2002) ont, en effet, obtenu, lors d'acquisitions sur des cellules isolées avec un micro-solénoïde possédant un diamètre intérieur de 73 μm , 6 enroulements, une longueur de 175 μm et un volume de détection d'environ 40 fL, une résolution spatiale de $3.7 \times 3.3 \times 3.3 \mu\text{m}^3$ à 9 T avec un temps d'acquisition total de 30 h.

Une résolution de $43 \times 36 \times 43 \mu\text{m}^3$ a été obtenue par Zhang *et al.* (2010) sur des images IRM d'embryons de souris *in vitro* acquises, à une intensité de champ magnétique de 7 T, avec un micro-solénoïde ayant un diamètre intérieur de 13.2 mm et une longueur de 18 mm. La durée de l'acquisition des ces images IRM était d'environ 4 heures.

Les principales limites du développement des micro-antennes solénoïdales semblent être les difficultés croissantes liées à la fabrication de micro-solénoïdes possédant des tailles de plus en plus petites, malgré l'émergence du domaine de la microtechnologie et de la microfabrication.

Le positionnement précis de l'échantillon dans le micro-solénoïde peut également se révéler complexe.

C'est la raison pour laquelle d'autres types de micro-antennes RMN telles que les micro-antennes de géométrie planaire ont été adoptées.

2.3.2.2 Micro-antennes planaires

Les micro-antennes de géométrie planaire constituent l'une des formes de micro-antennes les plus facilement produites. Elles peuvent être circulaires, elliptiques ou sous la forme de spirales.

Cette géométrie présente certains avantages par rapport à la géométrie solénoïdale décrite précédemment. Effectivement, l'utilisation de micro-antennes planaires facilite grandement le positionnement de l'échantillon et leur intégration dans diverses expériences. Lors d'expériences de microscopie, par exemple, la micro-antenne planaire est plus facilement intégrable à la lame de microscopie, ce qui peut donc faciliter les comparaisons entre des données RMN et des données de microscopie. Elles présentent également un procédé de fabrication plus simple à mettre en oeuvre et qui, durant ces dernières années, s'est basé sur des techniques de microfabrication.

Le principal inconvénient des micro-antennes planaires est qu'elles produisent un champ magnétique \vec{B}_1 beaucoup moins homogène et qui diminue très rapidement en s'éloignant du plan de la micro-antenne. Cela nécessite alors de placer l'échantillon observé au plus près du plan de l'antenne afin de maximiser l'efficacité du couplage entre ces derniers.

L'équipe de Peck *et al.* (1994) et Stocker *et al.* (1997) fut l'une des premières à travailler sur le développement de micro-antennes planaires en utilisant des techniques de fabrication de microlithographie.

Un exemple des micro-antennes planaires de Peck *et al.* (1994), schématisé à la **figure 2.29**, était composé de 4.5 spires en or possédant une épaisseur de $1\ \mu\text{m}$ et un diamètre interne de $97.5\ \mu\text{m}$ et déposées sur un substrat d'arséniure de gallium (GaAs). Cependant, ces micro-antennes planaires ont présenté un faible RSB en raison de pertes résistives très élevées et une mauvaise résolution spectrale ($360\ \text{Hz}$ à partir d'une acquisition RMN réalisée sur un échantillon de caoutchouc à une intensité de champ magnétique statique de $7.05\ \text{T}$), incompatibles avec des expériences RMN à haute résolution.

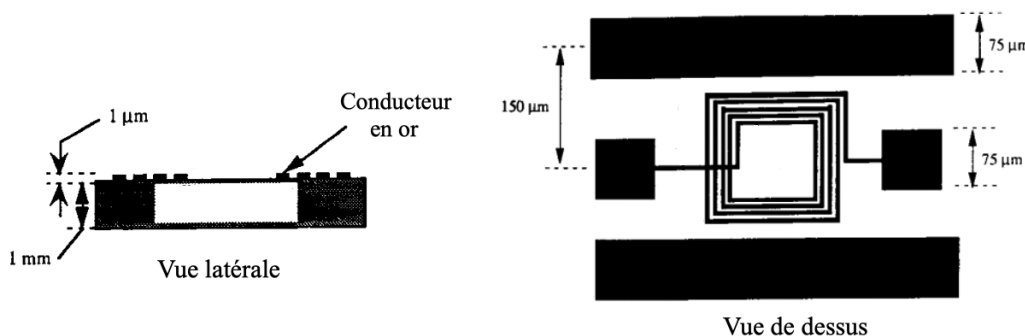


Figure 2.29. Schéma d'un exemple de configuration d'une micro-antenne planaire multi-tours. [Peck *et al.* (1994)].

Stocker *et al.* (1997) ont, par la suite, développé une micro-antenne planaire constituée de 3.5 spires en or sur un substrat d'arséniure de gallium (GaAs).

La micro-antenne était de $75\ \mu\text{m}$ de diamètre intérieur et de $200\ \mu\text{m}$ de diamètre extérieur. Le volume de l'échantillon, placé dans un capillaire ayant une longueur comprise entre $60\ \mu\text{m}$ et $200\ \mu\text{m}$ et de $75\ \mu\text{m}$ de diamètre intérieur, a été estimé entre 260 et $880\ \text{pL}$. Pour minimiser les distorsions causées par des artefacts de susceptibilité magnétique et produites à forte proximité de la micro-antenne, le capillaire a été placé à $50\ \mu\text{m}$ au-dessus de cette dernière.

Un spectre des protons de l'eau a été obtenu avec un RSB de 25.5 par acquisition et une largeur à mi-hauteur de $1.8\ \text{Hz}$ à une intensité de champ magnétique statique de $5.9\ \text{T}$ ($250\ \text{MHz}$).

Similairement aux micro-antennes solénoïdales, des nombreuses études ont porté sur l'évaluation des paramètres géométriques et sur l'influence de leur réduction sur la sensibilité des micro-antennes planaires.

L'équipe de Massin *et al.* (2003) ont effectué des expériences de SRM ^1H , à $7.05\ \text{T}$ ($300\ \text{MHz}$), en utilisant trois micro-antennes planaires de différents diamètres intérieurs ($500\ \mu\text{m}$, $1000\ \mu\text{m}$ et $2000\ \mu\text{m}$) associés à des volumes de détection distincts ($30\ \text{nL}$, $120\ \text{nL}$ et $470\ \text{nL}$) (cf. **figure 2.30**).

La comparaison des performances entre les trois micro-antennes planaires a démontré, expérimentalement, que la diminution du diamètre intérieur augmentait la sensibilité par unité de masse.

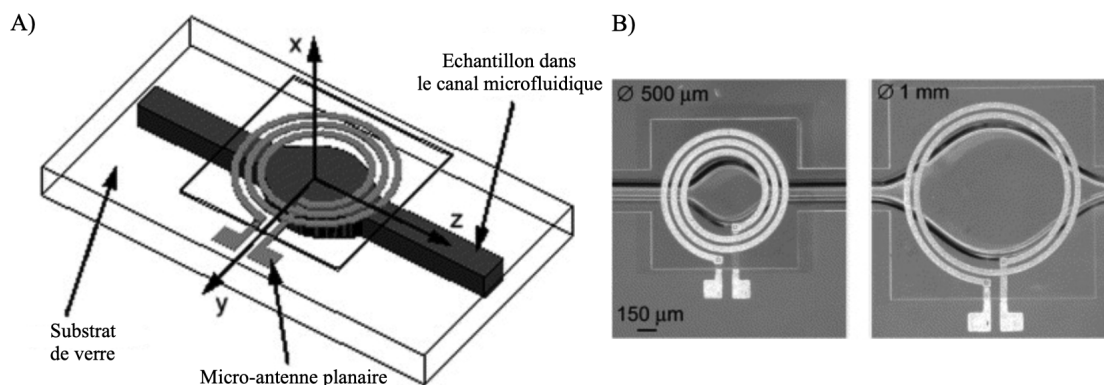


Figure 2.30. (A) Schéma du dispositif comprenant la micro-antenne planaire intégrée sur un substrat de verre avec un canal microfluidique permettant le positionnement de l'échantillon. (B) Photographies de deux micro-antennes planaires avec un diamètre intérieur de $500\ \mu\text{m}$ (à gauche) et un diamètre de $1000\ \mu\text{m}$ (à droite) et avec des volumes de détection respectifs de 30 et 120 nL. [Massin *et al.* (2003)].

En dépit de leur champ magnétique généré moins homogène, il est tout à fait possible d'obtenir de très bonnes performances en IRM et en SRM avec des micro-antennes planaires, s'illustrant par une bonne résolution spatiale ou spectrale et par l'analyse d'échantillons de très faible volume.

Avec une micro-antenne planaire constituée de 3 spires en cuivre, sur un substrat de verre, de $35\ \mu\text{m}$ d'épaisseur et d'un diamètre interne de $500\ \mu\text{m}$ (cf. **figure 2.31**), Massin *et al.* (2002) ont obtenu une résolution dans le plan de $62 \times 44\ \mu\text{m}^2$ (avec une épaisseur de coupe de 1.4 mm) en imageant une peau de banane à une intensité de champ magnétique statique de 4.7 T (cf. **figure 2.32**). La durée de l'acquisition était de 25 minutes.

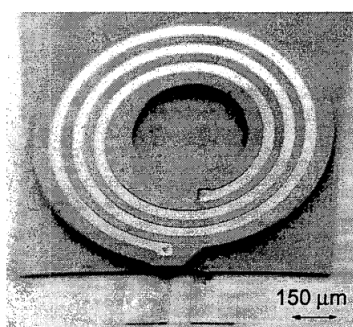


Figure 2.31. Image obtenue par microscopie électronique à balayage (MEB) d'une micro-antenne planaire de 3 spires, d'une épaisseur de $35\ \mu\text{m}$, d'un espacement de $30\ \mu\text{m}$ entre les spires et d'une diamètre intérieur de $500\ \mu\text{m}$ [Massin *et al.* (2002)].

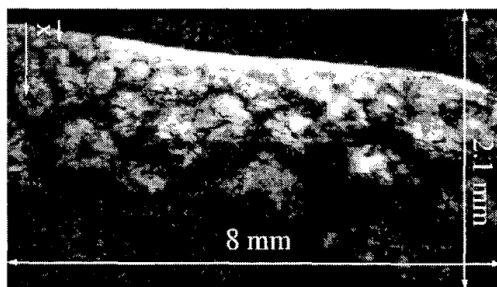


Figure 2.32. Image IRM d'une peau de banane obtenue avec la micro-antenne planaire de 3 spires, d'une épaisseur de 35 μm , d'un espacement de 30 μm entre les spires et d'un diamètre intérieur de 500 μm . La résolution dans le plan était de $62 \times 44 \mu\text{m}^2$ pour une épaisseur de coupe de 1.4 mm [Massin *et al.* (2002)].

Dechow *et al.* (2000) ont développé des micro-antennes planaires de forme rectangulaire multi-tours (cf. **figure 2.33**) et avec des diamètres intérieurs compris entre 50 μm et 400 μm sur des substrats de verre ou d'arséniure de gallium (GaAs). L'enroulement conducteur était en or et d'une épaisseur de 3 μm .

Lors d'expériences de SRM ^1H , un spectre d'un échantillon de 60 nL d'huile de silicone a pu être acquis à 11 T (500 MHz) en utilisant une micro-antenne planaire en réception RF.

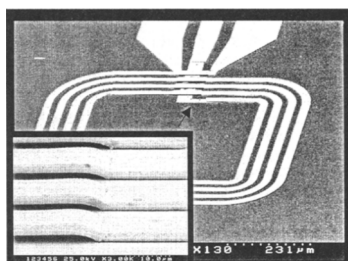


Figure 2.33. MEB d'une micro-antenne planaire de 4 spires et de forme rectangulaire [Dechow *et al.* (2000)].

Un peu plus tard, un nouveau type de micro-antennes basé sur l'association de plusieurs micro-antennes planaires a vu le jour.

Il s'agit des micro-antennes d'Helmholtz qui se présentent généralement sous le forme de deux micro-antennes planaires de mêmes dimensions et placées l'une en face de l'autre de façon parallèle. Cette configuration offre ainsi un volume de détection plus grand tout en améliorant l'uniformité du champ magnétique sans compromettre les caractéristiques de sensibilité des micro-antennes planaires.

Un exemple de micro-antenne d'Helmholtz, dédié à la spectroscopie RMN et à l'analyse cellulaire, a été développé par Ehrmann *et al.* (2007).

Elle était constituée de deux micro-antennes planaires de section circulaire possédant 4 spires de cuivre de 40 μm d'épaisseur et d'un diamètre intérieur de 160 μm (cf. **figure 2.34**). Le volume de détection de cette antenne d'Helmholtz était de l'ordre de 5 nL.

Des largeurs à mi-hauteur d'environ 5 Hz ont pu être obtenues à une intensité de champ magnétique statique de 7.05 T (300 MHz).

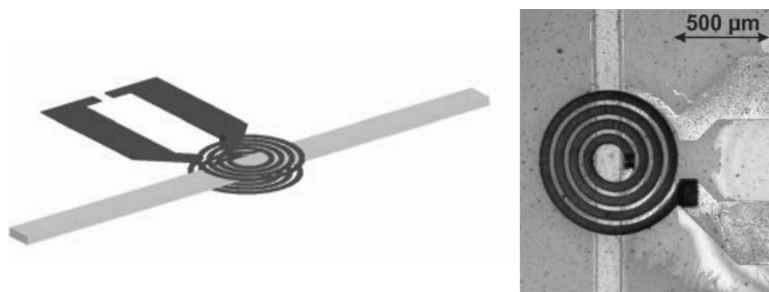


Figure 2.34. Micro-antenne d'Helmholtz et visualisation du positionnement du canal microfluidique permettant le recueil de l'échantillon [Ehrmann *et al.* (2007)].

Les micro-antennes planaires, décrites dans cette partie, ont été principalement utilisées pour des expériences *ex vivo* et au sein des systèmes de micro-analyse ayant lieu après le prélèvement du tissu d'intérêt par biopsie.

De ce fait, certaines équipes se sont alors consacrées au développement de micro-antennes planaires implantables pour l'étude *in vivo* et qui ont été couramment désignées par le terme d'« aiguilles implantables ».

2.3.2.3 Aiguilles implantables

Les micro-antennes « aiguilles implantables » sont souvent de géométrie plane, de très petite taille et avec une extrémité pointue et affûtée afin de faciliter l'insertion dans les tissus d'intérêt et préserver leur intégrité.

Parmi les premières études dédiées à ce type de micro-antennes, Renaud *et al.* (2002) ont développé une micro-antenne plane implantable de forme rectangulaire, de 1000 μm de longueur et de 500 μm de largeur et positionnée à l'extrémité d'une tige en silicium (cf. **figure 2.35**). Les spires, espacées de 20 μm , étaient en cuivre, de 38 μm d'épaisseur et de 22 μm de largeur. Afin d'évaluer la résolution spectrale, la micro-antenne a été immergée dans un petit échantillon de beurre (0.33 cm^3).

Le spectre RMN, obtenu en 6 s et à 2 T, a permis de distinguer la résonance de l'eau et la résonance des lipides dont l'écart est de 3.5 ppm (295 Hz).

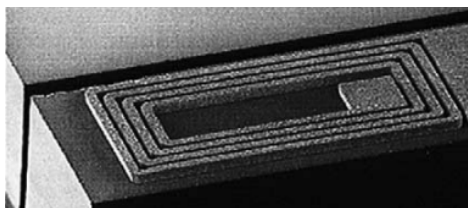


Figure 2.35. Image obtenue par MEB de la micro-antenne planaire rectangulaire [Renaud *et al.* (2002)].

Des travaux similaires ont également été effectués par Baxan *et al.* (2007) qui ont conçu, par électrodéposition, une micro-antenne planaire implantable de 15 mm de longueur, de 600 μm de largeur et de 550 μm d'épaisseur (cf. **figure 2.36**). Les spires conductrices étaient en cuivre, de 40 μm d'épaisseur, enroulées sur une longueur de 10 mm.

L'objectif de cette aiguille implantable était d'être utilisée comme antenne réceptrice à 4.7 T (200 MHz) pour l'analyse d'échantillons de faibles volumes en SRM *in vivo*.

Dans cette étude préliminaire, des essais *in vitro* ont été réalisées en utilisant une solution composée de trois métabolites cérébraux, la choline, le NAA et la créatine, à des concentrations respectives de 100 mM, de 100 mM et de 50 mM.

A partir du spectre RMN ^1H de cette solution de métabolites acquis avec l'aiguille implantable, les sensibilités en fonction de la concentration et les limites de détection, pour chaque métabolite, ont pu être estimées.

Ces dernières, relativement proches des concentrations cérébrales rapportées chez le rat [Pfeuffer *et al.* (1999)], étaient de 4.4 mM pour la choline et de 13 mM pour le NAA.

Ces premiers résultats RMN *in vitro* ont alors permis de valider la possibilité d'utiliser ce type de micro-antennes, grâce à une sensibilité adéquate et suffisante, en SRM *in vivo* chez le petit animal.



Figure 2.36. (A) Photographie du circuit électronique et de l'aiguille implantable. (B) Image obtenue par MEB de la micro-antenne planaire implantable [Baxan *et al.* (2007)].

En 2006, Syms *et al.* (2006) ont également développé un procédé de fabrication de micro-antennes aiguilles implantables à faible coût pour la SRM.

Les aiguilles implantables étaient constituées d'une partie conductrice en couches de cuivre et d'or, de 14 μm et de 4 μm d'épaisseur, respectivement. Ils ont développé 4 types d'aiguilles implantables, des aiguilles à base de silicium, longues et courtes et des aiguilles entièrement en plastique, longues et courtes (**figure 2.37**). Les aiguilles courtes possé-

daient une taille de 1.3 mm × 7.5 mm et les aiguilles longues, une taille de 1.3 mm × 12.5 mm.

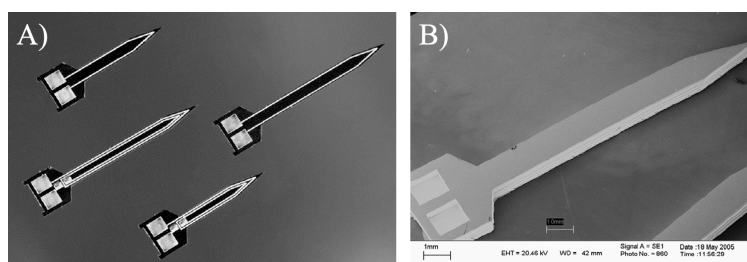


Figure 2.37. (A) Représentations schématiques des 4 types d'aiguilles implantables développées. (B) Image obtenue de l'aiguille implantable [Syms *et al.* (2006)].

Ce type d'aiguilles implantables a été utilisé par Howe *et al.* (2009) pour des expériences de SRM ^{31}P et d'IRM ^1H *in vivo*.

L'aiguille implantable a été insérée dans un muscle de la cuisse du rat (cf. **figure 2.38.A**) et a été accordée à 200 MHz (4.7 T) pour les acquisitions d'IRM ^1H , puis à 81 MHz pour les mesures de SRM ^{31}P .

La **figure 2.38.B** illustre le spectre ^{31}P obtenu en 11 min, avec un RSB de 10.4 (équivalent à un RSB de 3.1 par $\text{min}^{\frac{1}{2}}$), pour la résonance de la phosphocréatine (PCr). La largeur à mi-hauteur de la résonance de la PCr était de 19 Hz.

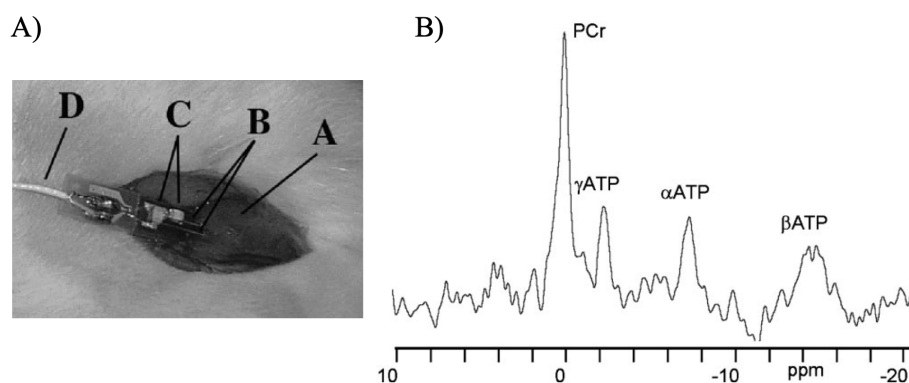


Figure 2.38. (A) Aiguille implantée dans le muscle de la cuisse du rat dans le sens des fibres musculaires. A - Muscle de la cuisse dont la peau a été enlevée. B - Piste conductrice de la micro-antenne implantable. C - Capacités d'accord et d'adaptation. D - Câble coaxial relié au spectromètre. (B) Spectre ^{31}P du muscle de la cuisse du rat acquis avec une aiguille implantable (TR = 2500 ms, 256 accumulations). Une apodisation lorentzienne de 15 Hz a été effectuée en post-traitement [Howe *et al.* (2009)].

Toutefois, la présence des connexions filaires nécessaires au fonctionnement des aiguilles implantables peut accroître l'invasivité du dispositif et être responsable d'artefacts et d'infections.

La conception d'antennes implantables auto-résonantes représente alors une solution pour s'en affranchir.

2.3.2.4 Micro-antennes implantables sans fil

Afin de réduire la présence de certaines connexions filaires présentes dans la majorité des micro-antennes implantables et de faciliter l'implantation profonde, des micro-antennes implantables sans fil ont été élaborées.

Le fonctionnement d'une telle micro-antenne repose sur un circuit électronique RLC classique constitué d'un enroulement conducteur représentant l'inductance et d'un (ou plusieurs) condensateurs (cf. [paragraphe 2.2.1.1](#)). L'émission et la réception RF, par la micro-antenne implantée, se font par couplage inductif avec une antenne extérieure de plus grande dimension et reliée au spectromètre.

Les principales applications de ce types d'antennes ont été l'IRM préclinique *in vivo*, principalement de la moelle épinière, et la SRM.

C'est en 1993 que fut publiée la première étude portant sur l'utilisation d'une micro-antenne implantable sans fil pour l'IRM *in vivo* de la moelle épinière du chat à une intensité de champ magnétique statique de 2 T.

Le principal objectif de cette étude de [Wirth *et al.* \(1993\)](#) était de déterminer si une micro-antenne implantable sans fil à couplage inductif pouvait fournir un gain en RSB significatif par rapport à l'utilisation d'antennes surfaciques extérieures optimisées.

Pour cela, des micro-antennes implantables, constituées d'une boucle en fil de cuivre (diamètre = 1.6 mm) en forme de demi-selle de cheval (3 cm × 2 cm × 1.2 cm), ont été fixées chirurgicalement à la colonne vertébrale (de la première à la troisième vertèbre lombaire) de 4 chats adultes (cf. [figure 2.39](#)). La micro-antenne implantée a été couplée à une antenne surfacique externe de 12 cm × 12 cm, montée sur le berceau du système RMN. Un gain en RSB d'un facteur 2 a été obtenu par rapport aux antennes surfaciques externes optimisées.

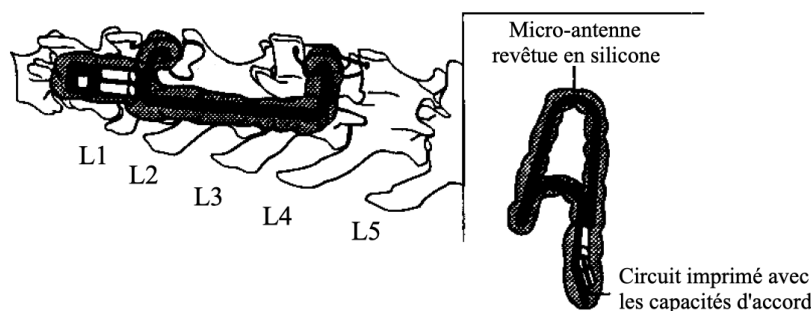


Figure 2.39. Positionnement de la micro-antenne implantée sur la colonne vertébrale du chat. La micro-antenne est centrée sur la 2^{ème} vertèbre lombaire et maintenue en place par les facettes articulaires présentes entre la 1^{ère} et la 2^{ème} vertèbre et entre la 2^{ème} et la 3^{ème} vertèbre [[Wirth *et al.* \(1993\)](#)].

L'équipe de Bilgen *et al.* a été l'une des équipes les plus actives sur le développement de micro-antennes implantables sans fil pour l'imagerie préclinique de la moelle épinière.

Le but principal du travail de Bilgen *et al.* (2001) a été de décrire la mise en oeuvre de micro-antennes implantables pour l'IRM de la moelle épinière du rat à haut champ magnétique (7 T).

Les micro-antennes implantables ont été fabriquées à partir d'un fil de cuivre de 1.02 mm de diamètre. La forme des ces dernières est illustrée dans la **figure 2.40**. Elles ont été recouvertes d'un élastomère de silicone biologiquement inerte afin d'isoler électriquement la micro-antenne des tissus et ont été couplées à une antenne externe rectangulaire de 15 mm × 30 mm qui a été montée de façon permanente au berceau du système RMN préclinique.

La micro-antenne a été implantée sur la colonne vertébrale du rat de manière à être centrée sur la 7^{ème} vertèbre thoracique.

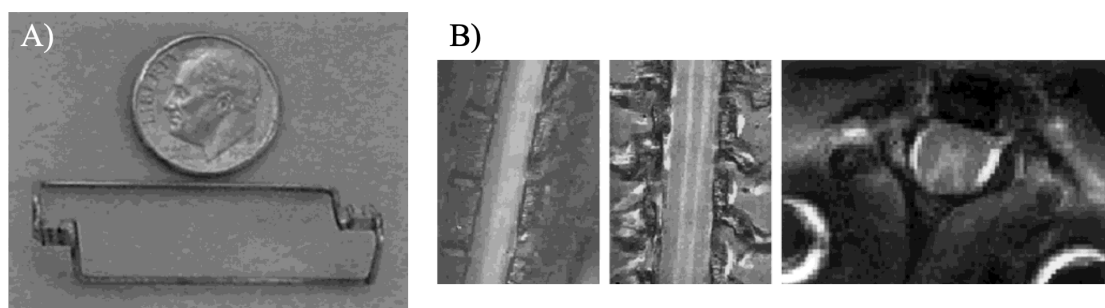


Figure 2.40. (A) Photographie de la micro-antenne implantable auto-résonante à 7 T. Les dimensions intérieures sont de 12 mm × 30 mm. (B) Images IRM sagittale, coronale et axiale de la moelle épinière normale *in vivo* (épaisseur de coupe = 0.5 mm, taille de la matrice = 256 × 256, TR/TE = 2000/13 ms, nombre d'accumulations = 4, FOV = 20 × 20 mm² (pour l'image axiale) - 30 × 30 mm² (pour les images sagittale et coronale). Les anneaux hyperintenses dans la partie inférieure de l'image axiale sont causés par les fils de la micro-antenne implantée. [Bilgen *et al.* (2001)].

En 2004, Bilgen (2004) a développé le même type de micro-antennes implantables, légèrement plus flexibles, pour l'IRM haute résolution, à une intensité de champ magnétique statique de 9.4 T.

La micro-antenne implantée chez le rat, et présentée dans la **figure 2.41**, a été fabriquée à l'aide d'un fil de cuivre de 1.02 mm de diamètre et de 4 condensateurs, nécessaires à son accord à la fréquence de travail (400 MHz). La boucle rectangulaire formée était de 30 mm × 15 mm et recouverte d'un élastomère de silicone biologiquement inerte pour l'isoler électriquement de son environnement.

La micro-antenne implantée a été couplée inductivement à une antenne rectangulaire de 40 mm × 25 mm.

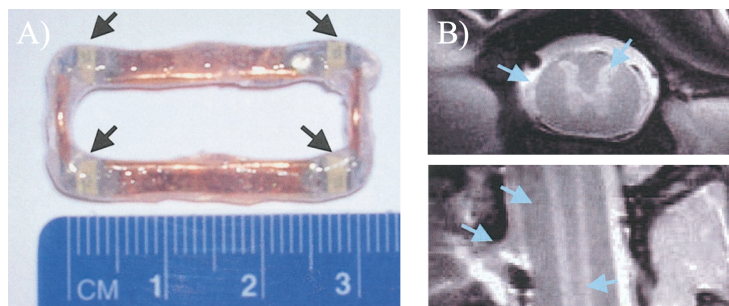


Figure 2.41. (A) Photographie de la micro-antenne implantable auto-résonante revêtue d'élastomère et accordée à 400 MHz (9.4 T). Les flèches pointent les 4 condensateurs répartis dans les coins. (B) Images IRM écho de spin axiale et coronale de moelle épinière normale *in vivo* (épaisseur de coupe = 1 mm, taille de la matrice = 256×256 , TR/TE = 2000/12 ms, Nacc = 2, FOV = 15×15 mm²). Les flèches bleues pointent la matière grise, la matière blanche, le liquide céphalo-rachidien, les cornes dorsales et les racines nerveuses, facilement visibles et discernables. [Bilgen (2004)].

Ainsi, l'augmentation du RSB obtenue par l'utilisation de micro-antennes implantables auto-résonantes peut être particulièrement avantageuse dans diverses études portant sur la moelle épinière. En effet, un RSB suffisant peut permettre de visualiser facilement les changements anatomiques lors de lésions de la moelle ou lors de thérapies telles que, par exemple, la pose de greffons de cellules souches utilisées pour le rétablissement de la moelle lésée [Kjell & Olson (2016)].

Au cours de ces différents travaux cités, les auteurs ont également fait part de plusieurs problématiques rencontrées et propres aux micro-antennes implantables utilisées à haut champ magnétique.

En effet, l'un des problèmes majeurs est la dégradation des paramètres électromagnétiques lorsque la micro-antenne est implantée dans les tissus.

La mise en contact entre la micro-antenne et les tissus, étant des milieux conducteurs, entraîne une nette dégradation du facteur de qualité (cf. **paragraphe 2.2.1.3**) par la création d'un couplage capacitif entre ces deux éléments, par l'augmentation des pertes magnétiques induites par les tissus et par l'importance des pertes diélectriques, responsables de l'augmentation de la résistance équivalente de l'antenne.

Une forte dégradation du facteur de qualité peut ainsi rendre les micro-antennes inutilisables pour faire de l'IRM et/ou de la SRM.

Une solution, proposée par Decorps *et al.*, consiste à utiliser davantage de condensateurs afin de réduire la capacité parasite et minimiser les pertes diélectriques par la distribution des capacités [Decorps *et al.* (1985)]. Cela permet donc de réduire le décalage de la fréquence de résonance et ainsi améliorer le facteur de qualité de la micro-antenne après son implantation. Toutefois, les limitations physiques imposées par le caractère invasif des antennes implantables ne permet pas toujours de poursuivre dans cette voie.

Une autre solution consiste alors à recouvrir la micro-antenne d'élastomère biocompatible

en plusieurs couches afin d'augmenter la séparation physique entre la micro-antenne et les tissus pour ainsi réduire les pertes diélectriques.

Les micro-antennes implantables sans fil présentent un minimum de miniaturisation qui est généralement de l'ordre du centimètre.

En effet, la miniaturisation de l'antenne entraîne une diminution de l'inductance. Afin de conserver la fréquence de résonance, il est alors nécessaire, par l'équation 13, d'augmenter la valeur de la capacité, augmentant ainsi la taille du condensateur.

L'encombrement engendré par la présence des condensateurs possédant une taille importante rend difficile la diminution des dimensions des micro-antennes implantables sans fil. La miniaturisation repose donc sur un équilibre entre la taille de l'antenne miniature implantable et la taille de ses composants discrets permettant son bon fonctionnement à la fréquence de résonance désirée.

2.3.2.5 Micro-antennes monolithiques auto-résonantes

Depuis quelques années, une nouvelle approche, basée sur le développement de micro-antennes monolithiques auto-résonantes, permet de se libérer des contraintes et des limitations dimensionnelles.

Élaborées par des techniques de microfabrication en salle blanche, les micro-antennes monolithiques sont conçues sur des substrats diélectriques à faibles pertes dont la capacité est directement intégrée à ces derniers. Il n'est donc plus nécessaire d'utiliser des composants discrets pour définir la fréquence de résonance.

La construction des micro-antennes monolithiques repose, la plupart du temps, sur le principe des lignes de transmission planaires.

Il existe différentes lignes de transmissions comme les lignes microruban (ou microstrip), les lignes coplanaires ou les lignes parallèles. Une ligne microruban est constituée d'un ruban conducteur placé sur une face d'un matériau diélectrique et dont l'autre face est métallisée afin de constituer la masse, une ligne coplaire est constituée de trois rubans conducteurs placés sur une face d'un matériau diélectrique, les deux rubans latéraux servant de masse et les lignes parallèles sont constituées de deux rubans conducteurs déposés de part et d'autre d'un matériau diélectrique.

Ces micro-antennes monolithiques peuvent être développées sur des films minces flexibles de polymère utilisés comme substrat diélectrique afin de pouvoir adapter la micro-antenne à des surfaces non planes. Cela permet aussi d'améliorer le couplage magnétique entre l'échantillon et la micro-antenne et conduire à un gain en RSB significatif, notamment en IRM.

En 2007, Woytasik *et al.* (2007) ont développé une micro-antenne monolithique adaptée à l'imagerie des régions superficielles comme la peau, par exemple, ou à l'imagerie du petit animal.

Le modèle monolithique de l'antenne a été basé sur le concept du Résonateur Multi-tours

à Lignes de Transmission (RMLT) [Haziza *et al.* (1997)]. Le RMLT, dont le schéma est illustré à la **figure 2.42**, est classiquement constitué de deux enroulements conducteurs formant l'inductance équivalente et situés de part et d'autre d'un matériau diélectrique qui assure le rôle d'une capacité continuellement distribuée.

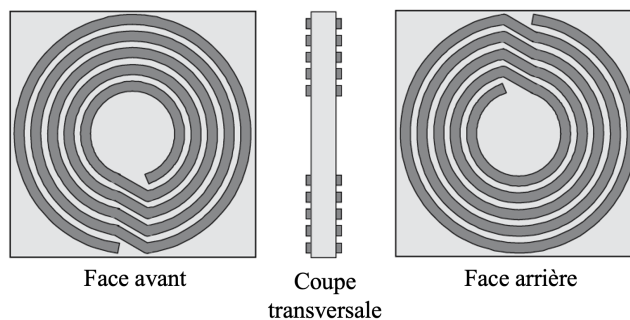


Figure 2.42. Modèle du résonateur multi-tours à lignes de transmission (en gris clair, matériau diélectrique, en gris foncé, enroulements conducteurs) [Woytasik *et al.* (2007)].

Woytasik *et al.* ont développé une technique de fabrication de RMLT en utilisant deux types de substrats souples : le polyimide et le polyéther-éther-cétone, et avec plusieurs épaisseurs (25 μm , 50 μm et 125 μm). Ces micro-antennes, de différents diamètres extérieurs (3-15 mm), ont été conçues et réalisées en utilisant des techniques de photolithographie et d'électrodéposition du cuivre.

Une micro-antenne monolithique souple de 15 mm de diamètre extérieur et sur une couche de polyimide de 125 μm d'épaisseur a été utilisée pour acquérir une image *in vivo* d'une tumeur sous-cutanée chez la souris avec un temps d'acquisition de 17 min (**figure 2.43**). La résolution spatiale obtenue était de $1000 \times 150 \times 78 \mu\text{m}^3$. La totalité de la tumeur, incluant les structures superficielles et les structures profondes, était alors facilement observable.

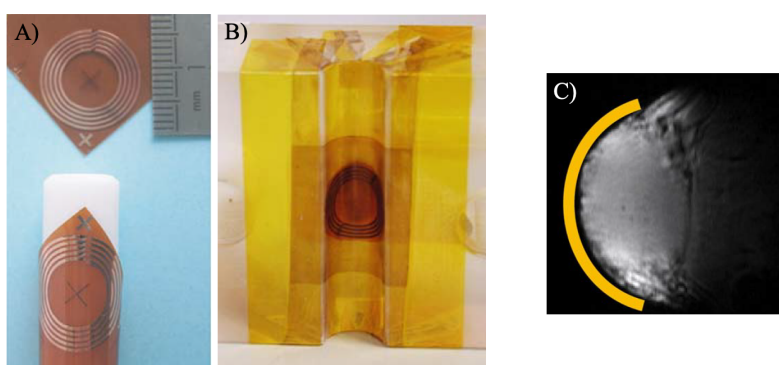


Figure 2.43. (A) Micro-antenne flexible de 15 mm de diamètre extérieur sur une couche de polyimide de 125 μm d'épaisseur. (B) Micro-antenne souple placée sur un support. (C) Image IRM *in vivo* d'une tumeur sous-cutanée chez la souris acquise avec la micro-antenne monolithique souple dont l'emplacement est schématisé en jaune [Woytasik *et al.* (2007)].

Le suivi difficile de certains dispositifs médicaux tels que les cathéters, en IRM, pendant

les procédures endovasculaires a été l'un des points de départ pour le développement de micro-antennes flexibles pouvant s'adapter à l'extrémité d'une sonde endovasculaire [Dohi *et al.* (2005); Ellersiek *et al.* (2010); Syms *et al.* (2010)].

La **figure 2.44.A-B** présente la micro-antenne monolithique développée par Ellersiek *et al.*

Elle était constituée d'une spirale ($1.3 \times 1.3 \text{ mm}^2$) de 6 enroulements possédant deux couches de polyimide de $5 \mu\text{m}$ d'épaisseur et de deux couches d'or électrodéposées de $5 \mu\text{m}$ et $30 \mu\text{m}$ d'épaisseur. La deuxième couche de polyimide a été utilisée comme substrat diélectrique permettant de créer une capacité de $5 \text{ pF}/\text{mm}^2$.

Afin d'accorder précisément le circuit résonant à la fréquence de travail qui était de 63.9 MHz , plusieurs condensateurs détachables ont été intégrés monolithiquement.

Pour protéger la micro-antenne du milieu dans lequel elle se trouvait, elle a été recouverte d'une couche passive et biocompatible de parylène à une épaisseur de $5 \mu\text{m}$.

La micro-antenne a été fixée à un cathéter et scellée avec une couche de parylène (**figure 2.44.C**).

Des tests *in vitro* ont été effectués sur un fantôme d'eau et à une intensité de champ magnétique statique de 1.5 T .

L'hypersignal généré par la micro-antenne monolithique flexible placée à l'extrémité du cathéter permettait ainsi d'identifier facilement sa position (**figure 2.44.D**).

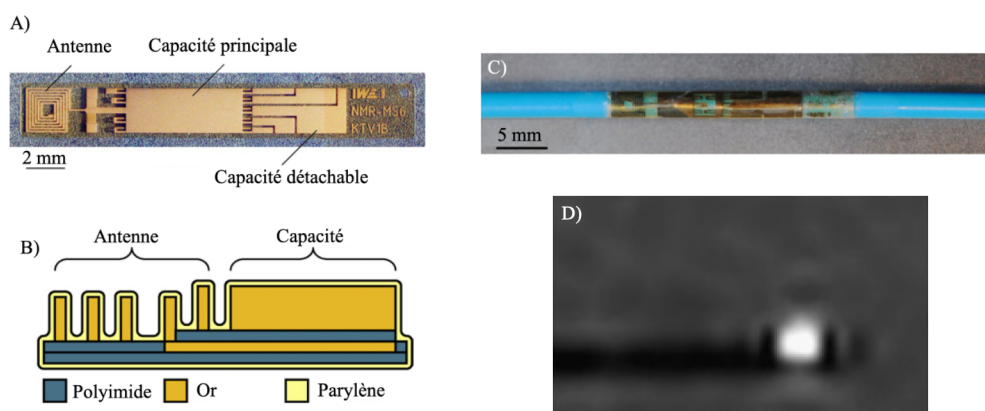


Figure 2.44. Micro-antenne monolithique développée pour la localisation du cathéter lors de procédures endovasculaires. (A) Visualisation de la spirale, de la capacité principale et des capacités détachables pour l'accord de la fréquence de résonance. (B) Schéma transversal de la micro-antenne monolithique. (C) Micro-antenne flexible scellée au cathéter. (D) Image IRM d'un fantôme d'eau contenant un cathéter équipée d'une micro-antenne de localisation [Ellersiek *et al.* (2010)].

De plus, les micro-antennes monolithiques auto-résonantes peuvent aussi être implantées dans divers organes afin de mieux explorer l'anatomie et la physiologie de ces derniers en améliorant les résolutions spatiale et temporelle.

Ginefri *et al.* (2012) ont, par exemple, conçu des micro-antennes monolithiques auto-

résonantes implantables dont la principale application a été l'IRM *in vivo* du cerveau de rat. Ces dernières ont été basées sur la conception d'un RMLT et ont été fabriquées avec un substrat en téflon en utilisant un procédé de micromoulage du cuivre et un traitement spécifique d'adhésion métal-polymère. Les paramètres géométriques des micro-antennes monolithiques auto-résonantes implantables étaient les suivants : diamètre extérieur de 5.4 mm, largeur du conducteur de 118 μm , espacement de 110 μm entre les 7 tours. Lors des expériences d'IRM, la micro-antenne implantée a été couplée inductivement à une antenne extérieure ayant une géométrie en forme de huit (également appelée papillon) et constituée de deux enroulements carrés de $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$, larges de 1.5 mm et connectés en série, générant un champ magnétique RF perpendiculaire au plan de la micro-antenne. La **figure 2.45** présente une image IRM *in vivo* du cerveau de rat obtenue à une intensité de champ magnétique de 7 T avec la micro-antenne monolithique auto-résonante implantée au niveau de la scissure interhémisphérique. Une résolution dans le plan de $150 \times 150 \mu\text{m}^2$ et un RSB d'environ 120 dans la région en hypersignal ont été obtenus.

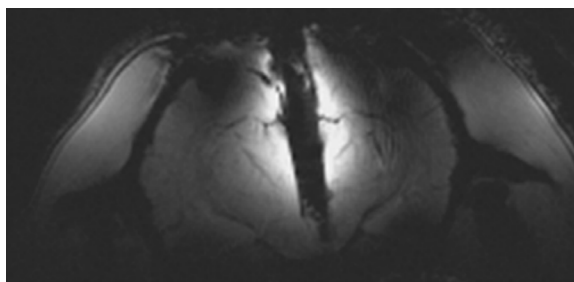


Figure 2.45. Image IRM *in vivo* du cerveau de rat obtenue à 7 T avec la micro-antenne monolithique auto-résonante implantée au niveau de la scissure interhémisphérique. Une séquence d'acquisition FLASH 2D a été utilisée avec un champ de vue dans le plan de $2.88 \times 1.38 \text{ cm}^2$ et une matrice de 192×92 correspondant à une résolution dans le plan de $150 \times 150 \mu\text{m}^2$ pour un temps d'acquisition de 3 min 04 s [Ginefri *et al.* (2012)].

Mais encore, Handwerker *et al.* (2020) ont récemment développé une aiguille RMN monolithique implantable dans le but de mesurer, par des expériences *in vivo* chez le petit animal, l'oxygénation sanguine et le débit sanguin dans des régions cérébrales de faible volume et avec une résolution temporelle de quelques millisecondes. Les auteurs ont, en particulier, souhaité étudier les changements du flux sanguin et de l'oxygénation chez des rats durant une stimulation électrique de la patte avant en implantant l'aiguille RMN monolithique dans le cortex somatosensoriel à une profondeur de 1.5 mm. Les changements hémodynamiques ont, par la suite, été étudiés par l'analyse de l'évolution temporelle de la FID acquise avec l'aiguille RMN monolithique implantable.

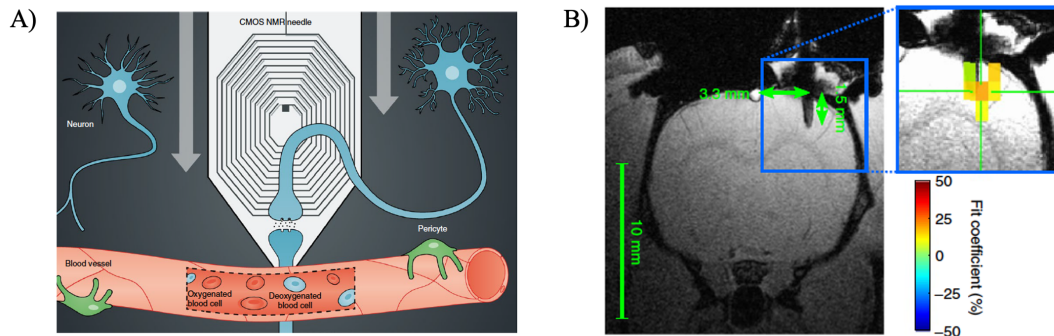


Figure 2.46. (A) L'aiguille RMN monolithique implantable est insérée dans le cortex somatosensoriel pour réaliser des expériences d'IRM fonctionnelle localisées et rapides. (B) Image IRM anatomique montrant l'emplacement précis de l'aiguille RMN. L'image à droite montre une superposition du résultat de l'IRM fonctionnelle avec une activation cérébrale provenant de la stimulation de la patte gauche dans la région d'implantation de l'aiguille RMN. [Handwerker *et al.* (2020)].

2.4 Méthodes d'injection intracérébrale

Cette partie permet au lecteur de concevoir les bases de quelques méthodes d'injection intracérébrale nécessaires pour appréhender le **chapitre 5** portant sur le développement d'un outil implantable combinant une micro-antenne RMN et un système d'injection.

Nous avons choisi de scinder cette partie en présentant, tout d'abord, la microdialyse cérébrale qui représente l'une des techniques les plus utilisées pour infuser directement un composé d'intérêt dans le tissu cérébral puis nous parlerons des autres techniques d'injection intracérébrale telles que, par exemple, l'utilisation de cathéters, d'aiguilles ou d'implants cérébraux.

2.4.1 Microdialyse cérébrale

2.4.1.1 Fonctionnement et microdialyse inverse

C'est à la fin des années 1950 que la technique de microdialyse fut introduite pour la mesure des concentrations de composés endogènes dans le cerveau animal [Kalant (1958)]. Quelques années plus tard, Delgado *et al.* (1972) mirent au point une première sonde de microdialyse, une dialytrode, afin de comprendre l'évolution de la concentration des différents neurotransmetteurs dans le temps, chez le singe éveillé.

De nombreux travaux menés par Ungerstedt *et al.*, portant sur l'amélioration de la conception de la sonde de microdialyse et sur les premières quantifications de neurotransmetteurs dans le tissu neural, contribuèrent grandement à l'utilisation de la microdialyse cérébrale comme technique principale permettant l'étude *in vivo* du milieu extracellulaire cérébral [Ungerstedt *et al.* (1982); Ungerstedt (1984)].

La sonde de microdialyse cérébrale, conçue pour imiter un capillaire sanguin, se compose d'une membrane semi-perméable reliée à une tubulure d'entrée et de sortie.

La taille des pores de la membrane, qui peut être plus ou moins petite en fonction de l'utilisation et des molécules d'intérêt, définit une grandeur appelée seuil de coupure (ou *cut-off*, en anglais) exprimée en daltons et caractérisant la limite théorique de passage à travers la membrane. D'après la littérature, le seuil de coupure courant des membranes de microdialyse peut varier de 1 à 100 kDa en fonction de la taille moléculaire des analytes. Une recommandation commune stipule, toutefois, que la taille des pores doit être deux à trois fois supérieure à celle de la molécule étudiée pour permettre un échange significatif et optimal.

Le rendement relatif des échanges à travers la membrane, estimé comme le rapport entre les concentrations dans le dialysat et les concentrations dans le milieu extracellulaire, est influencé par plusieurs paramètres tels que la température, la surface de la membrane, l'ampleur du gradient de concentration, le débit de la pompe de perfusion reliée à la membrane par un capillaire, la taille des pores et la taille des molécules diffusant à travers la membrane [Geeraerts *et al.* (2008)].

Il existe une grande diversité de sondes de microdialyse qui diffèrent principalement en fonction du tissu exploré, de la longueur de la membrane, de la taille des pores et du matériau utilisé [Chun *et al.* (2017)].

Pour la microdialyse cérébrale, les sondes concentriques, dont un schéma est illustré à la **figure 2.47**, sont le modèle le plus utilisé car elles permettent une implantation précise et leur stabilité et robustesse mécaniques facilitent les expériences sur des animaux vigiles.

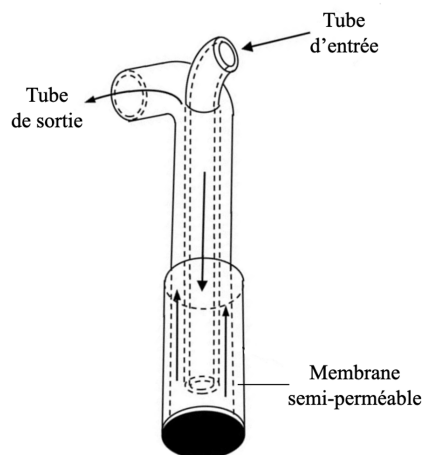


Figure 2.47. Schéma de la sonde de microdialyse concentrique [Chun *et al.* (2017)].

Lorsque la membrane, implantée dans le tissu cérébral d'intérêt, est perfusée par une solution nommée le perfusat (habituellement, du liquide céphalo-rachidien (LCR) artificiel pour être le plus proche du milieu extracellulaire exploré), elle devient l'interface entre deux milieux liquidiens : le milieu extracellulaire cérébral et le milieu de perfusion.

L'échange des molécules a alors lieu, dans les deux directions, par simple diffusion passive, et, est fonction des caractéristiques de perméabilité de la membrane et des gradients de concentration entre les deux milieux liquidiens. A la sortie de la membrane de microdialyse, le liquide de perfusion, appelé dialysat, est acheminé, par un capillaire vers un tube de collecte.

Les vitesses habituelles de perfusion sont généralement comprises entre 0.1 et 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ avec une vitesse fréquemment utilisée de 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les débits faibles permettent d'augmenter le temps de diffusion à travers la membrane et donc d'obtenir une concentration plus élevée de la molécule étudiée dans le dialysat en limitant, cependant, les volumes de dialysat collectés. Il est alors nécessaire de trouver un compromis entre avoir un volume de dialysat suffisamment important pour effectuer les analyses à posteriori et avoir une solution de dialysat suffisamment concentrée en molécules d'intérêt.

Une application originale de la microdialyse cérébrale est l'introduction d'une substance dans l'espace extracellulaire via la sonde de microdialyse [Höcht *et al.* (2007)].

L'ajout d'une certaine quantité d'un composé d'intérêt tel qu'un médicament, par exemple, permet à ce dernier de diffuser à travers la membrane de microdialyse jusqu'au tissu dans lequel elle est implantée. Cette technique, appelée microdialyse inverse, permet non seulement l'administration locale d'un composé mais également le prélèvement simultané des concentrations extracellulaires de différentes molécules. À ce jour, la microdialyse inverse a été principalement utilisée pour l'étude de l'effet de l'administration locale de médicaments sur la concentration cérébrale des neurotransmetteurs et des métabolites cérébraux. Plus récemment, la microdialyse inverse a été introduite pour l'évaluation de la pharmacodynamique d'agents thérapeutiques en recherche clinique. Le nombre important de travaux publiés au cours de ces dernières années a alors témoigné de l'importance de la technique de microdialyse inverse pour l'étude des aspects pharmacologiques et toxicologiques d'agents thérapeutiques.

La microdialyse cérébrale permet ainsi soit de recueillir des molécules présentes dans le liquide extracellulaire du tissu cérébral d'intérêt afin de doser leurs concentrations, soit de perfuser un composé d'intérêt tel qu'un agent thérapeutique afin d'évaluer sa captation par le tissu cérébral et la réponse moléculaire induite en présence de ce dernier.

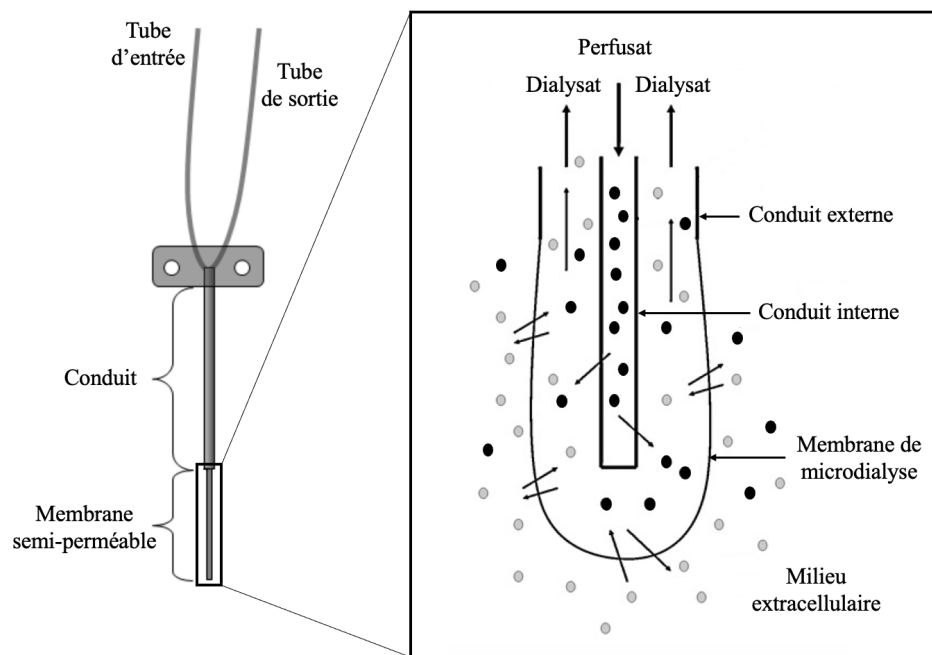


Figure 2.48. Principe de fonctionnement d'une sonde de microdialyse cérébrale [Gee-raerts *et al.* (2008)].

2.4.1.2 Applications précliniques et cliniques de la microdialyse inverse

Applications précliniques

La technique de microdialyse cérébrale inverse a été grandement utilisée, en préclinique, pour l'étude des effets locaux sur la neurotransmission de différentes molécules thérapeutiques telles que des antidépresseurs, des antipsychotiques, des antidouleurs ou encore des hallucinogènes.

L'effet d'une administration locale de morphine sur la concentration extracellulaire de GABA dans la substance grise périaqueducale de rats sains, connue pour jouer un rôle important dans la douleur et les mécanismes de défense, a, par exemple, été étudié [Stiller *et al.* (1996)].

Pour cela, une concentration de 100 μM de morphine a été perfusée pendant 30 min par une membrane de microdialyse préalablement implantée dans la substance grise périaqueducale de rats. Les auteurs ont constaté que la perfusion de morphine diminuait significativement le niveau de GABA dans le dialysat, passant de 54.5 \pm 6.6 nM à 28.2 \pm 4.2 nM. Ces résultats ont alors suggéré l'existence d'une inhibition induite par les opioïdes tels que la morphine de la libération de GABA dans la substance grise périaqueducale pouvant à son tour conduire à une désinhibition activant l'analgésie par la modulation des voies descendantes de la douleur [Laudadio *et al.* (2002)].

See & Berglind (2002) ont étudié, en 2002, l'effet des deux antipsychotiques, la clozapine et l'halopéridol, sur la libération de GABA dans le globus pallidus (GP) de rats.

Durant l'administration locale de clozapine via la membrane de microdialyse implantée

dans le GP du rat, une diminution de la concentration extracellulaire de GABA a été relevée. Cette diminution n'a pas été retrouvée lors d'une administration locale d'halopéridol. Les auteurs en ont alors conclu que la clozapine avait eu des actions directes dans le GP tandis que les effets de l'halopéridol avaient été très probablement atténués par son action dans le striatum. La capacité de la clozapine à diminuer efficacement la libération de GABA a ainsi pu constituer le mécanisme par lequel cet antipsychotique est dépourvu des effets secondaires moteurs qui caractérisent couramment les neuroleptiques tels que l'halopéridol.

Une autre application préclinique majeure de la microdialyse inverse est l'étude du mécanisme d'action de divers agents thérapeutiques administrés localement chez des modèles animaux de pathologies cérébrales.

La microdialyse inverse est une technique qui peut aussi être associée à d'autres méthodes permettant de surveiller les effets d'agents thérapeutiques de manière indépendante à cette dernière comme, par exemple, l'activité électrique au niveau du site de perfusion, les réponses comportementales, l'activité convulsive ou encore la température corporelle.

Une étude combinant la microdialyse cérébrale inverse et l'électroencéphalographie (EEG) a, par exemple, permis d'étudier le mécanisme d'induction et de traitement d'une forme particulière d'épilepsie, l'épilepsie d'absence [Richards *et al.* (2003)].

Un médicament antiépileptique, l'éthosuximide, a été administré, par microdialyse inverse et à différentes concentrations, dans le noyau ventro-basal thalamique dans un modèle génétique de rats épileptiques. Une électrode EEG a aussi été implantée dans le noyau ventro-basal thalamique et à des coordonnées stéréotaxiques relativement proches de celles utilisées pour l'implantation de la membrane de microdialyse. Les auteurs ont constaté que seule une administration du médicament antiépileptique à une concentration assez importante avait induit une réduction significative mais retardée des pointes et des ondes de décharge, caractéristiques de l'épilepsie d'absence, sur l'électroencéphalogramme. Cette observation a alors suggéré que le ciblage du noyau thalamique seul pouvait être insuffisant pour une action immédiate et complète de l'éthosuximide pour le traitement de l'épilepsie d'absence.

Applications cliniques

Les études portant sur l'utilisation de la microdialyse cérébrale inverse sur des sujets sains sont très limitées pour des raisons éthiques que cela peut soulever. Cependant, de nombreuses investigations ont été menées sur des patients atteints de diverses pathologies cérébrales et sur l'apport potentiel de cette technique dans l'évaluation des effets d'agents thérapeutiques et comme un outil thérapeutique innovant.

Ronquist *et al.* (1992) ont décrit une nouvelle méthode de traitement de 3 patients atteints de gliome malin inopérable par l'administration directe et continue d'acide 2,4-diaminobutyrique, par microdialyse inverse, dans le tissu tumoral pendant 14 à 21 jours.

Une à trois sondes de microdialyse ont été implantées dans le tissu tumoral par des petites incisions durales chez les 3 patients inclus dans cette étude. Au cours du traitement, aucun effet secondaire néfaste attribuable au médicament a été relevé. Une nécrose massive de la tumeur a été constatée par la comparaison d'images tomographiques acquises avant et après le traitement local administré par microdialyse inverse. L'acide 2,4-diaminobutyrique administré localement dans le tissu tumoral cérébral malin a ainsi été bien toléré et a montré une activité antitumorale prometteuse chez les 3 patients atteints de gliome malin inopérable.

En 2007, [Bergenheim et al. \(2007\)](#) ont aussi étudié les effets de l'acide 2,4-diaminobutyrique administré par microdialyse inverse chez 10 patients atteints de glioblastome en se focalisant sur les effets métaboliques de cet dernier.

Une chirurgie stéréotaxique a été réalisée afin d'implanter une ou deux sondes dans le tissu tumoral et deux sondes de référence, dans le tissu cérébral sain et dans le tissu sous-cutané abdominal. Les sondes tumorales ont été perfusées avec une concentration de 80 mM ou de 120 mM d'acide 2,4-diaminobutyrique et les sondes de référence, avec une solution de Ringer, avec un débit de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$. Au cours du traitement, une augmentation de la concentration des acides aminés extracellulaires (glutamate, alanine, glycine, aspartate, sérine, thréonine et taurine) a été constatée, démontrant une influence significative sur le milieu intracellulaire d'acides aminés. En particulier, l'élévation de la concentration de glutamate et de la concentration de la taurine a été considérée comme marqueur d'une toxicité cellulaire induite par l'agent chimiothérapeutique.

Ainsi, la microdialyse inverse semble être une technique considérable pour l'étude de différents agents pharmacologiques et toxicologiques car elle peut permettre, à la fois, l'administration locale de molécules thérapeutiques d'une manière peu invasive et le suivi simultané de leurs effets *in vivo* sur des composés endogènes et sur d'autres paramètres comme nous avons pu le voir précédemment.

La découverte et l'identification de certains biomarqueurs peuvent fournir des informations sur la compréhension des mécanismes de base et sur l'évolution de diverses pathologies cérébrales tout en apportant une analyse précise des effets biologiques et pharmacocinétiques d'un traitement administré localement.

Toutefois, cette technique de microdialyse inverse est entravée par plusieurs inconvénients tels que, entre autres, l'importante fragilité de la membrane et la génération très fréquente d'une altération tissulaire (glioïse ou inflammation) suite à l'implantation de la membrane affectant alors les performances de cette dernière. De plus, il est aussi parfois difficile de connaître précisément la concentration de la molécule d'intérêt administrée localement par microdialyse inverse pouvant alors biaiser les études portant sur l'analyse de l'efficacité thérapeutique de la molécule et de sa toxicité.

La microdialyse inverse est alors une technique qui fait appel à une certaine expertise et

avec des équipements qui peuvent se révéler relativement coûteux. C'est la raison pour laquelle d'autres méthodes d'injection intracérébrale peuvent lui être préférées.

2.4.2 Autres méthodes d'injection intracérébrale

Les autres méthodes d'injection intracérébrale peuvent se baser sur l'utilisation d'outils relativement simples tels qu'une aiguille ou un cathéter d'injection ou sur des techniques plus poussées comme la création d'implants cérébraux ou de systèmes miniaturisés, implantables et contrôlables à distance.

Tout d'abord, l'utilisation d'aiguilles pour injecter un composé d'intérêt dans le tissu cérébral est une technique couramment utilisée lors du développement de modèles animaux de diverses pathologies cérébrales. La plupart de ces dernières nécessite, en effet, une injection unique dans une région cérébrale particulière ciblée par la technique de chirurgie stéréotaxique. Afin d'obtenir des modèles animaux réussis, l'injection intracérébrale de virus, de cellules tumorales ou de molécules doit être parfaitement exécutée. Au fur et à mesure des connaissances et des avancées technologiques, les protocoles chirurgicaux existants sont mis à jour pour permettre aux chercheurs d'améliorer l'efficacité et la sécurité de l'injection intracérébrale par une aiguille [Mathon *et al.* (2015)].

Ensuite, l'utilisation de cathéters pour effectuer des injections intracérébrales a donné naissance à une technique prometteuse appelée administration CED (pour *Convection-Enhanced Delivery*, en anglais) [Mehta *et al.* (2017)]. Cette technique se base sur une diffusion lente d'une molécule d'intérêt par la génération d'un gradient de pression à l'extrémité du cathéter d'injection préalablement implanté dans la région cérébrale désirée. Contrairement à l'utilisation d'aiguilles, elle peut être notamment utilisée pour des injections intracérébrales répétées par l'implantation chronique de cathéters. L'administration CED a très vite été proposée comme une méthode particulièrement encourageante pour administrer localement des agents thérapeutiques qui, autrement, ne traverseraient pas la barrière hémato-éncéphalique ou qui seraient trop volumineux pour diffuser de manière efficace sur une distance importante.

La technique CED a été spécialement utilisée lors du développement et de l'analyse des effets thérapeutiques et néfastes de différents traitements des gliomes malins.

Une étude, réalisée en 2003, a, par exemple, porté sur la détermination de l'innocuité et de l'efficacité de deux agents chimiothérapeutiques, la carboplatine et la gemcitabine, administrés par la technique CED, chez des rats sains et chez des rats porteurs d'un modèle de tumeurs cérébrales, le gliome 9L [Degen *et al.* (2003)].

Des études de toxicité à doses croissantes ont été réalisées en perfusant le striatum et le tronc cérébral de rats sains avec de la carboplatine (0,1, 1 et 10 mg/ml) ou de la gemcitabine (0,4, 4, et 40 mg/ml). Pour étudier l'efficacité thérapeutique des deux molécules, la tumeur et les régions péri-tumorales des rats porteurs d'un gliome 9L ont été soit perfusées

par une solution saline, soit par de la carboplatine (1 mg/ml) ou soit par de la gemcitabine (4 mg/ml) 7 jours après l'injection intracérébrale des cellules tumorales. Un autre groupe de rats pathologiques a été traité par voie systémique. Les auteurs ont constaté une toxicité chez les rats qui avaient reçu, par la technique CED et pour les deux agents chimiothérapeutiques étudiés, la dose la plus élevée. De plus, parmi les rats porteurs d'un gliome 9L, tous les animaux ayant été traités par une administration locale d'une solution saline ou par voie systémique sont décédés dans les 26 jours suivant l'injection des cellules tumorales. La survie à long terme (120 jours) et l'éradication de la tumeur ont été observées dans les deux groupes de rats pathologiques traités par la technique CED (75% des rats pathologiques traités avec de la carboplatine et 50% des rats pathologiques traités avec de la gemcitabine). Ces résultats précliniques ont ainsi permis de soutenir la poursuite du développement de la technique CED permettant alors de perfuser, de manière locale, des agents chimiothérapeutiques avec une efficacité antitumorale accrue et sans toxicité notable.

Avec les résultats prometteurs obtenus à partir des travaux précliniques, quelques essais cliniques portant sur l'évaluation de la technique CED dans un cadre pathologique ont été initiés.

Un essai clinique de phase I et II, dont les résultats ont été publiés en 2004, a étudié l'efficacité thérapeutique d'un agent chimiothérapeutique, le paclitaxel, administré par la technique CED, chez 15 patients porteurs de glioblastomes récurrents ou d'astrocytomes anaplasiques ne répondant pas aux traitements conventionnels (résection chirurgicale, chimiothérapie et radiothérapie) [Lidar *et al.* (2004)].

Pour chaque patient, un cathéter a été placé à l'intérieur de la tumeur et aussi loin que possible des cavités kystiques ou nécrotiques et du système ventriculaire. Chaque patient a reçu environ 6 ml par jour d'une solution contenant le paclitaxel avec un débit de perfusion de 0.3 ml/heure et le traitement par CED a été réalisé sur 5 jours consécutifs. Le suivi des patients a été effectué par l'acquisition d'images IRM conventionnelles et de diffusion acquises avant et au cours du traitement par CED et à des intervalles réguliers. Sur les 15 patients inclus dans cet essai clinique, 5 réponses thérapeutiques totales et 6 partielles ont été observées par le suivi IRM, soit un taux de réponse thérapeutique de 73%. L'effet antitumoral a aussi été confirmé par des études histologiques réalisées sur des biopsies effectuées à la fin du traitement. Une mauvaise réponse thérapeutique a été particulièrement associée à une fuite du médicament administré par CED dans l'espace sous-arachnoïdien, dans les ventricules et dans des cavités tissulaires formées par des résections précédentes ou chez des patients ayant des tumeurs possédant une zone nécrosée très étendue. Malgré une réponse thérapeutique positive, diverses complications ont eu lieu incluant des méningites chimiques chez 6 patients, des complications infectieuses chez 3 patients et une détérioration neurologique transitoire chez 4 patients.

Par conséquent, l'administration par CED de paclitaxel chez des patients atteints de

gliomes malins a été associée à un taux de réponse antitumorale élevé, bien qu'elle ait aussi été associée à une incidence significative relativement préoccupante de complications cérébrales. Diverses explorations doivent donc être menées pour améliorer l'efficacité et réduire les effets secondaires de cette approche thérapeutique.

Bien qu'elles puissent faire appel à des notions plus complexes, l'utilisation d'aiguilles ou de cathéters constitue une des méthodes les plus simples pour administrer un composé d'intérêt dans le tissu cérébral.

D'autres stratégies d'administration intracérébrale plus élaborées ont été développées comme, par exemple, l'utilisation d'implants cérébraux.

Cette dernière constitue une méthode d'administration locale particulièrement invasive dans laquelle un matériau biodégradable, constitutif de l'implant cérébral, est imprégné d'agents thérapeutiques.

Cette technique a notamment fait l'objet de nombreux travaux précliniques comme, par exemple, celui réalisé en 2002 et portant sur l'étude de l'efficacité et de la toxicité d'une molécule chimiothérapeutique, la mitoxantrone, délivrée à partir de plaquettes polymères biodégradables implantées chez des rats sains et chez des rats porteurs d'un gliome 9L [Dimeco *et al.* (2002)].

Pour déterminer la dose maximale tolérée de mitoxantrone, 20 rats sains ont subi une implantation intracérébrale de plaquettes contenant 0, 1, 5, 10 ou 20% de mitoxantrone et pour étudier son efficacité thérapeutique, un total de 86 rats porteurs d'un gliome 9L ont été implantées par des plaquettes contenant de la mitoxantrone (0, 1, 5 ou 10%) 5 jours après l'injection des cellules tumorales et leur survie a été analysée.

La mitoxantrone libérée de la matrice biodégradable de la plaquette a atteint des concentrations thérapeutiques dans le cerveau de rats pendant au moins 35 jours. Seuls les animaux implantés avec des plaquettes ayant une dose de 20% de mitoxantrone ont montré des signes de toxicité significative et les animaux traités avec des plaquettes biodégradables chargées de mitoxantrone ont eu une survie significativement améliorée par rapport aux animaux témoins.

Cette étude a donc montré que l'administration intratumorale de mitoxantrone par l'utilisation d'implants cérébraux a permis de délivrer, sur le long terme, des doses efficaces permettant d'améliorer la survie.

D'autres moyens d'administration intracérébrale ont été développés plus récemment comme, par exemple, un système neuronal miniaturisé permettant l'administration chronique et locale de médicaments et décrit dans les travaux de Dagdeviren *et al.* (2018). Ce système a été intégré à une électrode en tungstène afin d'enregistrer l'activité neuronale en vue d'une action potentielle du composé administré par ce dernier et à deux canaux fluidiques reliés à des pompes sans fils. Dagdeviren *et al.* ont démontré que ce dispositif a pu moduler chimiquement l'activité neuronale locale chez le petit animal et chez le primate non humain, en enregistrant simultanément l'activité neuronale par électroencéphalographie.

Ainsi, comme nous avons pu le voir précédemment et de manière non exhaustive, il existe de nombreuses techniques et méthodes d'injection intracérébrale qui peuvent principalement différer en fonction de l'application, de la fréquence de l'injection, de la taille de la région cérébrale d'intérêt et donc de la précision de l'injection.

La possibilité d'associer une méthode d'injection intracérébrale avec d'autres techniques d'analyse comme, par exemple, l'électroencéphalographie par le positionnement d'une électrode EEG à proximité immédiate du site d'administration d'une molécule d'intérêt permettant d'étudier de manière locale et précise l'effet de cette dernière sur l'activité électrique du tissu cérébral affecté ouvre alors la voie à d'autres initiatives en matière de développement de dispositifs combinant un système d'injection et une méthode d'analyse.

Conception et réalisation des micro-antennes RMN implantables

Suite à l'étude bibliographique menée sur différents types de micro-antennes RMN existantes, leurs divers procédés de fabrication et leurs applications en IRM et en SRM, nous avons, ici, choisi de nous orienter sur le développement de micro-antennes RMN implantables ayant un procédé de construction simple, facilement reproductible, peu onéreux et en utilisant le cuivre comme matériau conducteur.

Ce chapitre présente les différentes étapes comprenant la conceptualisation, la réalisation et l'évaluation électromagnétique d'un modèle de micro-antennes RMN implantables.

Les réflexions menées dans l'élaboration de ce modèle et le processus de fabrication de ses principaux éléments constitutifs sont exposés.

Ensuite, nous présentons la réalisation de simulations électromagnétiques dont les objectifs principaux ont été de visualiser le champ magnétique \vec{B}_1 généré et d'estimer le volume de détection des micro-antennes RMN implantables.

Et, pour finir, des expériences *in vitro* ayant permis d'analyser le gain en sensibilité obtenu par l'utilisation des micro-antennes RMN implantables développées par rapport à l'utilisation d'une antenne conventionnelle externe (aussi appelée antenne conventionnelle extracorporelle) sont évoquées.

3.1 Modèle des micro-antennes RMN implantables

3.1.1 Cahier des charges

Lors de la conception de tout dispositif, il est important et nécessaire de respecter un cahier des charges synthétisant l'ensemble des spécifications et des exigences auxquelles devra répondre le futur dispositif.

Ici, les micro-antennes RMN implantables ont dû, en effet, satisfaire différents critères et, en particulier, des critères géométriques et de performances électromagnétiques et des critères d'intégration dans un environnement magnétique.

Nous détaillons dans ce qui suit les principaux points que les micro-antennes RMN implantables ont dû respecter.

3.1.1.1 Contraintes géométriques et de performances électromagnétiques

Tout d'abord, les micro-antennes RMN implantables ont imposé de fortes contraintes géométriques afin de limiter au maximum leur caractère invasif et ainsi préserver les tissus sains et pathologiques implantés.

La forme principale et les dimensions des micro-antennes RMN implantables ont donc été fixées par la nécessité de préserver les tissus au moment de l'insertion, au cours de l'implantation et à la position finale de la micro-antenne RMN dans le tissu implanté.

Une des formes qui a particulièrement retenu notre attention a été la forme d'aiguille caractérisée par un diamètre limité à quelques centaines de micromètres et une longueur limitée à quelques millimètres en fonction de la profondeur de la zone d'intérêt. Quelques exemples d'aiguilles implantables ont notamment été présentés dans le **paragraphe 2.3.2.3**.

De plus, les micro-antennes RMN implantables ont dû être suffisamment rigides afin de s'insérer facilement dans les tissus et n'engendrer aucune déformation lors de l'implantation qui aurait pu alors entraîner une destruction importante des tissus et une dégradation des caractéristiques et performances électromagnétiques des micro-antennes RMN implantées. Pour cela, nous avons supposé qu'un fil de cuivre ayant un diamètre ni trop petit (afin d'assurer la rigidité) et ni trop grand (afin de minimiser le caractère invasif) devait être utilisé. L'utilisation d'un fil de cuivre ayant un diamètre relativement petit permettait aussi de maximiser le volume de détection des micro-antennes RMN implantables.

Outre la préservation des tissus sains ou pathologiques implantés, la forme et la dimension des micro-antennes RMN implantables ont dû aussi tenir compte des performances électromagnétiques souhaitées et, en particulier, de la zone de sensibilité de ces dernières déterminant ainsi la taille de la région d'intérêt. Par ailleurs, afin de limiter les distorsions du champ magnétique statique \vec{B}_0 pouvant être causées par l'artefact de susceptibilité présent à la frontière de deux éléments ayant des susceptibilités magnétiques différentes, il a été nécessaire d'utiliser, pour fabriquer la boucle résonante des micro-antennes RMN implantables, un matériau conducteur ayant une susceptibilité magnétique relativement proche du tissu biologique environnant.

Nous avons pu alors en conclure que la conception des micro-antennes RMN implantables au cours de ces travaux de thèse a dû s'établir selon un compromis important entre, d'une part, les performances électromagnétiques souhaitées et basées sur le volume de détection et le rapport signal-sur-bruit disponible et, d'une autre part, le caractère mini-invasif, indispensable au maintien de l'intégrité du tissu implanté.

Et enfin, il est également important de souligner que tout dispositif implantable doit satisfaire des exigences de stérilité et de biocompatibilité afin d'éviter toute infection et interférence avec le tissu biologique (forte réaction inflammatoire/immunitaire, rejet,...) dans lequel il a été implanté. Seule une réponse biologique appropriée au phénomène d'introduction et d'implantation de la micro-antenne RMN dans le tissu d'intérêt devait

être attendue.

3.1.1.2 Compatibilité avec l'environnement IRM

Lors de la phase de conception des micro-antennes RMN implantables et, en général, d'antennes RF, une grande attention sur la compatibilité de ces dernières avec un environnement magnétique doit être portée.

En effet, la présence des micro-antennes RMN implantables et principalement de leurs circuits électroniques constitués de divers éléments tels que des condensateurs, dans un champ magnétique statique intense (ici, de 7 T), ne devait en aucun cas perturber le déroulement des expériences RMN.

Pour ce faire, l'utilisation de tout composé ayant des parties magnétiques a été proscrite. Cela aurait, en effet, pu causer une perturbation des lignes de champ magnétique et entraîner, par exemple, divers artefacts visibles sur les images IRM acquises avec les micro-antennes RMN implantables.

3.1.2 Modèle en forme de boucle

Un modèle principal de micro-antennes RMN implantables en forme de boucle et appelé micro-antenne « loop » a été développé au cours de cette thèse.

Ce modèle a été fondé sur une géométrie en forme d'aiguille afin de satisfaire les conditions décrites dans les paragraphes précédents.

La micro-antenne « loop », dont le processus de fabrication est décrit dans le **paragraphe 3.2**, a pu être principalement définie comme étant une antenne IRM conventionnelle miniature implantable. Pour cette micro-antenne RMN implantable, nous avons, en effet, choisi de nous orienter sur la conception d'une boucle résonante de forme elliptique, géométrie simple largement utilisée lors du développement d'antennes surfaciques conventionnelles extracorporelles [Giovannetti *et al.* (2018)].

En prévision des futures applications *in vivo* de ce modèle de micro-antennes RMN implantables et portant principalement sur l'étude du tissu cérébral en conditions saines et pathologiques, nous avons choisi d'opter pour une boucle résonante ayant une longueur de 3 mm et constituée d'un fil de cuivre. Cette longueur a été choisie car nous avons voulu nous focaliser sur l'analyse du cortex du rat ayant une épaisseur d'environ 3 mm et le cuivre a été utilisé comme matériau conducteur car sa susceptibilité magnétique volumique χ_v égale à -9.63 ppm [Lide (2007)] est relativement proche de celle des tissus cérébraux comprise entre -9.2 ppm et - 8.8 ppm [Duyn & Schenck (2016)] limitant ainsi les artefacts de susceptibilité magnétique.

Le caractère biocompatible des micro-antennes RMN implantables développées a été assuré par l'utilisation d'un fil de cuivre dit émaillé, c'est-à-dire recouvert d'un vernis protecteur et biocompatible.

3.2 Processus de fabrication

3.2.1 Boucle résonante

Un fil de cuivre émaillé en polyuréthane ayant un diamètre extérieur de $150\ \mu\text{m}$ (Tru Components 2UEWF, Conrad, Hirschau, Allemagne) a été utilisé pour construire la boucle résonante. Le polyuréthane est un polymère très répandu dans les domaines de la médecine et de la pharmacie en raison de sa forte biocompatibilité et dont l'une des premières applications biomédicales a été le développement de prothèses mammaires [Marois & Guidoin (2001)]. Le fil de cuivre a été plié pour former une boucle de forme elliptique.

Afin d'anticiper le développement d'un dispositif combinant une micro-antenne RMN implantable et un moyen d'administration d'un composé d'intérêt tel qu'un capillaire d'injection placé au centre de la boucle de détection (cf. **chapitre 5**), nous avons réalisé deux prototypes de la micro-antenne « loop » ayant des largeurs différentes.

Le premier prototype avait alors une longueur de 3 mm, une largeur de $450\ \mu\text{m}$ et une épaisseur (correspondant au diamètre du fil de cuivre utilisé) de $150\ \mu\text{m}$. Le deuxième prototype avait, quant à lui, une largeur de $700\ \mu\text{m}$ et une longueur et une épaisseur, toutes les deux identiques à celles du prototype précédent. Ces différentes dimensions ont été choisies afin d'obtenir une analyse RMN sur des régions d'intérêt ayant un volume inférieur au microlitre.

Les deux extrémités du fil de cuivre ont ensuite été insérées dans un tube en polyimide biocompatible ayant une longueur de 5 mm, un diamètre intérieur de $350\ \mu\text{m}$ et un diamètre extérieur de $380\ \mu\text{m}$ (MicroLumen Medical Tubing, Oldslar, Floride, États-Unis). Une colle biocompatible (Dentalon® plus, Phymep, Paris, France) a été utilisée pour sceller le tube en polyimide.

La **figure 3.1** illustre les deux prototypes de la boucle résonante de la micro-antenne « loop ».

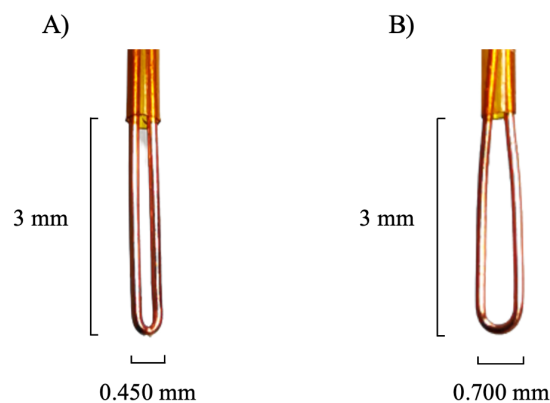


Figure 3.1. Boucles résonantes des micro-antennes RMN implantables « loop » (A) Prototype ayant une largeur de $450\ \mu\text{m}$. (B) Prototype ayant une largeur de $700\ \mu\text{m}$ (en prévision de l'introduction d'un moyen d'administration d'un composé d'intérêt placé au centre de la boucle de détection).

3.2.2 Circuit d'accord et d'adaptation

Les deux extrémités du fil de cuivre constituant les boucles résonantes des deux prototypes du modèle de la micro-antenne « loop » ont ensuite été soudées sur une carte de circuit imprimé à environ 1 cm de l'extrémité du tube de polyimide.

Le circuit d'accord et d'adaptation, dont le rôle a été décrit au **paragraphe 2.2.1.2**, a été composé de deux condensateurs amagnétiques fixes (CMS 0805 Weltron 460036 10 pF, Conrad, Hirschau, Allemagne) et de deux condensateurs amagnétiques variables (Vishay BFC 280905271 2-18 pF, RS Components, Beauvais, France), utilisés pour l'accord et l'adaptation des micro-antennes RMN implantables. L'un des deux condensateurs fixes a été placé en parallèle de la boucle résonante et a joué le rôle d'un condensateur de pré-accord et l'autre a été placé en série et a joué le rôle d'un condensateur de pré-adaptation. Les condensateurs de pré-accord et de pré-adaptation ont permis de faciliter l'obtention d'un bon accord et d'une bonne adaptation par la suite affinés par les condensateurs variables d'accord et de d'adaptation.

3.2.3 Circuit final et complet des micro-antennes RMN implantables

La **figure 3.2** illustre le circuit électronique final des micro-antennes RMN implantables développées dans ces travaux.

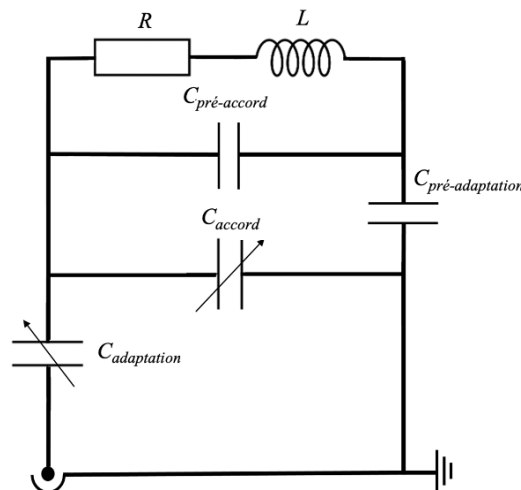


Figure 3.2. Circuit électronique final des micro-antennes RMN implantables.

Comme l'illustre la figure précédente, le circuit électronique n'a pas inclus de circuit de découplage ni de préamplificateur faible-bruit, points qui seront abordés dans les perspectives de ce chapitre.

Une photographie du prototype ayant une largeur de 700 μm et du circuit électronique complet est illustrée à la **figure 3.3**.

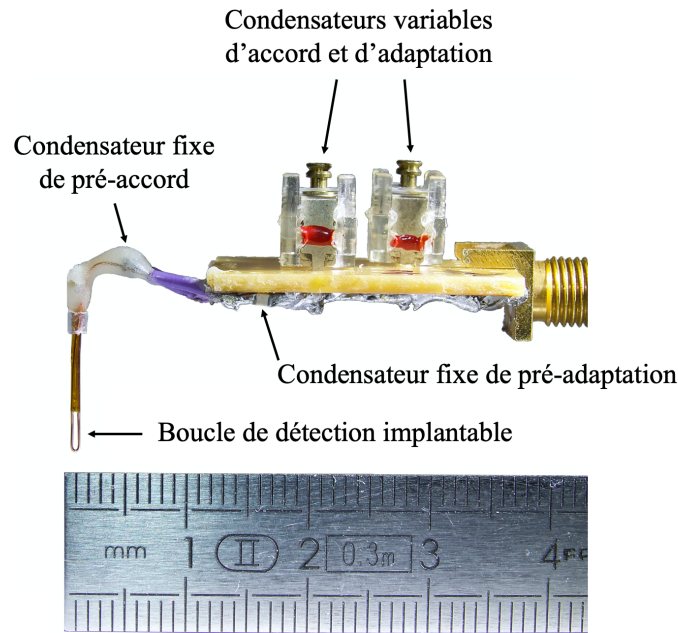


Figure 3.3. Vue d'ensemble des principaux éléments constitutifs de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de $700\ \mu\text{m}$ (boucle de détection implantable et circuit d'accord et d'adaptation).

3.3 Modélisation électromagnétique par éléments finis

3.3.1 Logiciel COMSOL Multiphysics ®

Les simulations électromagnétiques par éléments finis ont été réalisées avec le logiciel COMSOL Multiphysics ® (COMSOL Inc., Stockholm, Suède), un des logiciels leaders dans la modélisation et la simulation multiphysique.

La méthode des éléments finis (MEF ou FEM, pour *Finite Element Method*, en anglais) est une technique numérique permettant de résoudre un éventail très large de problématiques de physique générale telles que la modélisation des phénomènes électromagnétiques, par exemple [Pepper & Heinrich (2017)].

Pour des systèmes physiques impliquant des géométries et des caractéristiques matérielles compliquées, il n'est généralement pas possible d'obtenir des solutions mathématiques analytiques pour simuler la réponse du système physique. En effet, ces solutions analytiques nécessiteraient la résolution d'équations différentielles ordinaires ou partielles beaucoup trop complexes en raison des caractéristiques de ce dernier.

Le recours à des méthodes numériques telles que la MEF permettent alors d'approcher la solution de ces équations différentielles par la résolution d'équations linéaires en subdivisant le domaine physique en plus petites unités interconnectées (éléments finis). Une formulation simplifiée du problème est alors trouvée pour chaque élément constitutif du

domaine. Les systèmes d'équations de tous les éléments sont ensuite combinés donnant ainsi une solution approchée au problème physique étudié. Les solutions de ces équations sont principalement calculées en utilisant des techniques d'algèbre linéaire.

Le logiciel COMSOL Multiphysics® possède un module RF permettant d'optimiser la conception d'antennes RF en étudiant, par exemple, la propagation des ondes électromagnétiques et les effets de la résonance pour des applications à haute fréquence. Le guide de l'utilisateur de ce module a été utilisé tout au long de la mise en place de la modélisation électromagnétique par éléments finis des micro-antennes RMN implantables développées dans ces travaux de thèse [Support (2017)].

L'interface de ce dernier a permis de réaliser et de visualiser les différentes étapes de la simulation basée sur la MEF telles que la modélisation de la géométrie de l'antenne RF étudiée, la génération du maillage, l'ajout de conditions physiques et de conditions aux limites ou encore le calcul des solutions de l'étude désirée.

Ces différentes étapes sont décrites dans les paragraphes suivants.

3.3.2 Géométrie et maillage des micro-antennes RMN implantables

La première étape de ces simulations RF a été de modéliser la géométrie des boucles implantables des micro-antennes RMN développées et décrites dans le **paragraphe 3.2.1**. Étant donné la géométrie relativement simple de ces boucles implantables, nous avons pu directement modéliser ces dernières en trois dimensions sans être impacté par une demande importante de mémoire nécessaire et un long temps de calcul.

En plus de la forme géométrique des boucles des micro-antennes RMN, il a également fallu tenir compte du matériau constitutif de ces dernières. Pour cela, le logiciel COMSOL Multiphysics® disposait d'une vaste base de données de matériaux prédéfinis. Pour chaque matériau et notamment le cuivre, différentes propriétés telles que la perméabilité relative, la conductivité électrique, la permittivité relative ou encore la masse volumique étaient indiquées et prises en compte lors de l'affectation du matériau à la structure géométrique.

La **figure 3.4** illustre la construction géométrique 3D du prototype de la boucle implantable de la micro-antenne « loop » ayant une longueur de 3 mm et une largeur de 450 μm . La **figure 3.5** illustre la construction géométrique 3D du prototype de la boucle implantable de la micro-antenne « loop » ayant une longueur de 3 mm et une largeur de 700 μm .

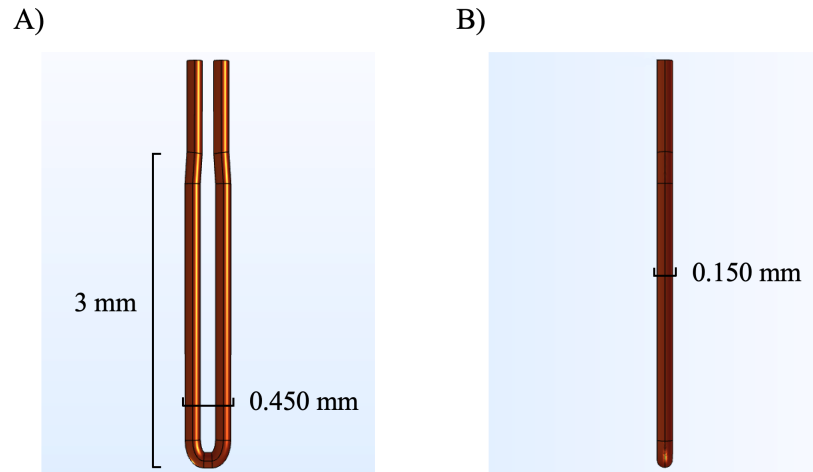


Figure 3.4. Construction géométrique 3D du prototype de la boucle implantable de la micro-antenne « loop » ayant une longueur de 3 mm et une largeur de 450 μm . (A) Vue de face. (B) Vue de profil.

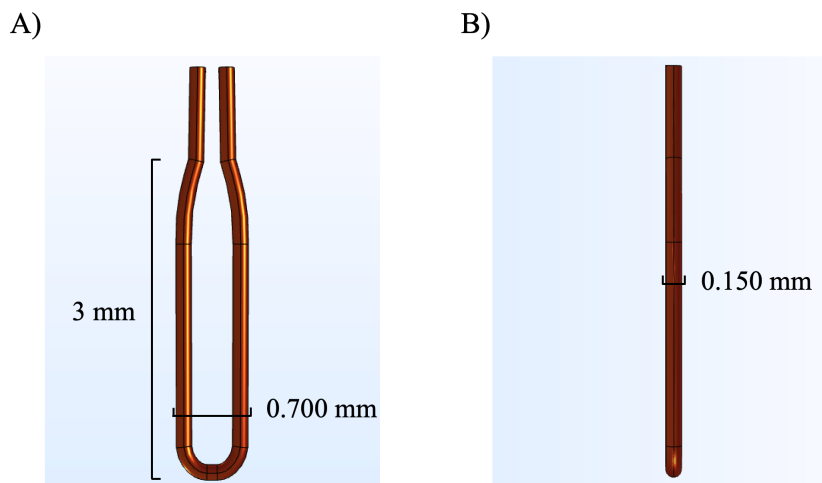


Figure 3.5. Construction géométrique 3D du prototype de la boucle implantable de la micro-antenne « loop » ayant une longueur de 3 mm et une largeur de 700 μm . (A) Vue de face. (B) Vue de profil.

Comme déjà évoqué précédemment, la MEF repose sur un découpage du domaine physique en plus petits domaines appelés éléments finis selon un maillage particulier. En fonction du problème étudié et de la géométrie du domaine physique, ces éléments peuvent être soit des éléments de forme polygonale (triangles, quadrilatères,...) qui se contentent de recouvrir la surface du domaine physique (maillage surfacique ou 2D), soit des éléments volumiques (tétraèdres, hexaèdres,...) maillant l'intégralité du volume du domaine (maillage volumique ou 3D).

Le maillage représente une étape fondamentale de la modélisation par éléments finis car il conditionne toute la suite du calcul comme la précision des résultats, les ressources

informatiques nécessaires en termes de mémoire vive et le temps de calcul. En effet, une discrétisation assez grossière conduira à des résultats imprécis et loin de la réalité tandis qu'un maillage fin aboutira à des résultats précis et proches de la réalité mais sera beaucoup plus coûteux en temps et en puissance de calcul. Il a été alors nécessaire d'optimiser le maillage afin de trouver un compromis entre la rapidité et la précision du calcul.

Aujourd'hui, la plupart des logiciels de MEF tels que COMSOL Multiphysics® possèdent des algorithmes de maillage automatique permettant de simplifier la discrétisation du domaine physique avec néanmoins une paramétrisation qui doit être choisie par l'utilisateur. Le logiciel COMSOL Multiphysics® contient, par exemple, neuf ensembles de paramètres de taille de maillage allant de « extrêmement fin » à « extrêmement grossier » en passant par « normal ». Ces différents jeux de paramètres sont déterminés pour chaque géométrie afin de toujours appliquer un maillage de haute qualité.

Pour mailler les différentes boucles implantables de la micro-antenne RMN « loop » développées dans ces travaux, nous avons alors choisi d'appliquer un maillage « fin » 3D tétraédrique. Le choix de ce dernier a été fixé suite à différents essais nous ayant permis de trouver un bon compromis entre la précision du résultat et le temps du calcul.

Les caractéristiques des éléments des maillages prédéfinis ont été déterminées par un ensemble de 5 paramètres pouvant être modifiés par l'utilisateur et qui étaient :

- la taille maximale de l'élément : limite la taille maximale de chaque élément du maillage ;
- la taille minimale de l'élément : limite la taille minimale de chaque élément du maillage ;
- le taux de croissance maximal des éléments : limite la différence de taille entre deux éléments adjacents ;
- le facteur de courbure : limite la taille d'un élément du maillage le long d'une frontière courbe ;
- la résolution des régions étroites : contrôle le nombre de couches d'éléments du maillage dans les régions étroites.

Le **tableau 3.1** présente les caractéristiques des éléments du maillage effectué sur les deux prototypes du modèle de la micro-antenne « loop ».

Tableau 3.1 – Valeurs des 5 caractéristiques des éléments du maillage effectué sur les deux prototypes du modèle de la micro-antenne « loop »

Caractéristique du maillage	Micro-antenne« loop »
Taille maximale de l'élément (μm)	318
Taille minimale de l'élément (μm)	39
Taux de croissance maximal des éléments	1.45
Facteur de courbure	0.5
Résolution des régions étroites	0.6

La **figure 3.6** affiche la vue 3D du maillage utilisé pour la simulation électromagnétique des deux prototypes de la boucle implantable de la micro-antenne « loop ».

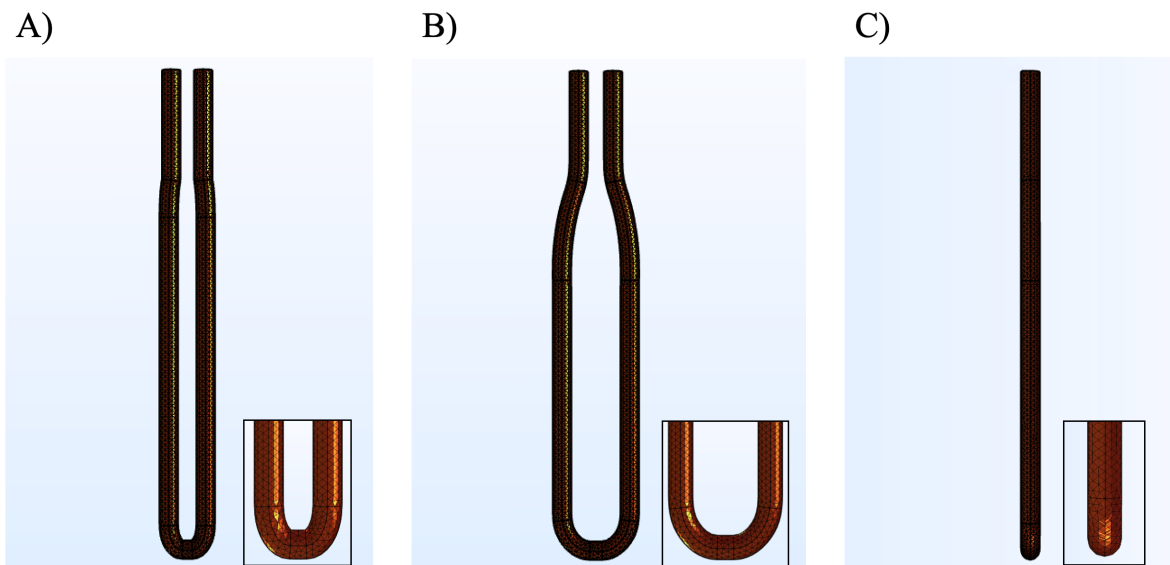


Figure 3.6. Vue 3D du maillage utilisé pour la simulation électromagnétique des deux prototypes de la boucle implantable de la micro-antenne « loop ». (A) Vue de face du maillage du prototype ayant une largeur de $450 \mu\text{m}$. (B) Vue de face du maillage du prototype ayant une largeur de $700 \mu\text{m}$. (C) Vue de profil du maillage des deux prototypes. Les images agrandies permettent d'observer la structure fine et tétraédrique du maillage choisi.

3.3.3 Conditions physiques et conditions aux limites

Pour rappel, les simulations RF effectuées avec le logiciel COMSOL Multiphysics® ont eu comme objectif principal l'évaluation du champ magnétique \vec{B}_1 créé par les boucles résonantes des micro-antennes RMN implantables.

Pour cela, différentes conditions physiques et conditions aux limites ont dû être ajoutées. Tout d'abord, les boucles implantables des micro-antennes RMN ont dû être considérées comme des conducteurs électriques parfaits. Une condition physique appelée PEC (pour *Perfect Electric Conductor*, en anglais) a été appliquée sur l'entièreté de la surface de chaque boucle implantable.

Ensuite, les boucles implantables étant considérées comme des conducteurs électriques parfaits, c'est-à-dire sans pertes, le problème physique a dû être résolu uniquement dans l'air environnant. Chaque boucle implantable a ainsi été placée dans une sphère d'air. Pour cela, le matériau « air » inclus dans la base de données des matériaux prédéfinis a été affecté à la structure géométrique de la sphère. De plus, des conditions aux limites de diffusion ont été utilisées le long des frontières de cette dernière pour empêcher toute réflexion dans le domaine de la modélisation. Le diamètre de la sphère a dû être suffisamment grand afin que la solution ne soit pas affectée par les conditions aux limites extérieures précédentes. La figure suivante illustre une vue 3D de la boucle implantable de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 700 μm placée au centre de la sphère d'air ayant un diamètre de 1 cm.

Le maillage de la sphère d'air a été identique à celui utilisé pour la boucle implantable (cf. [tableau 3.1](#)).

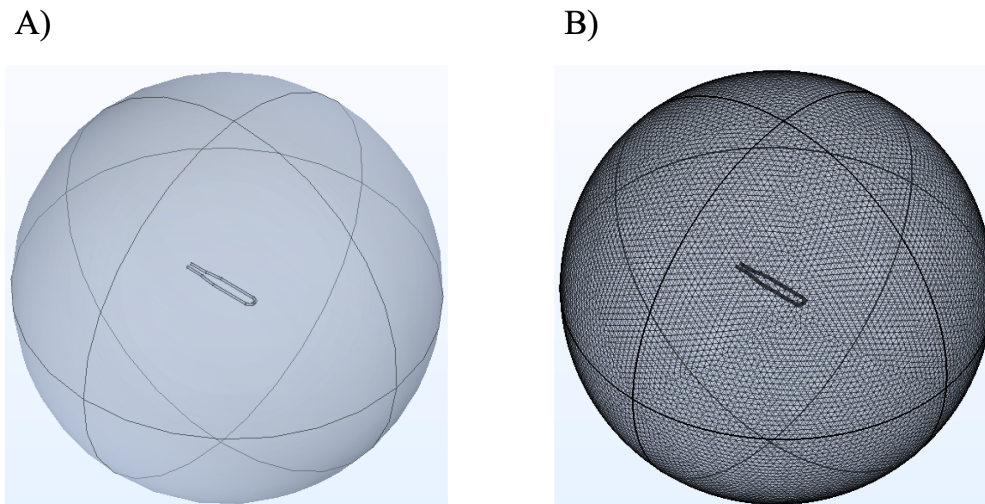


Figure 3.7. (A) Vue 3D de la boucle implantable de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 700 μm placée au centre de la sphère d'air ayant un diamètre de 1 cm. (B) Vue du maillage « fin » 3D tétraédrique utilisé pour la simulation électromagnétique.

Pour rendre les boucles implantables des micro-antennes RMN résonantes, il a également

fallu intégrer des composants électroniques tels que les condensateurs de pré-accord, de pré-adaptation, d'accord et d'adaptation afin de modéliser le circuit électronique décrit dans le **paragraphe 3.2.3**.

Pour cela, le logiciel COMSOL Multiphysics[®] disposait de différentes entités appelées port réduit (ou *lumped port*, en anglais) et élément réduit (ou *lumped element*, en anglais).

Un port réduit a été défini comme une entité permettant d'appliquer une tension ou un courant à un modèle ou pour connecter ce dernier à un circuit électronique. Un port réduit peut être appliqué uniquement entre deux frontières métalliques et considérées comme des conducteurs électriques parfaits par l'application de la condition physique PEC.

Un élément réduit a, quant à lui, été défini comme une entité permettant d'imiter l'insertion d'un composant électronique tel qu'un condensateur, une bobine ou une résistance. Tout comme le port réduit, il ne peut être placé qu'entre deux frontières métalliques et considérées comme des conducteurs électriques parfaits.

Pour nos simulations RF, le circuit électronique des micro-antennes RMN implantables, décrit dans le **paragraphe 3.2.2**, a alors été modélisé par l'utilisation d'un port réduit et de quatre éléments réduits.

Le port réduit a été utilisé pour fournir une tension entre les deux extrémités des boucles implantables des micro-antennes RMN. Une impédance de 50Ω a été attribuée à ce port afin d'être en adéquation avec l'impédance du câble coaxial utilisé pour connecter l'antenne de détection RF, ici la micro-antenne RMN implantable, au spectromètre.

Les quatre condensateurs du circuit électronique des micro-antennes RMN implantables, le condensateur de pré-accord, le condensateur de pré-adaptation, le condensateur d'accord et le condensateur d'adaptation, ont été modélisés par les quatre éléments réduits.

Une valeur de 10 pF a été attribuée à l'élément réduit modélisant le condensateur de pré-accord et à celui modélisant le condensateur de pré-adaptation .

Pour obtenir une fréquence de résonance égale à 298 MHz , les deux autres éléments réduits modélisant le condensateur d'accord et le condensateur d'adaptation ont été accordés en utilisant un balayage paramétrique pour des valeurs comprises entre 2 et 18 pF .

La **figure 3.8** illustre le circuit électronique modélisé de la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de $450 \mu\text{m}$. Les quatre éléments réduits, représentés en vert, modélisent, en 1), le condensateur de pré-accord, en 2), le condensateur de pré-adaptation, en 3), le condensateur d'accord et en 4), le condensateur d'adaptation. Le port réduit est représenté en rouge et les frontières métalliques et considérées comme des conducteurs électriques parfaits, en marron.

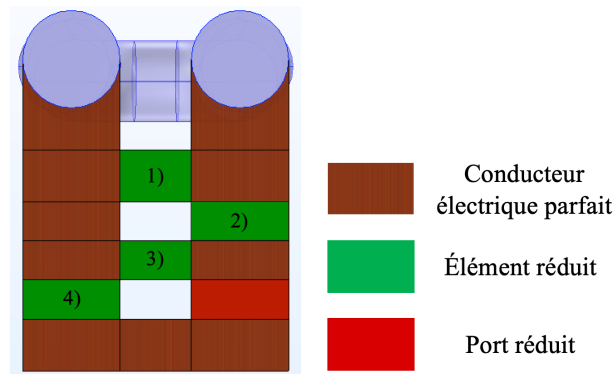


Figure 3.8. Circuit électronique modélisé de la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de $450\ \mu\text{m}$. L'élément réduit 1) représente le condensateur de pré-accord, le 2), le condensateur de pré-adaptation, le 3), le condensateur d'accord, et le 4), le condensateur d'adaptation.

3.3.4 Résultats des simulations électromagnétiques

Les résultats des simulations électromagnétiques des deux prototypes du modèle de la micro-antenne « loop » ont été affichés sous plusieurs formes afin de pouvoir les comparer avec les images IRM acquises avec les micro-antennes RMN implantables lors des expériences *in vitro* présentées plus loin dans ce chapitre.

3.3.4.1 Micro-antenne « loop » ayant une largeur de $450\ \mu\text{m}$

La **figure 3.9** présente le champ magnétique \vec{B}_1 généré par la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de $450\ \mu\text{m}$.

Les flèches rouges, illustrant la direction de \vec{B}_1 , sont proportionnelles à l'amplitude de ce dernier.

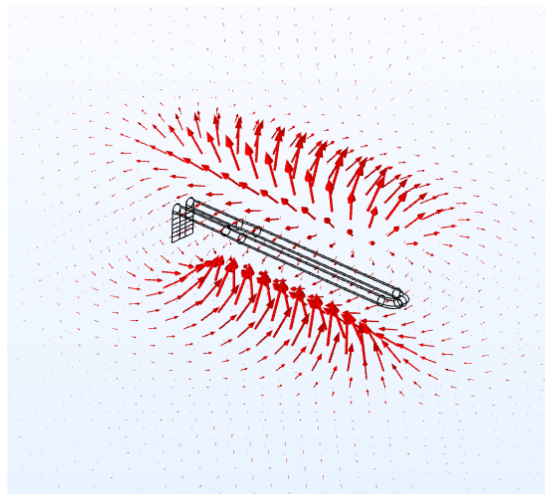


Figure 3.9. Champ magnétique \vec{B}_1 généré par la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de $450\ \mu\text{m}$. Les flèches rouges sont proportionnelles à l'amplitude de \vec{B}_1 .

La figure suivante illustre également le champ magnétique \vec{B}_1 généré dans les trois plans de la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de $450\ \mu\text{m}$. Notons que le plan (xOy) correspondait à une vue de face de la boucle résonante, le plan (yOz), à une vue de profil et le plan (xOz), à une vue d'en dessous.

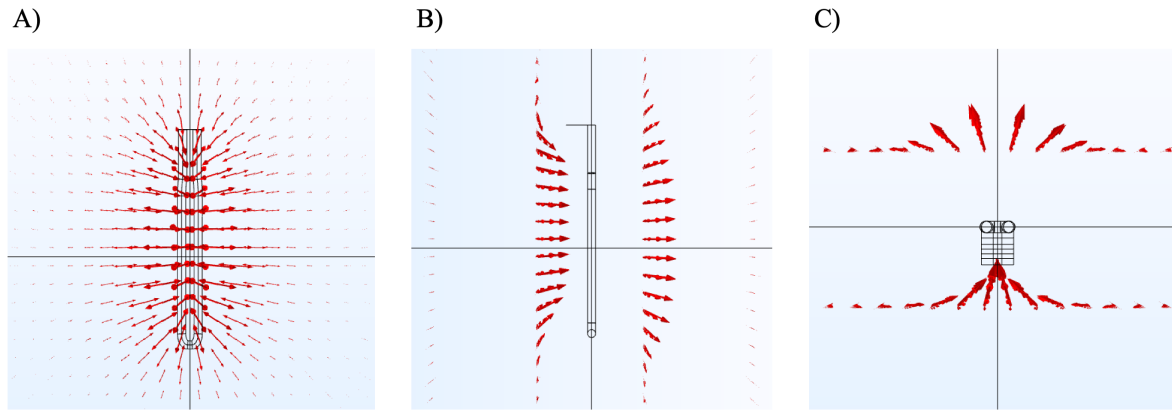


Figure 3.10. Champ magnétique \vec{B}_1 généré dans les trois plans de la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de $450\ \mu\text{m}$. (A) Plan (xOy). (B) Plan (yOz). (C) Plan (xOz).

La circulation d'un courant électrique dans la boucle résonante de la micro-antenne RMN implantable a ainsi classiquement entraîné la génération d'un champ magnétique proportionnel à ce courant et induit selon l'axe perpendiculaire au plan de la boucle résonante.

De plus, afin de visualiser et d'estimer le volume de détection de la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de $450\ \mu\text{m}$, nous avons pu afficher, par le logiciel COMSOL Multiphysics®, un rendu surfacique et un rendu volumique de l'amplitude de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 généré dans les trois plans de l'espace de la boucle résonante.

La **figure 3.11** et la **figure 3.12** présentent, respectivement, le rendu surfacique (surface 2D) et le rendu volumique (isosurface 3D) de l'amplitude de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 généré dans les trois plans de l'espace.

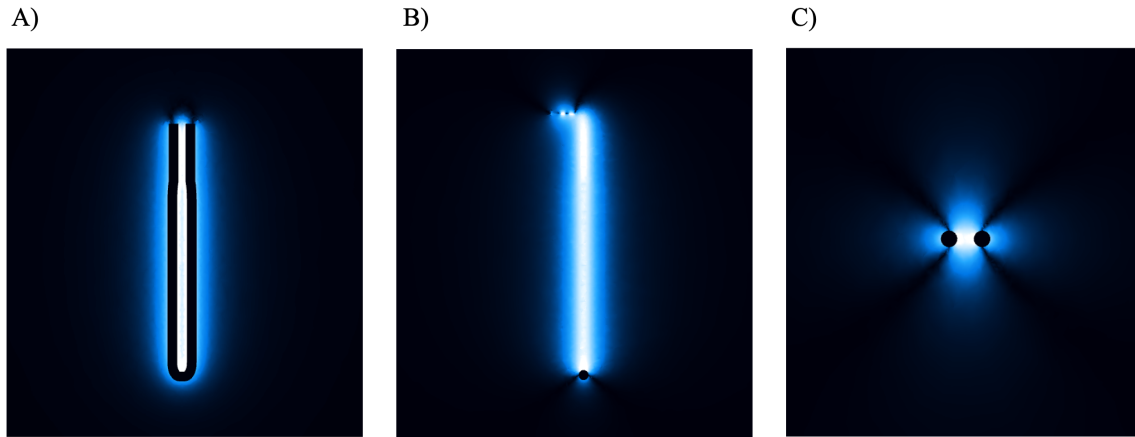


Figure 3.11. Rendu surfacique (surface 2D) de l'amplitude de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 généré. (A) Plan (xOy). (B) Plan (yOz). (C) Plan (xOz).

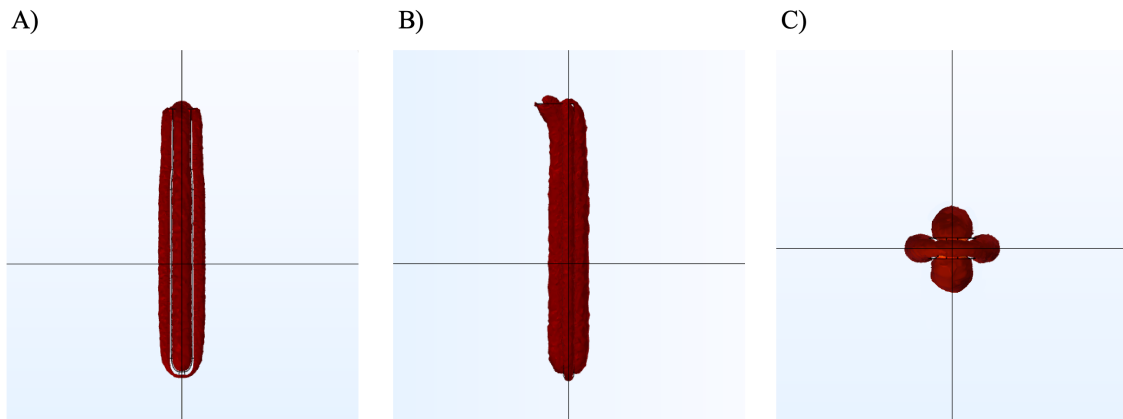


Figure 3.12. Rendu volumique (isosurface 3D) de l'amplitude de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 généré. (A) Plan (xOy). (B) Plan (yOz). (C) Plan (xOz).

Les deux précédentes figures obtenues par les simulations RF effectuées avec le logiciel COMSOL Multiphysics[®] ont ainsi permis de constater la présence de deux zones de détection distinctes séparées l'une de l'autre par le fil de cuivre constitutif de la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm .

Nous avons, en effet, observé une première zone de détection s'étendant de part et d'autre du plan (xOy) contenant la boucle résonante. En raison de l'implantation dans un tissu d'intérêt ou de l'immersion dans une solution d'intérêt de cette dernière, cette zone correspond alors au double de la zone de détection habituellement obtenue avec une antenne surfacique extracorporelle.

Une deuxième zone de détection, orthogonale à la première et s'étendant de part et d'autre du plan (yOz) et correspondant à la fermeture des lignes du champ magnétique \vec{B}_1 selon la loi de Gauss, a été aussi visible. Cette deuxième zone de détection, plus petite que celle décrite précédemment, n'est généralement pas prise en compte lors de l'utilisation d'une antenne surfacique extracorporelle.

Afin d'estimer le volume de détection de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm , nous avons effectué une approximation de la forme géométrique de ce dernier caractérisé par l'isosurface 3D de l'amplitude de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 généré.

Comme l'illustre la figure suivante, nous avons choisi de diviser le volume de détection en trois formes géométriques, deux cylindres droits et un cylindre elliptique, dont les expressions des volumes étaient connus et donc facilement calculables.

De plus, le volume occupé par le fil de cuivre constitutif de la boucle résonante de la micro-antenne « loop » et estimé par le volume d'un cylindre droit a été soustrait du volume total occupé par les trois formes géométriques décrites précédemment.

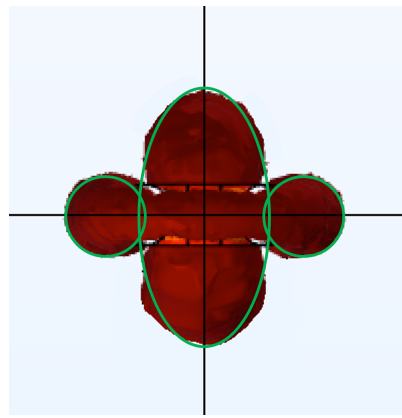


Figure 3.13. Division géométrique et estimation du volume de détection de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm .

Le volume des cylindres droits a été calculé par la formule suivante :

$$V_{\text{cylindre droit}} = \pi r^2 h \quad (27)$$

avec r , le rayon du cercle de la base et h , la hauteur du cylindre.

Le volume du cylindre elliptique a été calculé par la formule suivante :

$$V_{\text{cylindre elliptique}} = \pi abh \quad (28)$$

avec a , le demi-grand axe de l'ellipse de la base, b , le demi-petit axe de l'ellipse de la base et h , la hauteur du cylindre.

Pour la détermination de mdu demi-grand axe de la base du cylindre elliptique et la distance du rayon du cercle de la base du cylindre droit, un seuil de 30% de la valeur maximale du champ magnétique \vec{B}_1 transversal caractérisé par l'isosurface 3D et correspondant à environ 50% du signal RMN (dans le cas d'une antenne surfacique) a été fixé. Pour cela, la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 a été tracée selon deux axes présentés

dans la figure suivante et traversant les deux zones de détection précédemment décrites ci-dessus.

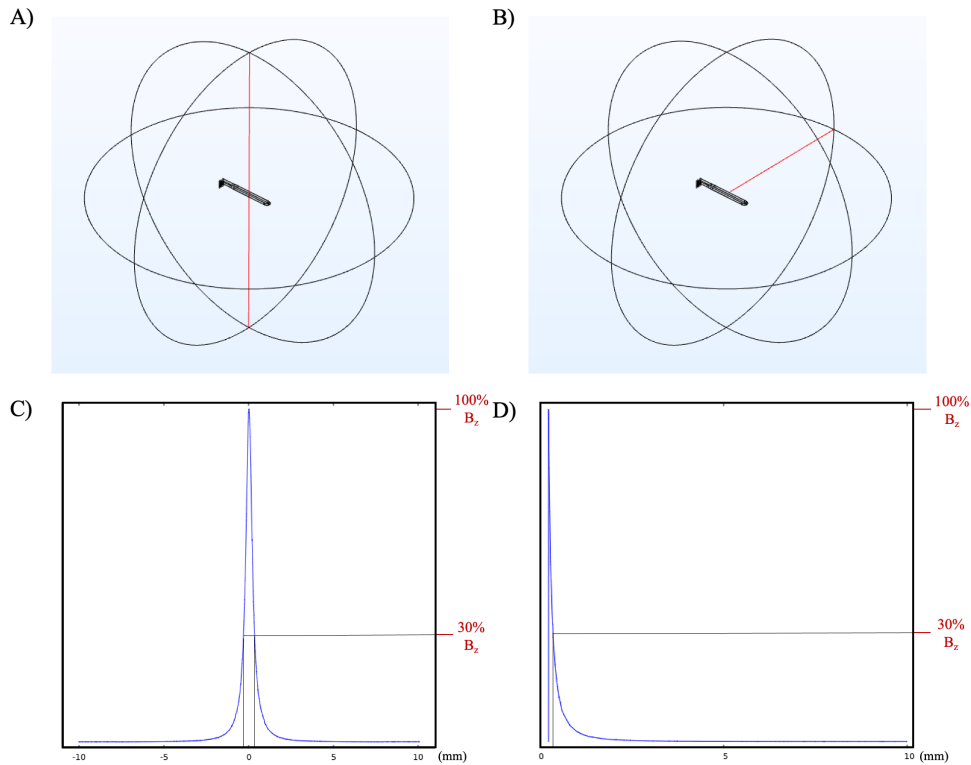


Figure 3.14. (A) Axe passant par la zone de détection s'étendant de part et d'autre du plan (xOy). (B) Axe passant par la zone de détection s'étendant de part et d'autre du plan (yOz). (C) Norme de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 selon l'axe A. (D) Norme de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 selon l'axe B.

Nous avons alors mesuré $r = 0.098$ mm et $a = 0.314$ mm. La valeur de la distance du demi-petit axe de la base du cylindre elliptique a été mesurée par le logiciel COMSOL Multiphysics[®] et valait $b = 0.159$ mm. De plus, la hauteur h correspondait à la longueur de la boucle résonante, soit $h = 3$ mm.

Ainsi, pour la micro-antenne « loop » ayant une largeur de $450 \mu\text{m}$, nous avons calculé un volume de détection de $0.546 \mu\text{L} \approx 550 \text{nL}$.

3.3.4.2 Micro-antenne « loop » ayant une largeur de $700 \mu\text{m}$

Les résultats des simulations RF de la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de $700 \mu\text{m}$ ont été exposés en suivant la même trame que celle utilisée pour la présentation des résultats de la boucle résonante ayant une largeur de $450 \mu\text{m}$.

La **figure 3.15** présente le champ magnétique \vec{B}_1 généré par la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de $700 \mu\text{m}$. Les flèches rouges, illustrant la direction de \vec{B}_1 , sont proportionnelles à l'amplitude de ce dernier.

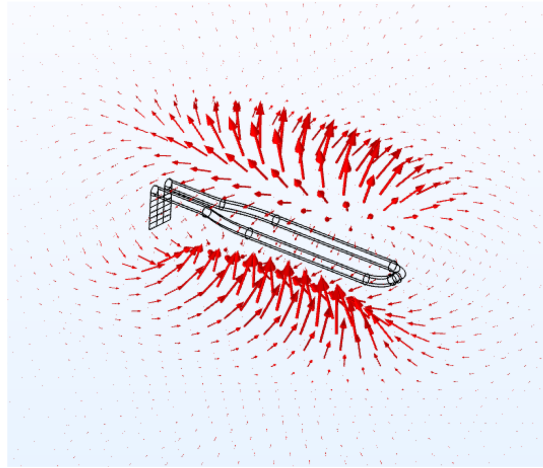


Figure 3.15. Champ magnétique \vec{B}_1 généré par la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de $700 \mu\text{m}$. Les flèches rouges sont proportionnelles à l'amplitude de \vec{B}_1 .

La figure suivante illustre également le champ magnétique \vec{B}_1 généré dans les trois plans de la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de $700 \mu\text{m}$.

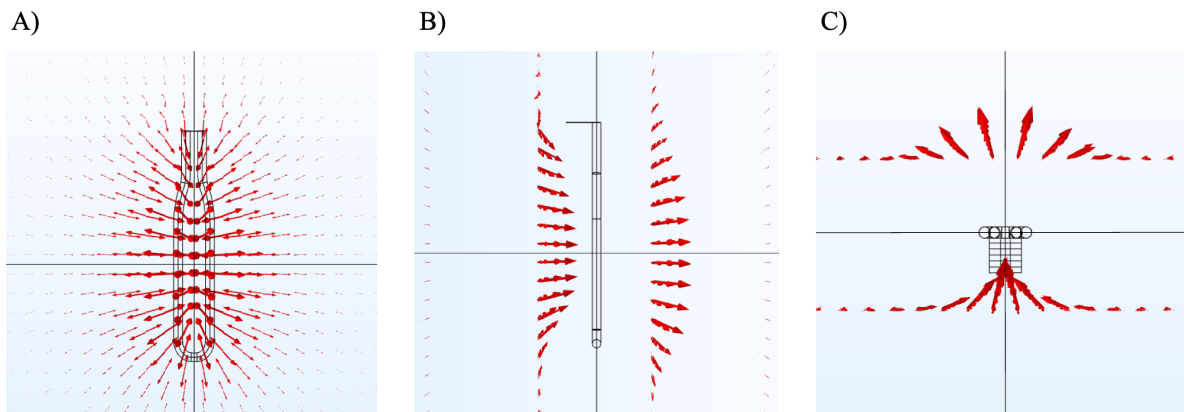


Figure 3.16. Champ magnétique \vec{B}_1 généré dans les trois plans de la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de $700 \mu\text{m}$. (A) Plan (xOy). (B) Plan (yOz). (C) Plan (xOz).

Nous avons pu voir que la distribution du champ magnétique \vec{B}_1 généré par la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de $700 \mu\text{m}$ était quasiment identique à la distribution du champ magnétique généré par la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de $450 \mu\text{m}$.

La **figure 3.17** et la **figure 3.18** présentent, respectivement, le rendu surfacique (surface 2D) et le rendu volumique (isosurface 3D) de l'amplitude de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 généré dans les trois plans de l'espace.

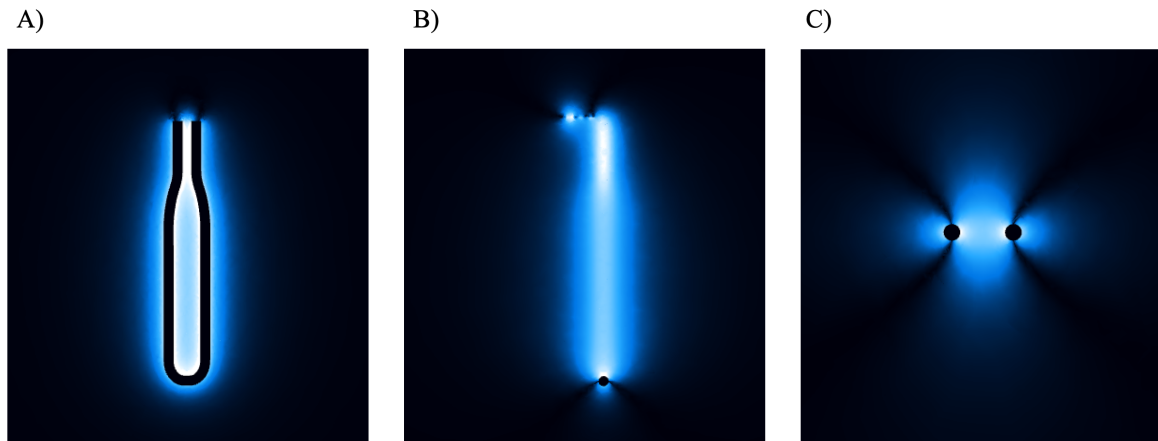


Figure 3.17. Rendu surfacique (surface 2D) de l'amplitude de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 généré. (A) Plan (xOy). (B) Plan (yOz). (C) Plan (xOz).

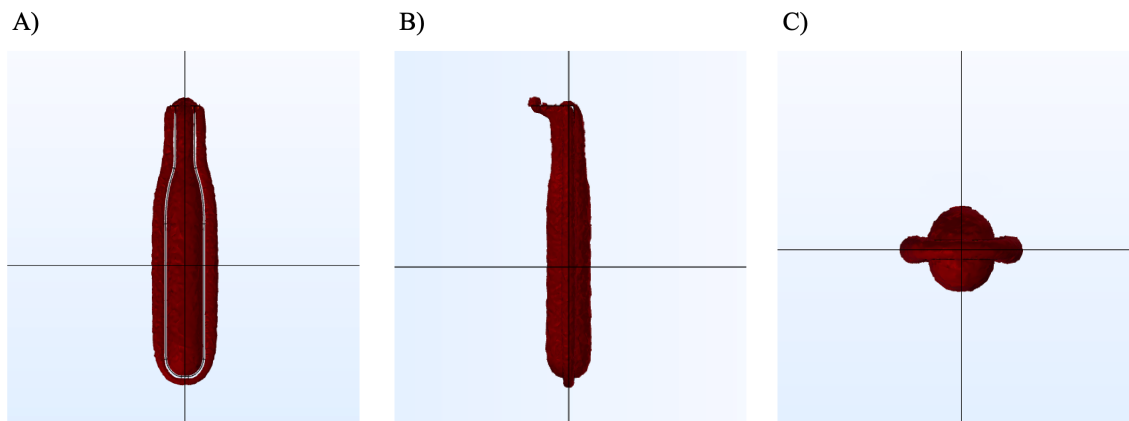


Figure 3.18. Rendu volumique (isosurface 3D) de l'amplitude de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 généré. (A) Plan (xOy). (B) Plan (yOz). (C) Plan (xOz).

Nous avons observé, tout comme pour la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de $450 \mu\text{m}$, la présence de deux zones de détection séparées par le fil de suivre.

Afin d'estimer le volume de détection de la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de $700 \mu\text{m}$, nous avons aussi divisé ce dernier en trois formes géométriques.

La **figure 3.19** illustre l'approximation géométrique du volume de détection réalisée par l'utilisation de deux cylindres droits et d'un cylindre elliptique.

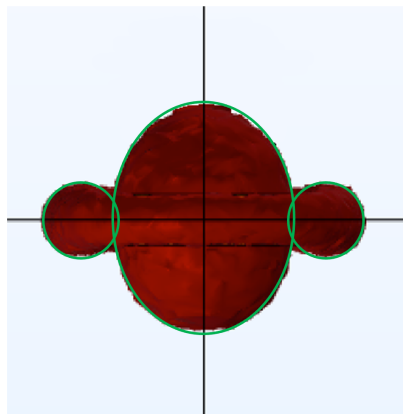


Figure 3.19. Division géométrique et estimation du volume de détection de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 700 μm .

Comme pour la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm , la figure suivante présente la norme de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 tracée selon les deux axes traversant les deux zones de détection et le seuil arbitraire de 30% a été utilisé pour déterminer les distances des demi-axes des cylindres utilisés pour l'approximation géométrique.

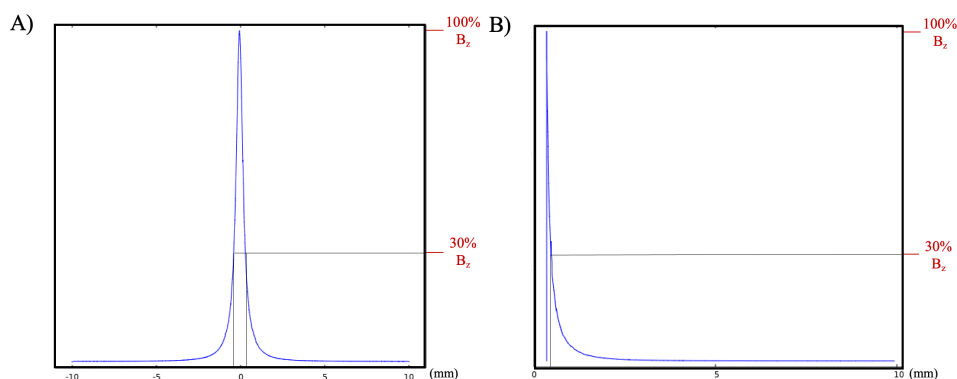


Figure 3.20. (A) Norme de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 selon l'axe passant par la zone de détection s'étendant de part et d'autre du plan (xOz). (B) Norme de la composante transversale du champ magnétique \vec{B}_1 selon l'axe passant par la zone de détection s'étendant de part et d'autre du plan (yOz).

Nous avons alors mesuré, pour les 3 distances intervenant dans les **équations 27** et **28**, expressions mathématiques permettant de calculer les volumes d'un cylindre droit et d'un cylindre elliptique, $r = 0.113$ mm, $a = 0.339$ mm et $b = 0.270$ mm. En soustrayant le volume occupé par le fil de cuivre constitutif de la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 700 μm et une longueur de 3 mm, nous avons calculé un volume de détection de **0.997 $\mu\text{L} \approx 1$ μL** .

3.4 Caractérisations électromagnétiques...

3.4.1 ... par un analyseur de réseau vectoriel

La conception et la construction d'antennes RF sont communément réalisées à l'aide d'un analyseur de réseau vectoriel (VNA, pour *Vector Network Analyzer*, en anglais).

Un VNA est un système qui permet de caractériser les performances de différents dispositifs RF tels que les micro-antennes RMN implantables développées dans ces travaux de thèse. Le fonctionnement de base d'un analyseur de réseau est de transmettre un signal au dispositif RF à tester, puis de mesurer les ondes réfléchies et transmises sur chacun des ports constitutifs du VNA.

Nous avons pu, par exemple, facilement mesurer les facteurs de qualité à vide et en charge, définis dans le **paragraphe 2.2.1.3**, de chaque micro-antenne RMN implantable en la connectant directement à un port unique de l'analyseur de réseau vectoriel en tenant compte du circuit d'accord et d'adaptation. L'échantillon utilisé pour la mesure du facteur de qualité en charge était une solution de LCR artificiel. Les facteurs de qualité ont ensuite pu être évalués par le profil du coefficient de réflexion de chaque micro-antenne RMN implantable et communément appelé S_{11} .

Les **figures 3.21** et **3.22** présentent, respectivement, en présence de l'échantillon, le profil du coefficient de réflexion S_{11} de la micro-antenne RMN implantable ayant une largeur de 450 μm et immergée dans une solution de LCR artificiel et celui de la micro-antenne RMN implantable ayant une largeur de 700 μm et immergée dans une solution de LCR artificiel.

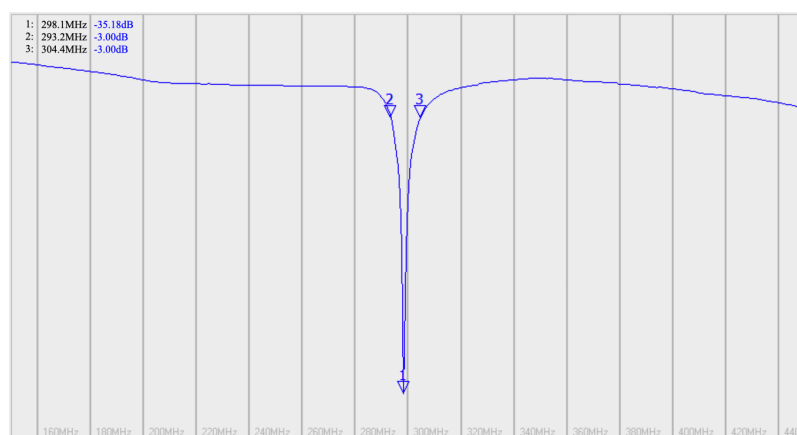


Figure 3.21. Profil du coefficient de réflexion S_{11} de la micro-antenne RMN implantable ayant une largeur de 450 μm et immergée dans une solution de LCR artificiel.

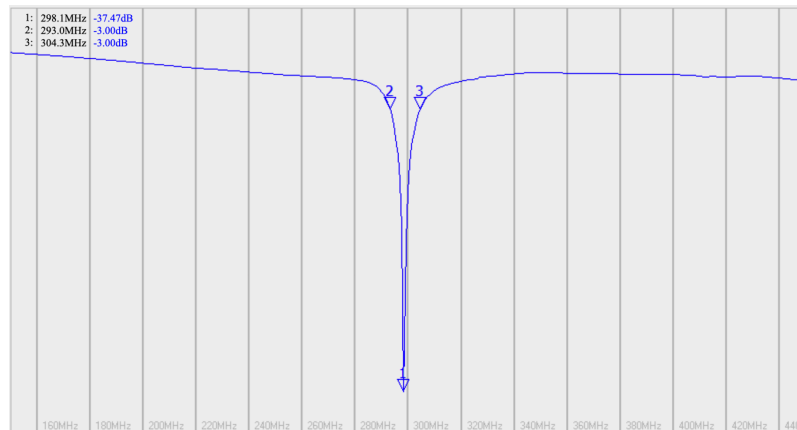


Figure 3.22. Profil du coefficient de réflexion S11 de la micro-antenne RMN implantable ayant une largeur de 700 μm et immergée dans une solution de LCR artificiel.

En utilisant cette méthode très simple pour la mesure du facteur de qualité Q , ce dernier a pu être déterminé par la relation suivante [Kajfez & Hwan (1984)] :

$$Q = (1 + k) \frac{f_0}{\Delta f} \quad (29)$$

avec f_0 , la fréquence de résonance, Δf , la bande passante à -3 dB de la micro-antenne RMN implantable et k , le coefficient de couplage représentant le rapport entre la puissance dissipée dans le circuit externe (ici, l'analyseur de réseau vectoriel) et la puissance dissipée dans la micro-antenne RMN implantable.

Comme la micro-antenne RMN implantable a été accordée à la fréquence de résonance et adaptée en puissance (50 Ω), la puissance dissipée dans l'analyseur de réseau vectoriel et celle dans la micro-antenne RMN implantable étaient égales. Dans ce cas, le coefficient de couplage était égal à 1.

Ainsi, pour la micro-antenne RMN implantable ayant une largeur de 450 μm , nous avons mesuré un facteur de qualité en charge de 53.2, et pour la micro-antenne RMN implantable ayant une largeur de 700 μm , un facteur de qualité en charge de 52.8.

De la même manière, les facteurs de qualité à vide ont été évalués et nous avons alors mesuré, pour la micro-antenne RMN implantable ayant une largeur de 450 μm , un facteur de qualité à vide de 56.7, et pour la micro-antenne RMN implantable ayant une largeur de 700 μm , un facteur de qualité à vide de 54.8.

Nous avons, par la suite, pu évaluer les pertes induites par l'échantillon dans les deux micro-antennes RMN implantables par la formule suivante :

$$\text{Pertes induites par l'échantillon} = 1 - \frac{Q_{\text{encharge}}}{Q_{\text{à vide}}} \quad (30)$$

Les pertes induites par l'échantillon dans la micro-antenne RMN implantable ayant une largeur de 450 μm étaient alors d'environ 6.1% et celles induites par l'échantillon dans la micro-antenne RMN implantable ayant une largeur de 700 μm , de 3.6%.

3.4.2 ... par des expériences *in vitro*

3.4.2.1 Estimations des volumes de détection par IRM

Afin de vérifier la bonne conformité des volumes de détection estimés par les simulations électromagnétiques précédemment décrites, nous avons souhaité étudier ces derniers par l'acquisition d'images IRM effectuée avec les micro-antennes RMN implantables.

Pour cela, les deux prototypes de la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ont été immergés dans une solution de LCR artificiel (NaCl : 147 mM, KCl : 2.7 mM, CaCl₂ : 1.2 mM, MgSO₄ : 0.85 mM) [McNay & Sherwin (2004)].

Les images IRM ont été acquises avec les micro-antennes RMN implantables utilisées uniquement en réception RF à un champ magnétique statique de 7 T et avec une séquence ZTE (pour *Zero Time Echo*, en anglais) ayant permis d'acquérir des volumes 3D isotropes avec un temps d'acquisition relativement rapide. L'émission RF a été effectuée avec une antenne volumique en quadrature possédant un diamètre intérieur de 86 mm afin d'obtenir une excitation homogène sur l'ensemble du volume étudié.

Les paramètres de la séquence ZTE étaient alors : TR = 2.5 ms, un FOV de 9 × 9 mm² et une matrice de 128 × 128 pixels donnant une résolution isotrope de 70 μm. La durée de l'acquisition était de 2 min 09 s.

Les rendus volumiques des images IRM ZTE 3D acquises avec les micro-antennes RMN implantables ont ensuite permis de visualiser les volumes de détection de ces dernières afin de les comparer avec ceux obtenus par les simulations RF.

Micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm

La **figure 3.23** et la **figure 3.24** présentent, respectivement, les images IRM ZTE et les rendus volumiques de la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm.

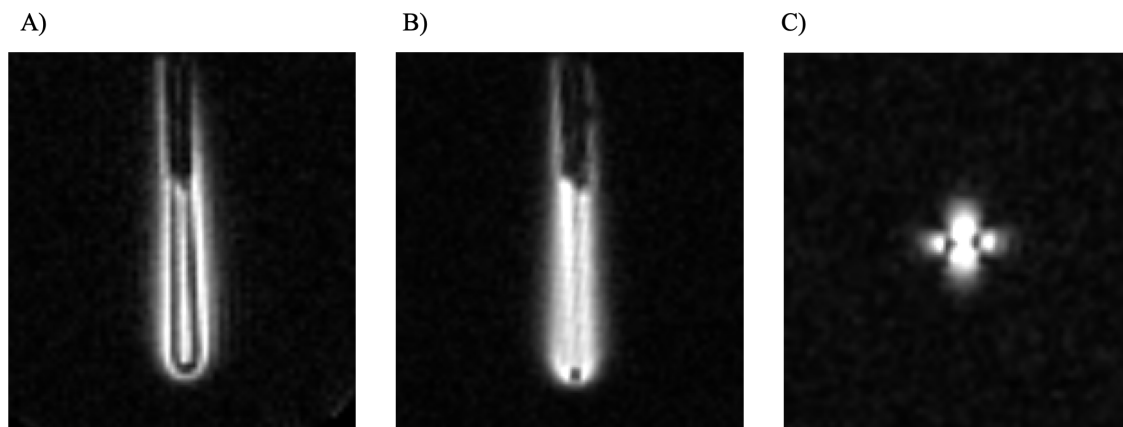


Figure 3.23. Coupes sagittale (A), axiale (B) et coronale (C) des images IRM ZTE acquises avec la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm.

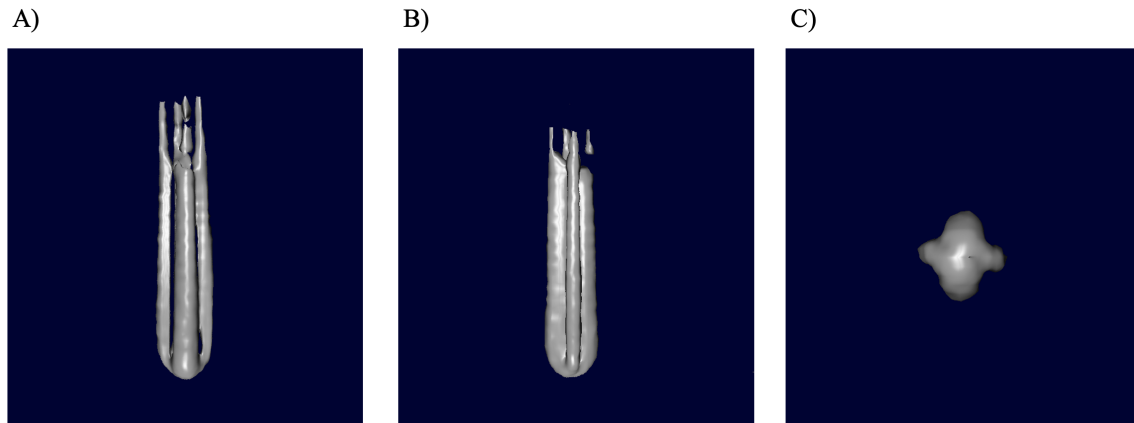


Figure 3.24. Rendus volumiques sagittal (A), axial (B) et coronal (C) des images IRM ZTE acquises avec la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm .

Nous avons alors pu constater que la distribution du volume de détection observé sur les images IRM ZTE acquises par la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm était en accord avec celle obtenue par les simulations électromagnétiques et visible sur les [figures 3.11](#) et [3.12](#).

Pour estimer les volumes de détection par les images IRM acquises avec les différentes micro-antennes RMN implantables, nous avons étudié et évalué la distribution de l'intensité du signal sur les images IRM ZTE acquises avec ces dernières.

Pour le volume de détection de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm , nous avons utilisé la coupe coronale de l'image IRM ZTE présentée à la [figure 3.23](#).

De la même manière que pour l'estimation du volume de détection obtenu lors des simulations RF, nous avons choisi d'utiliser deux cylindres droits et un cylindre elliptique pour approcher la géométrie de la distribution de l'intensité du signal. Pour la définition des distances des différents demi-axes des cylindres, nous avons opté pour un seuil limite de 70% de l'intensité maximale du signal [[Baxan et al. \(2008\)](#)].

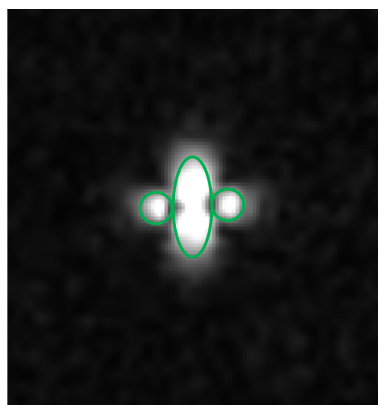


Figure 3.25. Division géométrique et estimation du volume de détection par l'image IRM ZTE acquise avec la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm .

Nous avons mesuré, pour les 3 distances représentant les deux demi-axes de la base du cylindre elliptique et le rayon de la base du cylindre droit et intervenant dans les **équations 27** et **28**, $r = 0.101$ mm, $a = 0.333$ mm et $b = 0.156$ mm. Nous avons alors calculé un volume de détection de 0.576 $\mu\text{L} = 576$ nL. Cette valeur était alors en accord avec celle estimée par les simulations RF (≈ 550 nL).

Micro-antenne « loop » ayant une largeur de 700 μm

La **figure 3.26** et la **figure 3.27** présentent, respectivement, les images IRM ZTE et les rendus volumiques de la boucle résonante de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 700 μm .

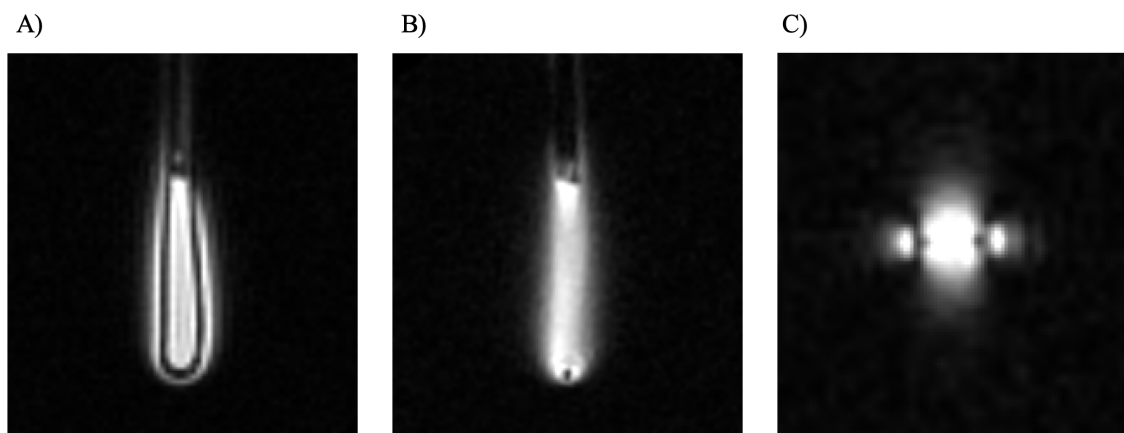


Figure 3.26. Coupes sagittale (A), axiale (B) et coronale (C) des images IRM ZTE acquises avec la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 700 μm .

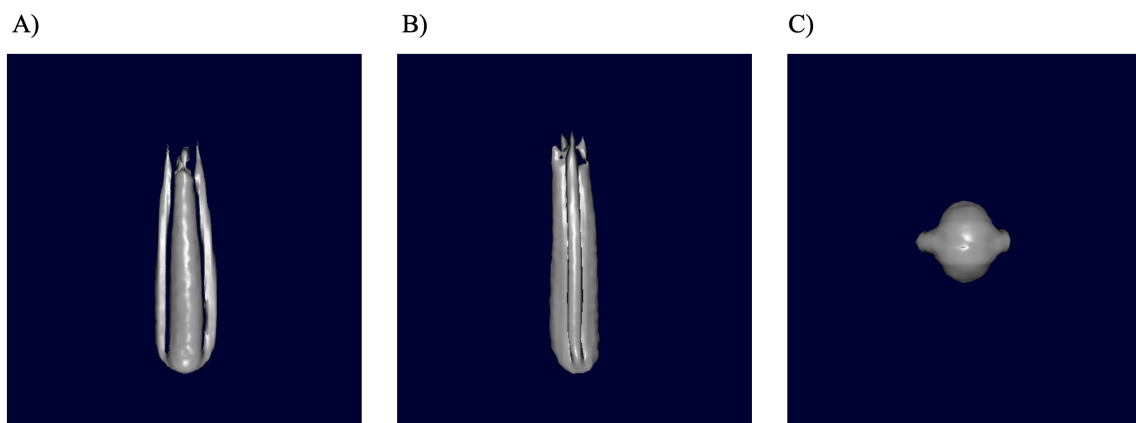


Figure 3.27. Rendus volumiques sagittal (A), axial (B) et coronal (C) des images IRM ZTE acquises avec la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 700 μm .

Le volume de détection observable sur les images IRM ZTE acquises par la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 700 μm était similaire à celui obtenu par les simulations RF et présenté sur les **figures 3.17** et **3.18**.

Comme précédemment, le volume de détection a été estimé par la distribution de l'intensité du signal sur les images IRM ZTE acquises avec la micro-antenne RMN implantable. Nous avons utilisé la coupe coronale de l'image IRM ZTE présentée à la **figure 3.26**.

De la même manière que pour l'estimation du volume de détection obtenu lors des simulations RF, nous avons choisi d'utiliser deux cylindres droits et un cylindre elliptique pour approcher la géométrie de la distribution de l'intensité du signal et en utilisant le seuil limite de 70% de l'intensité maximale du signal.

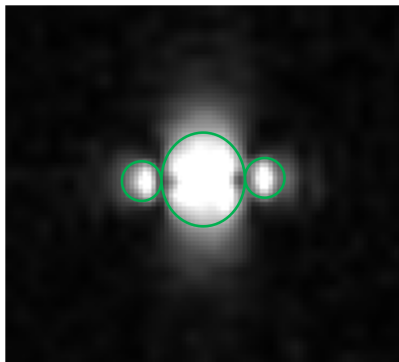


Figure 3.28. Division géométrique et estimation du volume de détection par l'image IRM ZTE acquise avec la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 700 μm .

Nous avons mesuré, pour les 3 distances représentant les deux demi-axes de la base du cylindre elliptique et le rayon de la base du cylindre droit et intervenant dans les **équations 27** et **28**, $r = 0.115$ mm, $a = 0.349$ mm et $b = 0.286$ mm. Nous avons alors calculé un volume de détection de 1.084 μL . Cette valeur était elle aussi en accord avec celle estimée par les simulations RF (≈ 1 μL).

3.4.2.2 Comparaisons entre les micro-antennes RMN implantables et une antenne conventionnelle externe

Afin de mettre en avant le bénéfice apporté par l'utilisation des micro-antennes RMN implantables développées dans ce projet de thèse, nous avons choisi de comparer les performances de ces dernières à celle d'une antenne surfacique Bruker en réseau phasé (ou *phased array*, en anglais) 2×2 éléments conçue pour l'IRM et la SRM du cerveau de rat et couramment utilisée lors d'expériences *in vivo* chez le petit animal.

Ces antennes ont été utilisées uniquement en réception RF et l'émission RF a été réalisée avec l'antenne volumique Bruker.

Les mesures spectroscopiques *in vitro* ont été effectuées à l'aide d'une solution composée de LCR artificiel et de 7 métabolites cérébraux - choline (Cho), créatine (Cr), glutamate (Glu), lactate (Lac), myo-inositol (mI), N-acétylaspartate (NAA) et taurine (Tau) - à une concentration de 25 mM.

Ces expériences *in vitro* ont été réalisées à un champ magnétique statique de 7 T et les

spectres RMN ^1H ont été acquis avec une séquence de spectroscopie mono-voxel PRESS (cf. **paragraphe 2.1.3.2**) et avec les paramètres suivants : TR/TE = 2000/15.266 ms, taille du voxel = $2 \times 4 \times 2 \text{ mm}^3$, suppression de l'eau = VAPOR, nombre d'accumulations = 256, durée de l'acquisition = 8 min 32 s.

L'utilisation de cette séquence, que ce soit pour les expériences *in vitro* et les expériences *in vivo* (cf. **chapitres 4** et **5**), a permis de réduire le volume d'excitation à un voxel centré autour de la boucle de détection de la micro-antenne RMN implantable évitant ainsi l'acquisition éventuelle de signaux RMN indésirables provenant de régions situées entre la boucle de détection et les composants du circuit électronique.

Pour les acquisitions effectuées avec l'antenne surfacique conventionnelle extracorporelle, le voxel a été positionné à une profondeur de 3 mm pour simuler les conditions expérimentales *in vivo*. Dans ce cas, il correspondait alors à la fois au volume d'excitation et au volume de détection.

Pour les acquisitions effectuées avec la micro-antenne RMN implantable, le voxel a été centré sur cette dernière qui a été préalablement immergée dans la solution de LCR artificiel et des métabolites cérébraux. Dans ce cas, il correspondait uniquement au volume d'excitation RF, le volume de détection étant donné par la zone de sensibilité de la micro-antenne RMN implantable (soit de 550 nL, soit de 1 μL selon le type de micro-antenne « loop » utilisé).

Les performances des micro-antennes RMN implantables et de l'antenne surfacique conventionnelle extracorporelle ont été analysées en utilisant différentes notions et concepts dont celui de la limite de détection (LOD, pour *Limit Of Detection* ou LLD, pour *Lower Limit of Detection*, en anglais).

La notion de LOD a été définie par l'IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*, en anglais) et détermine le seuil minimal qu'une antenne réceptrice est capable de détecter pour une concentration ou une masse donnée de la molécule étudiée [McNaught & Wilkinson (1997)]. Cette notion a depuis été couramment utilisée pour diverses études générales d'analyses chimiques telles que la spectroscopie par RMN.

La limite de détection en fonction de la concentration, notée LOD_c , est donnée par la relation suivante [Currie (1999)] :

$$\text{LOD}_c = \frac{3.C}{RSB} \quad (31)$$

avec C, la concentration de l'échantillon (en mM).

De la même manière, la limite de détection en fonction de la masse, notée LOD_m , a pu être définie et est exprimée par :

$$\text{LOD}_m = \frac{3.mol}{RSB} \quad (32)$$

avec mol, le nombre de moles observées dans le volume de détection des antennes RF

(en μmol).

La littérature rapporte que le facteur 3 a été déterminé par la réalisation d'expériences en présence ou en l'absence de l'échantillon d'intérêt (mesures « à blanc ») et ce dernier a été défini comme correspondant à un risque de 0.13% de conclure à la présence de la substance recherchée alors qu'elle était absente de l'échantillon [Currie (1999)].

Ces précédentes équations ont fait également apparaître deux autres figures de mérite que sont la sensibilité par unité de concentration, notée S_c , et la sensibilité par unité de masse, notée S_m et définies par les relations suivantes :

$$S_c = \frac{RSB}{C} \quad (33)$$

$$S_m = \frac{RSB}{mol} \quad (34)$$

avec C , la concentration de l'échantillon (en mM) et mol , le nombre de moles observées dans le volume de détection des antennes RF (en μmol).

Depuis plus d'une vingtaine d'années maintenant, différentes équipes telles que celles de Lacey et d'Olson ont fréquemment utilisé le concept de la limite de détection pour déterminer les performances de leurs micro-antennes solénoïdales [Lacey *et al.* (1999); Olson *et al.* (2004)].

Ils ont, au cours de leurs différents travaux, démontré que le bruit du spectre RMN augmentait comme la valeur quadratique du nombre d'accumulations noté N_{acc} alors que le signal restait quant à lui proportionnel à N_{acc} , ce dernier étant proportionnel au temps d'acquisition noté T_{acq} .

Généralement, l'acquisition de spectres RMN nécessite un certain nombre d'accumulations augmentant alors le temps d'acquisition. Il est donc possible de définir des limites de détection en fonction de la concentration et en fonction de la masse normalisées par rapport à ce dernier.

La limite de détection en fonction de la concentration et normalisée par rapport au temps d'acquisition, notée $nLOD_c$, s'exprime par la relation suivante :

$$nLOD_c = \frac{3.C}{RSB} \cdot \sqrt{T_{acq}} = \frac{3}{S_c} \cdot \sqrt{T_{acq}} \quad (35)$$

avec C , la concentration de l'échantillon (en mM) et T_{acq} , la durée totale de l'acquisition du spectre RMN (en minutes).

La limite de détection en fonction de la masse et normalisée par rapport au temps d'acquisition, notée $nLOD_m$, s'exprime par la relation suivante :

$$nLOD_m = \frac{3.mol}{RSB} \cdot \sqrt{T_{acq}} = \frac{3}{S_m} \cdot \sqrt{T_{acq}} \quad (36)$$

avec mol , la concentration de l'échantillon (en μmol) et T_{acq} , la durée totale de l'ac-

quisition du spectre RMN (en secondes).

Ces limites de détection correspondent ainsi aux seuils minimaux de concentration et de masse normalisés par le temps d'acquisition fournissant un RSB de 3 généralement requis pour la détection RMN [Lacey *et al.* (1999)].

De plus, pour comparer véritablement le gain en sensibilité obtenu par l'utilisation des micro-antennes RMN implantables par rapport à l'utilisation d'antennes conventionnelles externes telles que l'antenne surfacique extracorporelle incluse dans cette étude, une grandeur supplémentaire a été utilisée. Il s'agit du facteur de gain noté FOG (pour *Factor Of Gain*, en anglais).

Le facteur de gain obtenu par l'utilisation de l'antenne 1 par rapport à l'utilisation de l'antenne 2, noté $FOG_{\frac{\text{antenne 1}}{\text{antenne 2}}}$, a alors été défini par l'équation suivante :

$$FOG_{\frac{\text{antenne 1}}{\text{antenne 2}}} = \frac{nLOD_m(\text{antenne 2})}{nLOD_m(\text{antenne 1})} \quad (37)$$

Contrairement aux valeurs de S_c et de $nLOD_c$, les valeurs de S_m et de $nLOD_m$ ont tenu compte du volume de détection des antennes RF incluses dans cette étude. C'est la raison pour laquelle la grandeur $nLOD_m$ a été préférée dans l'expression du FOG.

Les valeurs de S_m , de S_c , de $nLOD_m$, de $nLOD_c$ et de FOG ont été calculées pour les résonances du lactate (à 1.31 ppm), du NAA (à 2.01 ppm), de la choline (à 3.18 ppm) et de la créatine (à 3.03 ppm et à 3.91 ppm).

Les valeurs des RSBs et des FWHMs ont été obtenues à l'aide du logiciel TopSpin (Bruker, Ettlinger, Allemagne). Afin de faciliter le calcul des limites de détection normalisées par rapport au temps d'acquisition, ce dernier a été pris en compte lors du calcul des valeurs des sensibilités.

La reproductibilité des mesures spectroscopiques *in vitro* a également été évaluée en utilisant 2 prototypes de la micro-antenne « loop » ayant un volume de détection de 550 nL et 2 prototypes de la micro-antenne « loop » ayant un volume de détection de 1 μ L pour l'analyse de la même solution. Un spectre de cette solution a été acquis pour chaque prototype de la micro-antenne RMN implantables et 2 spectres ont été acquis par l'antenne surfacique conventionnelle extracorporelle.

Un exemple de spectre RMN ^1H *in vitro* de la solution composée de LCR artificiel et des 7 métabolites cérébraux acquis avec la micro-antenne RMN implantable ayant un volume de détection de 1 μ L est illustré à la **figure 3.29**. Une apodisation lorentzienne de 4 Hz a été effectuée.

Les résonances ont été identifiées en suivant les caractéristiques (déplacement chimique, multiplicité des raies et couplage scalaire) des différents métabolites données dans les travaux de Govindaraju *et al.* (2000).

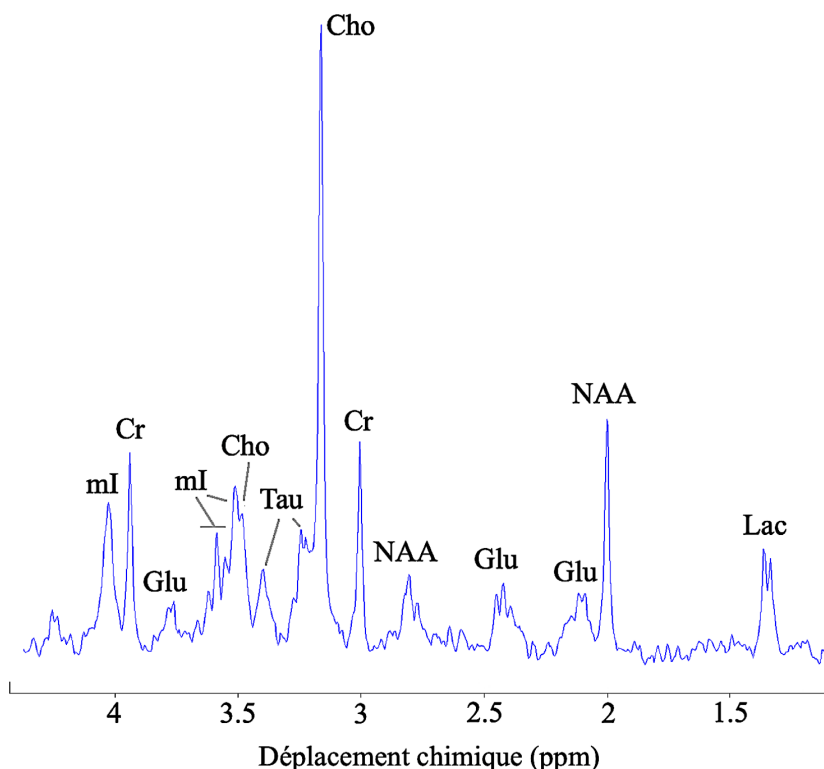


Figure 3.29. Exemple d'un spectre RMN ^1H *in vitro* de la solution composée de LCR artificiel et de 7 métabolites cérébraux (Cho, Cr, Glu, Lac, mI, NAA et Tau) acquis avec la micro-antenne RMN (volume de détection = 1 μL) à un champ magnétique statique de 7 T et avec une séquence PRESS (TR/TE = 2000/15.266 ms, 256 accumulations, durée de l'acquisition = 8 min 32 s).

Les différentes résonances des 7 métabolites présents dans la solution ont pu être facilement discernées par l'absence de chevauchement des résonances avec, de gauche à droite, un triplet non résolu (CH) du myo-inositol (mI) à 4.05 ppm, un singulet (CH_2) de la créatine (Cr) à 3.91 ppm, un doublet de doublets non résolu (CH) du glutamate (Glu) à 3.74 ppm, un triplet (CH) du myo-inositol (mI) à 3.61 ppm, un doublet de doublets non résolu (CH) du myo-inositol (mI) à 3.52 ppm, un multiplet non résolu (CH_2) de la choline (Cho) à 3.50 ppm, un triplet non résolu (CH_2) de la taurine (Tau) à 3.42 ppm, un deuxième triplet non résolu (CH_2) de la taurine (Tau) à 3.24 ppm, un singulet ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$) de la choline (Cho) à 3.18 ppm, un singulet (NCH_3) de la créatine (Cr) à 3.03 ppm, un doublet de doublets non résolu (CH_2) du N-acétylaspartate (NAA) à 2.77 ppm, un multiplet non résolu (CH_2) du glutamate (Glu) à 2.43 ppm, un autre multiplet non résolu (CH_2) du glutamate (Glu) à 2.12 ppm, un singulet (CH_3) du N-acétylaspartate (NAA) à 2.01 ppm et un doublet (CH_3) du lactate (Lac) à 1.31 ppm. Pour cette dernière résonance, la division de ce signal due au couplage scalaire (cf. **paragraphe 2.1.3.1**) avec une constante de couplage J de 6.9 Hz a été aisément identifiable indiquant alors une résolution spectrale inférieure à 6.9 Hz.

La valeur moyenne des FWHMs pour les 4 singulets (Cr à 3.91 ppm, Cho à 3.18 ppm, Cr

à 3.02 ppm et NAA à 2.01 ppm) présents sur le spectre RMN *in vitro* illustré précédemment était d'environ 5 Hz. Cette haute résolution spectrale a mis en évidence l'absence de distorsions du champ magnétique induites par les différences de susceptibilité magnétique entre le cuivre et la solution composée de LCR artificiel et des 7 métabolites cérébraux.

Les tableaux suivants présentent les valeurs moyennes des sensibilités, S_m et S_c , et des limites de détection, $nLOD_m$ et $nLOD_c$ pour les résonances des 4 métabolites cérébraux (Lac, NAA, Cr et Cho) pour la micro-antenne « loop » ayant un volume de détection de 550 nL, pour la micro-antenne « loop » ayant un volume de détection de 1 μ L et pour l'antenne surfacique Bruker ayant un volume de détection égal au volume du voxel d'acquisition de la séquence de spectroscopie PRESS, soit de 16 μ L, respectivement.

Tableau 3.2 – Valeurs moyennes des sensibilités, S_m et S_c , et des limites de détection, $nLOD_m$ et $nLOD_c$, pour la micro-antenne « loop » ayant un volume de détection de **550 nL** pour les résonances du lactate (Lac), du N-acétylaspartate (NAA), de la créatine (Cr) et de la choline (Cho).

	Lac	NAA	Cr	Cho	Cr
	1.31 ppm	2.01 ppm	3.03 ppm	3.18 ppm	3.91 ppm
S_m RSB. $\mu\text{mol}^{-1}.\text{s}^{-\frac{1}{2}}$	30.856	104.620	88.228	256.166	58.818
S_c RSB.mM $^{-1}.\text{min}^{-\frac{1}{2}}$	0.131	0.446	0.376	1.091	0.251
$nLOD_m$ $\mu\text{mol}.\text{s}^{\frac{1}{2}}$	0.097	0.029	0.034	0.012	0.051
$nLOD_c$ mM.min $^{\frac{1}{2}}$	22.901	6.726	7.979	2.750	11.952

Tableau 3.3 – Valeurs moyennes des sensibilités, S_m et S_c , et des limites de détection, $nLOD_m$ et $nLOD_c$, pour la micro-antenne « loop » ayant un volume de détection de **1 μL** pour les résonances du lactate (Lac), du N-acétylaspartate (NAA), de la créatine (Cr) et de la choline (Cho).

	Lac 1.31 ppm	NAA 2.01 ppm	Cr 3.03 ppm	Cho 3.18 ppm	Cr 3.91 ppm
S_m RSB. $\mu\text{mol}^{-1}.\text{s}^{-\frac{1}{2}}$	55.243	239.532	189.858	576.380	116.584
S_c RSB.mM $^{-1}.\text{min}^{-\frac{1}{2}}$	0.428	1.855	1.471	4.465	0.903
$nLOD_m$ $\mu\text{mol}.\text{s}^{\frac{1}{2}}$	0.054	0.013	0.016	0.005	0.026
$nLOD_c$ mM.min $^{\frac{1}{2}}$	7.010	1.617	2.039	0.672	3.322

Tableau 3.4 – Valeurs moyennes des sensibilités, S_m et S_c , et des limites de détection, $nLOD_m$ et $nLOD_c$, pour l'antenne surfacique Bruker ayant un volume de détection de **16 μL** pour les résonances du lactate (Lac), du N-acétylaspartate (NAA), de la créatine (Cr) et de la choline (Cho).

	Lac 1.31 ppm	NAA 2.01 ppm	Cr 3.03 ppm	Cho 3.18 ppm	Cr 3.91 ppm
S_m RSB. $\mu\text{mol}^{-1}.\text{s}^{-\frac{1}{2}}$	0.746	1.403	1.398	3.884	1.729
S_c RSB.mM $^{-1}.\text{min}^{-\frac{1}{2}}$	0.092	0.174	0.173	0.481	0.214
$nLOD_m$ $\mu\text{mol}.\text{s}^{\frac{1}{2}}$	4.021	2.138	2.146	0.772	1.735
$nLOD_c$ mM.min $^{\frac{1}{2}}$	32.609	17.241	17.341	6.237	14.019

L'utilisation des micro-antennes RMN implantables permet alors d'obtenir des sensibilités, S_m et S_c , plus importantes et donc des limites de détection normalisées par rapport au temps d'acquisition, $nLOD_m$ et $nLOD_c$, plus basses que celles obtenues avec l'utilisation de l'antenne surfacique conventionnelle extracorporelle, malgré un volume de détection bien plus petit.

Nous avons aussi pu constater que les valeurs des $nLOD_c$, pour les résonances du NAA,

de Cr et de Cho et pour la micro-antenne « loop » ayant un volume de détection de 550 nL et pour celle ayant un volume de détection de 1 μ L, étaient relativement proches des concentrations *in vivo* chez le petit animal rapportées dans la littérature (NAA : 7.8 - 12 mM, tCho (choline totale) : 0.2 - 2.2 mM et tCr (créatine totale) = 4.2 - 10.2 mM) [De Graaf (1998)]. Cette observation a alors permis de soutenir et de conforter l'utilisation de ces micro-antennes RMN implantables pour l'exploration cérébrale *in vivo* chez le petit animal et sur des régions d'intérêt de faible volume.

A la suite de cela, différents facteurs de gain ont été calculés afin d'évaluer numériquement le profit apporté par l'utilisation des micro-antennes RMN implantables :

- le facteur de gain obtenu par l'utilisation de la micro-antenne « loop » ayant un volume de détection de 550 nL par rapport à l'utilisation de l'antenne surfacique Bruker ayant un volume de détection de 16 μ L noté $\text{FOG}_{\frac{\text{micro-antenne (550 nL)}}{\text{antenne surfacique}}}$;

	Lac	NAA	Cr	Cho	Cr
	1.31 ppm	2.01 ppm	3.03 ppm	3.18 ppm	3.91 ppm
$\text{FOG}_{\frac{\text{micro-antenne (550 nL)}}{\text{antenne surfacique}}}$	41.454	73.724	63.118	64.333	34.020

- le facteur de gain obtenu par l'utilisation de la micro-antenne « loop » ayant un volume de détection de 1 μ L par rapport à l'utilisation de l'antenne surfacique Bruker ayant un volume de détection de 16 μ L noté $\text{FOG}_{\frac{\text{micro-antenne (1 } \mu\text{L)}}{\text{antenne surfacique}}}$;

	Lac	NAA	Cr	Cho	Cr
	1.31 ppm	2.01 ppm	3.03 ppm	3.18 ppm	3.91 ppm
$\text{FOG}_{\frac{\text{micro-antenne (1 } \mu\text{L)}}{\text{antenne surfacique}}}$	74.463	164.462	134.125	154.400	66.731

- le facteur de gain obtenu par l'utilisation de la micro-antenne « loop » ayant un volume de détection de 1 μ L par rapport à l'utilisation de la micro-antenne « loop » ayant un volume de détection de 550 nL noté $\text{FOG}_{\frac{\text{micro-antenne (1 } \mu\text{L)}}{\text{micro-antenne (550 nL)}}}$.

	Lac	NAA	Cr	Cho	Cr
	1.31 ppm	2.01 ppm	3.03 ppm	3.18 ppm	3.91 ppm
$\text{FOG}_{\frac{\text{micro-antenne (1 } \mu\text{L)}}{\text{micro-antenne (550 nL)}}}$	1.796	2.231	2.125	2.400	1.962

Pour un souci de clarté, les écarts-types permettant d'étudier la reproductibilité des mesures effectuées dans cette étude n'ont pas été présentés dans les tableaux précédents mais

dans la figure suivante.

Cette dernière affiche des histogrammes représentant les valeurs moyennes des 3 différents FOGs et les écarts-types associés pour les résonances du Lac, du NAA, de Cr et de Cho. Les écarts-types ont été calculés par la loi de propagation des erreurs.

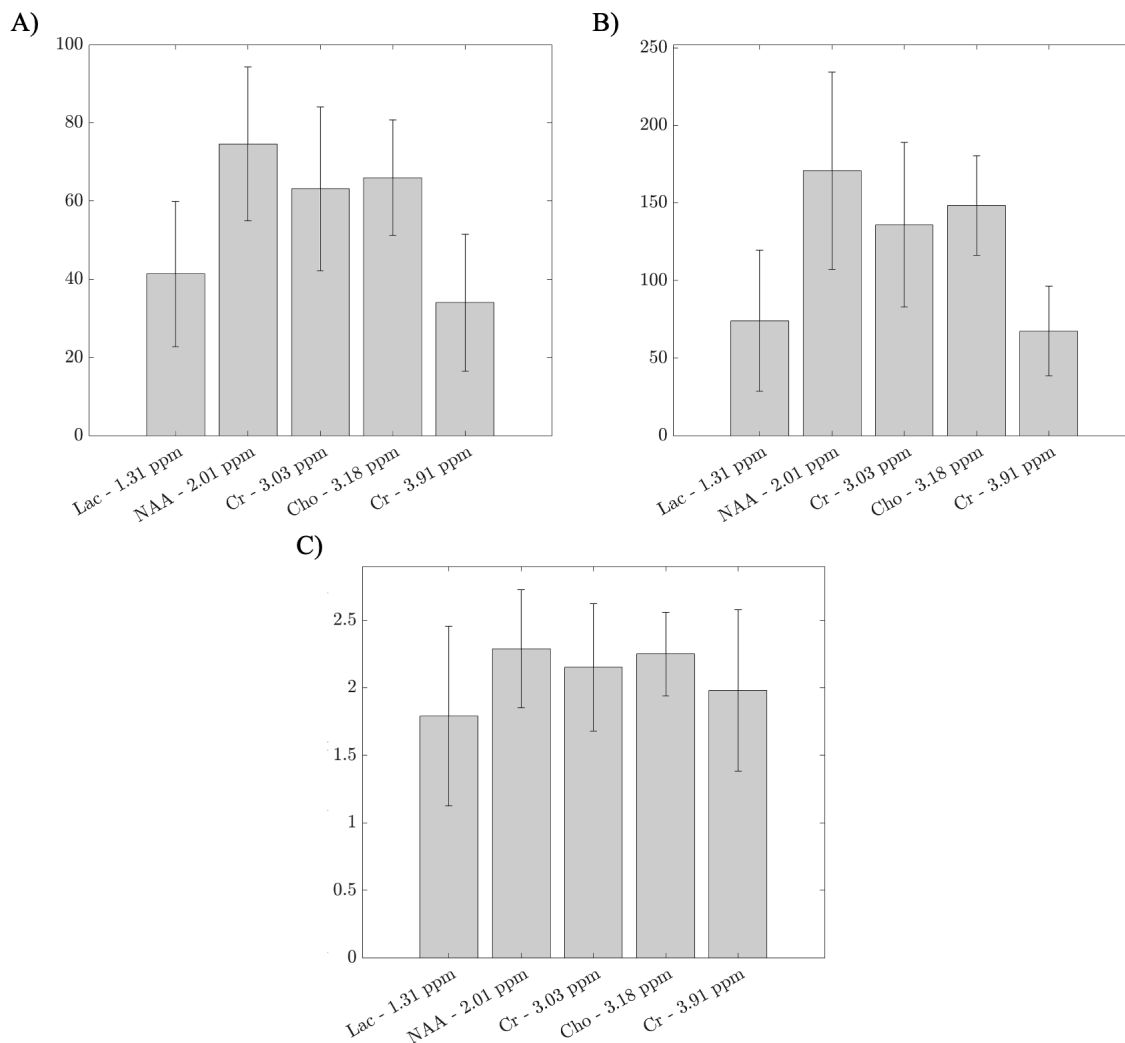


Figure 3.30. Valeurs moyennes et écarts-types associés des FOGs pour les résonances du Lac, du NAA, de Cr et de Cho. (A) $\text{FOG}_{\frac{\text{micro-antenne (550 nL)}}{\text{antenne surfacique}}}$, (B) $\text{FOG}_{\frac{\text{micro-antenne (1 } \mu\text{L)}}{\text{antenne surfacique}}}$, (C) $\text{FOG}_{\frac{\text{micro-antenne (1 } \mu\text{L)}}{\text{micro-antenne (550 nL)}}}$.

Les FOGs, rapports des nLOD_m et ayant permis de tenir compte du volume de détection des différentes antennes RF incluses dans cette étude, ont particulièrement illustré le gain en sensibilité par unité de volume apporté par l'utilisation des micro-antennes RMN implantables et principalement par l'utilisation de la micro-antenne RMN ayant un volume de détection de 1 μL .

La valeur moyenne, pour les 5 résonances, du $\text{FOG}_{\frac{\text{micro-antenne (550 nL)}}{\text{antenne surfacique}}}$ a été d'environ 55, celle du $\text{FOG}_{\frac{\text{micro-antenne (1 } \mu\text{L)}}{\text{antenne surfacique}}}$, d'environ 119 et celle du $\text{FOG}_{\frac{\text{micro-antenne (1 } \mu\text{L)}}{\text{micro-antenne (550 nL)}}}$, d'environ 2.

La valeur moyenne du FOG $\text{FOG}_{\text{micro-antenne}(1\ \mu\text{L})}$, par exemple, pourrait donc permettre de diviser par 119² le temps d'acquisition pour obtenir un spectre RMN ou une image IRM avec un RSB équivalent à celui obtenu avec l'antenne surfacique conventionnelle extracorporelle.

3.5 Synthèse du chapitre

Pour conclure, ce chapitre portant sur la conception et la caractérisation électromagnétique d'un modèle principal de micro-antennes RMN implantables a permis de mettre en lumière l'amélioration de la sensibilité de la RMN par l'utilisation de ce modèle.

Tout d'abord, la micro-antenne RMN implantable en forme de « loop » a été basée sur une méthode de construction simple, reproductible et pouvant être facilement adaptée en fonction de ses futures applications *in vivo* avec notamment la réalisation de boucles résonantes implantables de diverses dimensions comme cela fut ici le cas avec le développement d'une boucle implantable ayant une largeur de 450 μm et d'une autre boucle implantable ayant une largeur de 700 μm en ayant pris en considération l'ajout ultérieur d'un système d'administration d'un composé d'intérêt au centre de celle-ci.

Ensuite, la réalisation de simulations électromagnétiques par éléments finis effectuées avec le logiciel COMSOL Multiphysics® et d'expériences IRM *in vitro* effectuées avec les micro-antennes RMN implantables ont permis d'étudier la distribution du champ magnétique \vec{B}_1 généré et d'estimer le volume de détection des deux boucles résonantes. Les volumes de détection de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 450 μm et de la micro-antenne « loop » ayant une largeur de 700 μm ont été, respectivement, de 550 nL et de 1 μL . Ces valeurs ont alors démontré que l'utilisation des micro-antennes RMN implantables développées dans ces travaux permettait l'obtention d'une haute sélectivité spatiale.

L'étude comparative expérimentale réalisée en utilisant une antenne surfacique conventionnelle extracorporelle et les deux prototypes de la micro-antenne « loop » a démontré l'intérêt de l'utilisation de ces derniers dans l'exploration de régions d'intérêt de très faible volume. En effet, des gains moyens de sensibilité de 55 et de 119 ont été obtenus par l'utilisation de la micro-antenne RMN ayant un volume de détection de 550 nL et par l'utilisation de la micro-antenne RMN ayant un volume de détection de 1 μL , respectivement, et par rapport à l'utilisation de l'antenne surfacique conventionnelle extracorporelle. Par conséquent, l'ensemble de ces résultats obtenus à la suite des simulations RF et des expériences *in vitro* ainsi que l'observation de bons facteurs de qualité ont ouvert la porte à une multitude d'applications *in vivo* des micro-antennes RMN implantables pouvant cibler des échantillons biologiques de faible volume.

Dans le domaine des neurosciences notamment, l'utilisation de telles micro-antennes RMN implantables pourrait ainsi permettre d'étudier précisément et très localement des zones cérébrales particulières comme le cortex, par exemple, dont la cartographie à l'échelle mé-

soscopique représente un réel enjeu scientifique afin de mieux appréhender les éventuelles corrélations entre l'anatomie et le fonctionnement des différentes couches corticales et les fonctions cérébrales.

De plus, en recherche biomédicale préclinique, la compréhension des mécanismes de diverses pathologies cérébrales telles que les maladies neurodégénératives ou les pathologies tumorales pourrait être facilitée par l'utilisation de ces micro-antennes RMN implantables. La haute sélectivité spatiale et l'amélioration de la sensibilité de détection apportées par ces dernières pourraient aussi permettre de distinguer, sur des échantillons biologiques de faible volume, un tissu sain d'un tissu pathologique par des caractéristiques métaboliques et anatomiques distinctes et accessibles par des expériences RMN *in vivo* réalisées avec les micro-antennes RMN implantables.

Diverses améliorations et portant principalement sur le fonctionnement des micro-antennes RMN implantables développées dans ces travaux ont pu être évoquées.

Tout d'abord, l'utilisation de deux antennes distinctes pour la phase d'émission et la phase de réception RF nécessite généralement un circuit de découplage afin d'éviter un fort couplage entre ces dernières et pouvant être responsable de diverses interactions parasites. En effet, durant la phase d'émission RF, habituellement effectuée par une antenne volumique comme ici, des fortes puissances, dont l'ordre de grandeur est largement supérieur au signal de réception, rentrent en jeu. La présence de l'antenne de réception RF, ici la micro-antenne RMN implantable, dans un champ magnétique relativement important peut entraîner, par couplage inductif, une concentration des lignes du champ magnétique \vec{B}_1 proche de cette dernière conduisant à une dégradation de l'uniformité du champ d'excitation pouvant alors causer des artefacts sur les images IRM ou des dégradations de la qualité spectrale des spectres RMN. De plus, des dommages des composants électriques peuvent survenir durant la circulation d'un fort courant dans la micro-antenne RMN implantable lors de la phase d'émission RF. Toutefois, en raison de la très petite taille des micro-antennes RMN implantables, le couplage entre celles-ci et l'antenne volumique n'a pas semblé avoir eu d'impact sur la qualité du spectre RMN *in vitro* et aucune dégradation des composants électroniques n'a été observée.

En plus du circuit de découplage, l'insertion d'un préamplificateur faible-bruit (LNA, pour *Low-Noise preAmplifier*, en anglais), au plus près de la micro-antenne RMN implantable, pourrait permettre de limiter les pertes lors de la transmission du signal et ainsi améliorer la sensibilité de détection et donc le RSB résultant.

Caractérisation cérébrale saine et tumorale chez le rat : application *in vivo* des micro-antennes RMN implantables

Ce chapitre vise à présenter un exemple d'application *in vivo* des micro-antennes RMN implantables dont nous venons d'exposer la méthodologie de conception et de spécification électromagnétique. Cette application porte sur la caractérisation métabolique et anatomique cérébrale saine et tumorale chez le petit animal.

Pour ce faire, des micro-antennes RMN ont été implantées dans le cerveau de rats sains et dans le cerveau de rats porteurs d'une tumeur cérébrale.

Les principaux objectifs de cette étude ont été d'évaluer et de valider l'utilisation de ces dernières dans l'obtention de spectres RMN ^1H et d'images IRM avec une résolution spectrale et spatiale et une sensibilité de détection accrues. La reproductibilité et la fiabilité des mesures spectroscopiques ^1H *in vivo* ont aussi été analysées.

A la suite d'une présentation de la cohorte de rats, du modèle de gliome choisi, du protocole d'imagerie et de spectroscopie et de la chaîne de traitements, nous présentons, en détail, les résultats d'IRM et de SRM obtenus avec les micro-antennes RMN implantables et sur des échantillons de faible volume de tissu cérébral sain et de tissu cérébral tumoral afin de mettre en évidence les différences métaboliques et morphologiques entre ces deux tissus.

4.1 Contexte

L'IRM et la SRM représentent deux techniques complémentaires dans l'étude de diverses pathologies cérébrales et, en particulier, des tumeurs cérébrales.

La classification des tumeurs, la détermination du grade (témoin du degré d'agressivité) et la compréhension des différents processus métaboliques et anatomiques intervenant lors du développement tumoral demeurent essentielles pour le diagnostic, l'évaluation du pronostic et la prise en charge thérapeutique.

Au cours de ces dernières années, l'IRM est devenue la modalité d'imagerie de référence pour la détection et le suivi des tumeurs cérébrales [Drevelgas (2011)]. Différentes informations peuvent, en effet, être obtenues par IRM comme, par exemple, une image anatomique de la tumeur par l'acquisition d'images pondérées T_1 ou T_2 , une évaluation de la néoangiogenèse tumorale par une image de perfusion ou encore une évaluation du tissu oedémateux par une image de diffusion.

De plus, utilisée conjointement à l'IRM, la SRM protonique est une méthode précieuse pour l'évaluation des principaux métabolites cérébraux (cf. **paragraphe 2.1.3.3**) dont certains peuvent représenter des biomarqueurs caractéristiques d'une prolifération tumorale. La distinction du profil métabolique d'un tissu tumoral et d'un tissu sain a permis de positionner la SRM comme une contribution solide au diagnostic et à la différenciation des tumeurs [Bruhn *et al.* (1989b); Howe *et al.* (2003); Doblus *et al.* (2012)].

Cependant, l'IRM et la SRM restent deux techniques pouvant être limitées par une faible sensibilité notamment lors de l'étude de petits volumes et en présence de faibles concentrations comme cela peut être le cas pour certaines tumeurs primitives ou métastatiques. L'utilisation des micro-antennes RMN implantables développées dans ces travaux représente une des solutions les plus efficaces pour s'affranchir de la faible sensibilité inhérente de ces deux techniques de RMN lors d'études sur ce type d'échantillons. En effet, le gain en sensibilité obtenu par les micro-antennes RMN implantables et illustré dans le chapitre précédent pourrait grandement faciliter les acquisitions de données d'IRM et de SRM *in vivo* sur des échantillons biologiques de faible volume.

Dans cette étude, nous avons évalué la capacité des micro-antennes RMN implantables à faire ressortir les différences métaboliques et morphologiques entre un tissu cérébral sain et un tissu cérébral tumoral par l'obtention d'images IRM et de spectres RMN ^1H de haute qualité, c'est-à-dire avec des résolutions spatiales et spectrales et des RSBs optimaux.

4.2 Matériel et méthodes

4.2.1 Cohorte d'animaux

Des rats (40%) et des rates (60%) de souche Wistar (âgés de 7 semaines, poids = 180 g) ont été utilisés pour les expériences *in vivo*. Les animaux provenaient du laboratoire Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). Ils ont été maintenus dans des conditions d'hébergement standard (cycles lumière-obscurité de 12 heures, eau et nourriture adaptée à volonté et température de la pièce d'hébergement = $22 \pm 1^\circ\text{C}$).

Les procédures d'expérimentation animale ont été approuvées par le comité local d'éthique de l'université de Bordeaux (référence 04490.02) en accord avec les recommandations de l'union européenne (2010/63/EU) pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire et conformément aux règles d'éthique du ministère français de l'agriculture et de la forêt

(service de santé animale et service de protection vétérinaire).

Toutes les précautions ont été prises pour minimiser le stress et le nombre d'animaux utilisés dans chaque expérience.

Les expériences portant sur des rats sains et sur des rats pathologiques ont été scindées en deux. En effet, nous aurions pu choisir de poser deux canules (nécessaires à l'insertion des micro-antennes RMN implantables dans le tissu d'intérêt), une du côté tumoral et une du côté controlatéral sain, afin de diminuer le nombre d'animaux utilisés et minimiser les biais interindividuels possibles entre les tissus sains et les tissus pathologiques mais cela aurait engendré des expériences *in vivo*, sur le même rat, beaucoup trop longues en termes de durée d'anesthésie.

Un total de 20 rats sains et de 15 rats pathologiques a été utilisé pour cette étude comportant différentes étapes telles que la validation et l'optimisation des procédures chirurgicales (injection des cellules tumorales C6 et pose de la canule), la validation du protocole d'imagerie et de spectroscopie effectué avec les micro-antennes RMN implantables et la prise en compte du nombre d'animaux retirés de l'étude pour diverses raisons qui seront évoquées tout au long de ce chapitre.

4.2.1.1 Modèle du gliome C6

Les gliomes représentent l'ensemble des tumeurs cérébrales, bénignes ou malignes, d'origine gliale. Il existe de nombreux types de gliomes englobant les astrocytomes, les épendymomes, les oligodendrogliomes et les glioblastomes aussi appelés glioblastomes multiformes (GBMs). Bien que les gliomes soient relativement rares, il s'agit généralement de tumeurs ayant de mauvais pronostic. En effet, la majorité des tumeurs cérébrales malignes (80%) sont des gliomes pour lesquels le taux de survie relative à 5 ans est d'environ 30 % (il diffère, toutefois, en fonction du type histologique, de l'âge du patient au moment du diagnostic et de la nature du traitement).

Les GBMs, aussi connus sous le nom d'astrocytomes de grade IV, représentent environ la moitié de tous les gliomes. Ils sont aussi reconnus comme étant les tumeurs primitives du cerveau les plus fréquentes et les plus agressives [Hanif *et al.* (2017)].

Malgré l'existence de différents traitements tels que la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie ou l'émergence de nouvelles pistes thérapeutiques telles que les thérapies ciblées, l'immunothérapie ou encore la thérapie génique, le pronostic des patients atteints de GBMs reste relativement sombre avec une espérance de vie médiane de 15 à 17 mois et un taux de survie à 5 ans de 5% à la suite du diagnostic. La très forte résistance aux traitements de radiothérapie et/ou de chimiothérapie explique également les nombreuses rechutes locales du glioblastome multiforme.

Toutes ces caractéristiques font du GBM un des types de tumeurs cérébrales le plus étudié en recherche clinique et le développement de modèles animaux permettant, d'une part, de mieux comprendre les processus génétiques et moléculaires de l'oncogénèse tumorale

et, d'autre part, de concevoir et d'évaluer des potentielles stratégies thérapeutiques reste essentiel dans la recherche portant sur les gliomes.

C'est à la fin des années 1960 que fut développée la lignée cellulaire C6 issue d'une tumeur gliale chimio-induite chez le rat de souche Wistar après une injection répétée de N-nitrosométhylurée [Benda *et al.* (1968)].

Parmi les différents modèles précliniques de gliomes, le modèle C6 est l'un des modèles le plus similaire au GBM [Gieryng *et al.* (2017)] faisant de lui l'un des plus utilisés en recherche neuro-oncologique chez le petit animal.

En effet, il rassemble plusieurs caractéristiques du GBM avec notamment un index mitotique élevé, une nécrose tumorale, une invasion parenchymateuse et une néoangiogenèse caractéristique [Grobben *et al.* (2003); Barth & Kaur (2009); Souza *et al.* (2018)].

Ce modèle syngénique offre l'avantage de ne pas avoir besoin de rongeurs immunodéprimés par rapport aux différents modèles xénogéniques.

Le principal inconvénient de ce dernier réside dans le faible taux de développement tumoral en raison d'une possible réponse allo-immune suite à l'implantation des cellules C6 [Barth & Kaur (2009)].

4.2.1.2 Injection des cellules C6 par chirurgie stéréotaxique

Les animaux ont été anesthésiés avec 4% d'isoflurane (pour l'induction) puis maintenus endormis avec 2.5% d'isoflurane dans un mélange d'air/O₂ (70/30).

Ils ont ensuite été placés dans un cadre stéréotaxique dont la tête a été maintenue par une barre de gueule, un pince de museau et des barres d'oreilles. Le cadre a également été muni d'un masque facial pour l'anesthésie gazeuse. Une injection de 0.25 ml de lidocaïne (<4 mg/kg), un anesthésique local, a été effectuée au niveau du site d'incision. Une incision a ensuite été réalisée le long de la ligne médiane et le tissu cutané et les couches épithéliales ont été délicatement dégagés. Un trou de 1 mm de diamètre a été percé dans le crâne à 3 mm latéralement du bregma, au niveau de l'hémisphère droit.

10⁶ cellules C6 (achetées auprès de la banque ATCC-LGC, Manassas, Virginie, États-Unies) contenues dans 10 µL de milieu de culture ont été injectées en 10 min à l'aide d'une aiguille (longueur = 51 mm et calibre = 33 G) montée sur une seringue Hamilton dans le cortex somatosensoriel primaire (S1HL) situé à une profondeur de 2 mm sous la dure mère (cf. **figure 4.1**). Deux minutes après l'injection, l'aiguille a été remontée et le trou comblé avec de la cire de Horsley.

Pour finir, la peau a été recousue et après la chirurgie, les animaux ont été placés en cage individuelle et ont reçu des doses, par voie sous-cutanée, de buprénorphine (0.05 mg/kg), un analgésique, toutes les 12 heures pendant 48 heures.

Nous avons appelé J0, le jour de l'injection des cellules tumorales C6.

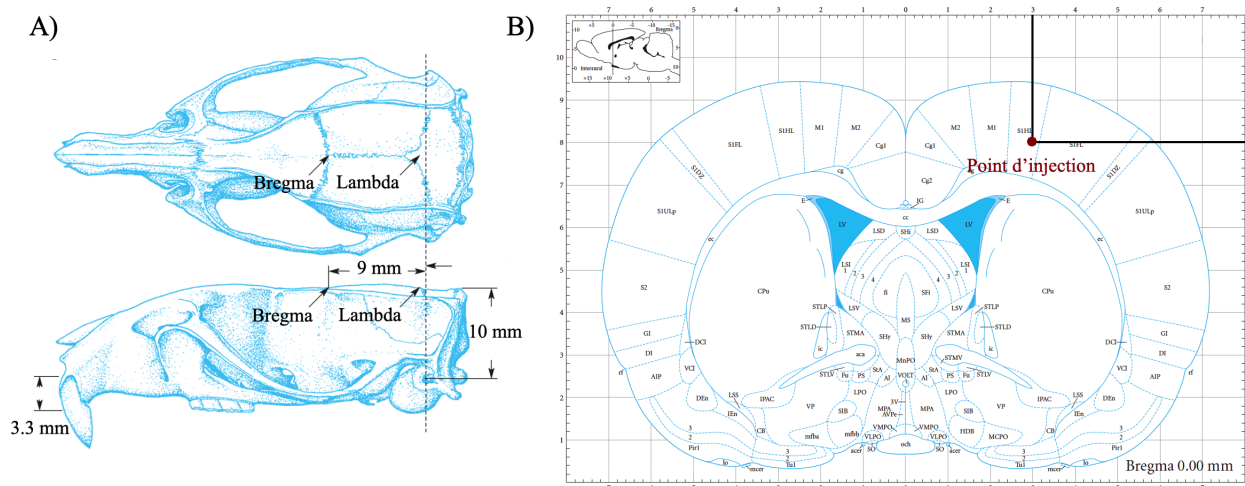


Figure 4.1. Injection des cellules tumorales C6 dans le cortex somatosensoriel primaire (S1HL). (A) Vues dorsale et latérale du crâne d'un rat Wistar de 290 g. Les positions du bregma, du lambda et du plan de la ligne interaurale sont indiquées. (B) Localisation du point d'injection sur une planche de l'atlas du cerveau de rat [Paxinos & Watson (1982)].

4.2.1.3 Suivi de la croissance tumorale

Préalablement à la pose de la canule permettant l'introduction de la micro-antenne RMN implantable dans le gliome C6, la croissance tumorale a été suivie par IRM.

Les rats pour lesquels nous avons constaté un échec de l'injection (présence de petites bulles d'air, hémorragie, ...) ou une absence de développement tumoral ont été retirés de l'étude et ceux présentant les points limites suivants et connus pour être révélateurs d'une souffrance ont été euthanasiés : baisse du poids supérieure à 20%, hémorragie nasale et/ou orbitale, prostration, mauvais entretien des poils et troubles de la locomotion.

Pour chaque rat porteur d'un gliome C6, des images anatomiques pondérées T_2 ont été acquises 4, 11 et 16 jours après l'injection des cellules C6. Elles ont été réalisées avec les antennes Bruker conventionnelles externes (l'antenne volumique en quadrature a été utilisée en émission RF et l'antenne surfacique en réseau phasé 2×2 éléments en réception RF) et par l'utilisation d'une séquence Turbo-RARE (pour *Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*, en anglais) avec les paramètres suivants : $TR/TE = 2500/33$ ms, 15 coupes de 0.8 mm d'épaisseur avec un FOV de 35×35 mm² et une taille de voxels égale à $136 \times 136 \times 800$ μm^3 . La durée de l'acquisition était de 2 min 40 s.

La **figure 4.2** illustre un exemple d'images IRM coronales et sagittales pondérées T_2 d'un cerveau de rat pathologique acquises 4, 11 et 16 jours après l'injection des cellules C6.

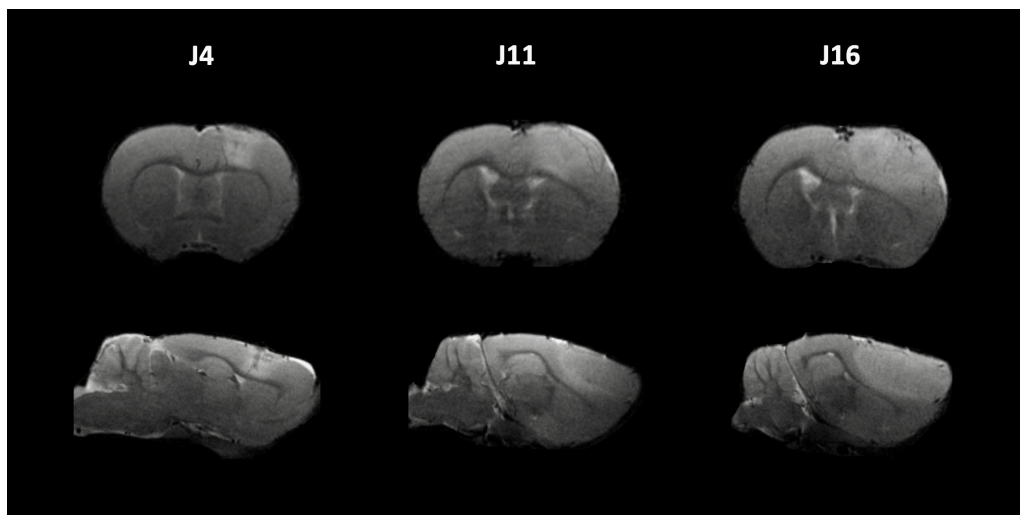


Figure 4.2. Coupes coronales et sagittales d’images IRM pondérées T_2 acquises 4, 11 et 16 jours après l’injection des cellules C6 montrant la croissance tumorale. Le gliome C6 apparaît en hypersignal.

Les images à J11 ont été utilisées afin de définir le positionnement de la canule dont la conception et la pose sont décrites dans la partie suivante.

De temps en temps, une lésion importante induite par l’introduction de l’aiguille lors de l’injection des cellules C6 a été observée sur certains rats nous obligeant ainsi à décaler de quelques millimètres le positionnement de la canule lors de sa pose par chirurgie stéréotaxique.

Les images à J16 ont été réalisées avant l’introduction de la micro-antenne RMN implantable et après la pose de la canule. Nous avons pu, à partir de ces images, contrôler le bon positionnement de cette dernière, l’absence de complications cérébrales post-opératoires et mesurer le volume total de la tumeur. A noter que la canule n’apparaît pas sur les images IRM à J16 de la figure précédente car seuls des masques du cerveau ont été affichés afin de faciliter la visualisation de la croissance tumorale.

4.2.2 Protocole d’implantation des micro-antennes RMN

4.2.2.1 Conception des canules

Pour faciliter l’introduction de la micro-antenne RMN implantable au sein du tissu cérébral sain ou pathologique, il a été nécessaire d’utiliser une canule (aussi appelée guide-canule).

Afin d’établir une correspondance entre la géométrie de la micro-antenne RMN implantable et la géométrie de la canule, nous avons choisi de partir sur une canule fabriquée à partir d’une pointe de pipette de 10 μ L (Eppendorf™ 0030073746, Hambourg, Allemagne).

La fabrication est illustrée à la **figure 4.3**.

Les pointes de pipettes étaient en silicone Tygon™ 3350 donc totalement biocompatibles. Une fois construites, les canules ont été stérilisées par chaleur humide (autoclave). Elles ont pu être montées facilement sur le support du cadre stéréotaxique et maintenues fermement durant leur pose décrite au paragraphe ci-dessous.

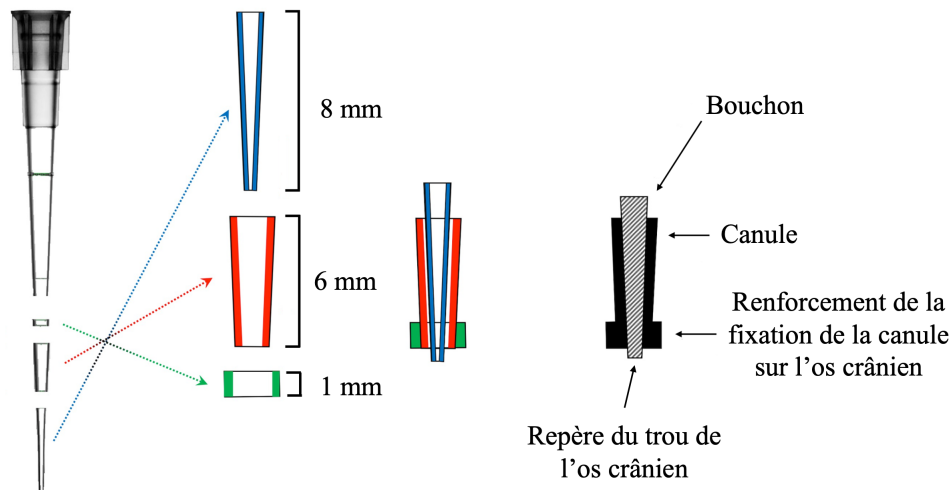


Figure 4.3. Fabrication d'une canule à partir d'une pointe de pipette de 10 µL.

4.2.2.2 Pose de la canule par chirurgie stéréotaxique

Ce protocole ressemble fortement au protocole décrit au [paragraphe 4.2.1.2](#) car il se base également sur le principe de la chirurgie stéréotaxique.

Les animaux ont été anesthésiés avec 4% d'isoflurane (pour l'induction) puis maintenus endormis avec 2.5% d'isoflurane dans un mélange d'air/O₂ (70/30).

Ils ont ensuite été placés dans un cadre stéréotaxique muni d'un masque facial pour l'anesthésie gazeuse et une injection de 0.25 ml de lidocaïne (<4 mg/kg), un anesthésique local, a été réalisée au niveau du site d'incision.

Pour les rats sains, après une incision médiane, deux trous ont été percés dans le crâne : l'un à l'aide d'une mèche de 1 mm de diamètre et positionné à 3 mm latéralement du côté droit du bregma pour le placement de la canule et l'autre avec une mèche de 1.3 mm de diamètre situé à une distance de 3-4 mm du précédent trou pour le placement d'une vis en plastique.

Pour les rats porteurs d'un gliome C6 et en fonction des images IRM anatomiques pondérées T₂ acquises à J11 permettant d'observer la présence ou non d'une lésion cérébrale causée par l'aiguille d'injection des cellules tumorales C6, le trou pour le placement de la canule a été soit percé à des coordonnées définies pour éviter cette dernière et être positionné au niveau de la zone tumorale, soit aux mêmes coordonnées précédentes utilisées pour les rats sains. Pour chaque rat porteur d'un gliome C6, la pose de la canule a été effectuée à J14.

La vis et la canule ont ensuite été fixées sur le crâne avec du ciment dentaire (Dentalon

Plus, Kulzer, Allemagne). La vis en plastique a permis d'augmenter l'adhérence du ciment sur le crâne et ainsi consolider la fixation de la canule.

Après la chirurgie, les rats ont été logés individuellement et ont reçu des doses, par voie sous-cutanée, de buprénorphine (0.05 mg/kg), toutes les 12 heures pendant 48 heures.

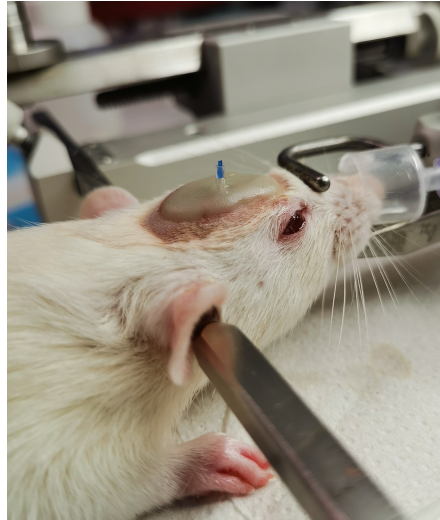


Figure 4.4. Canule positionnée par chirurgie stéréotaxique nécessaire à l'implantation de la micro-antenne RMN dans le tissu cérébral. Un fil bleu a été inséré dans le bouchon afin que ce dernier soit plus facilement identifiable lors de son retrait.

Une coupe coronale et une coupe sagittale d'images IRM anatomiques pondérées T₂ acquises avec les antennes conventionnelles externes 16 jours après l'injection des cellules C6 et 2 jours après la pose de la canule par chirurgie stéréotaxique chez un rat porteur d'un gliome C6 sont présentées à la **figure 4.5**. Les images IRM ont été acquises avec une séquence Turbo-RARE et des paramètres identiques à ceux utilisés lors du suivi de la croissance tumorale.

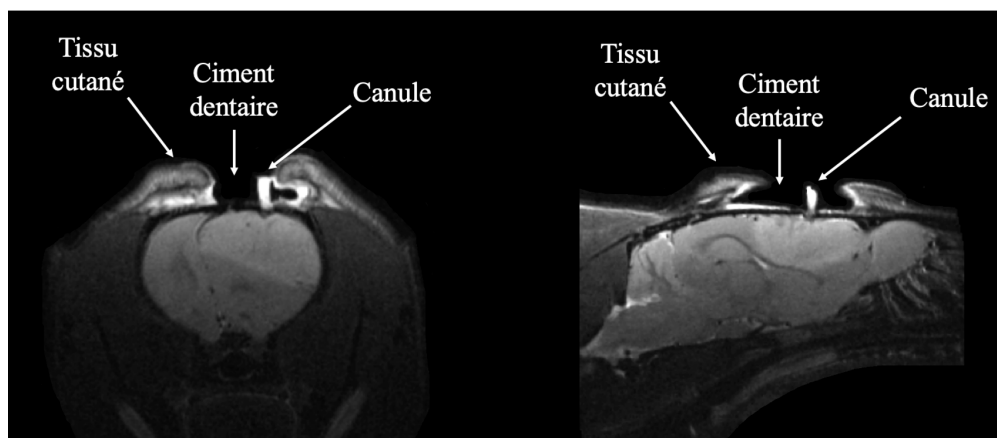


Figure 4.5. Coupes coronale et sagittale d'images IRM pondérées T₂ acquises 16 jours après l'implantation des cellules C6 et 2 jours après la pose de la canule par chirurgie stéréotaxique chez un rat porteur d'un gliome C6 apparaissant en hypersignal.

4.2.3 Protocole d'IRM et de SRM

Système RMN préclinique

Toutes les acquisitions RMN ont été réalisées sur un système RMN préclinique Bruker doté d'un champ magnétique statique de 7 T (BioSpec 70/20, Bruker Biospin, Ettlingen, Allemagne) associé au logiciel ParaVision 6.0.1 et géré par l'UAR 3767 de l'Institut de Bio-Imagerie de Bordeaux (IBIO).

Pour l'émission RF, tout comme pour les expériences *in vitro* présentées dans le **chapitre 3**, l'antenne volumique en quadrature possédant un diamètre intérieur de 86 mm a été utilisée afin d'avoir une excitation homogène sur l'ensemble du volume étudié. La micro-antenne RMN implantée a été centrée et positionnée verticalement dans l'antenne volumique, la droite normale à la surface elliptique de la micro-antenne RMN étant placée perpendiculairement au champ magnétique statique \vec{B}_0 .

Des détails sur l'implantation de la micro-antenne RMN sont donnés ci-dessous et rappelons que la micro-antenne RMN utilisée pour la totalité des expériences *in vivo* a été la micro-antenne « loop » ayant un volume de détection de 1 μL .

Positionnement des animaux

Les expériences RMN ont eu lieu 2 jours après la chirurgie de la pose de la canule et ont été réalisées sous anesthésie générale.

L'induction de l'anesthésie a été effectuée avec 4% d'isoflurane dans un mélange d'air/O₂ (70/30). Les animaux ont ensuite été placés dans le berceau du système RMN préclinique en étant maintenus endormis avec 1.5-2% d'isoflurane à l'aide d'un masque facial et la tête a été immobilisée par des barres d'oreilles.

Une fois les animaux correctement positionnés, le bouchon de la canule a été retiré tout en portant une vigilance sur la survenue éventuelle d'une hémorragie mettant fin à l'expérience *in vivo*, puis la micro-antenne RMN a été insérée dans la canule. Seule la boucle de détection a été implantée dans la région d'intérêt, le cortex somatosensoriel primaire (S1HL) pour les animaux sains et la tumeur cérébrale, le gliome C6, pour les animaux pathologiques.

Ensuite, la micro-antenne RMN implantée a été accordée et adaptée par le réglage des condensateurs variables d'accord et d'adaptation et le berceau a été déplacé à l'intérieur de l'aimant afin de positionner la micro-antenne RMN implantée à l'isocentre magnétique. Un système chauffant par circuit d'eau chaude a permis de maintenir la température corporelle de l'animal autour de 37°C et la fréquence et l'amplitude respiratoires ont été surveillées tout au long des acquisitions afin de contrôler la profondeur de l'anesthésie et enregistrer l'état physique de l'animal.

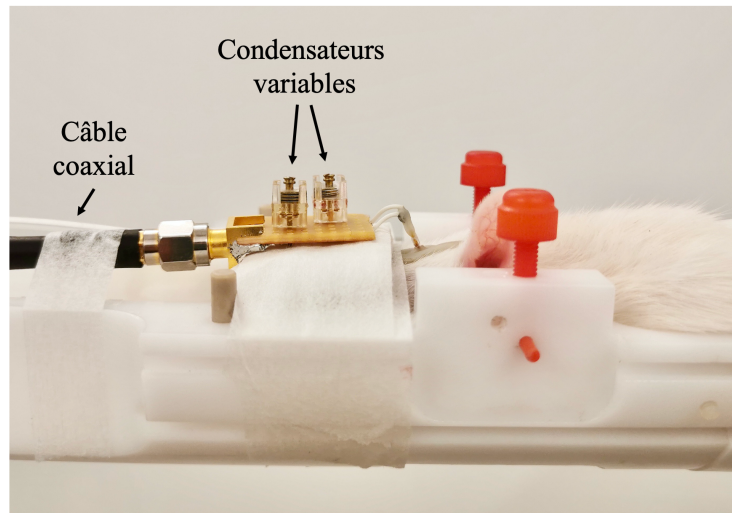


Figure 4.6. Positionnement d'un rat dans le berceau du système RMN préclinique et après implantation de la micro-antenne RMN. La tête a été maintenue immobile par des barres d'oreilles (en rouge).

Séquences d'imagerie et de spectroscopie RMN

Acquisitions avec l'antenne volumique Bruker en réception RF :

Suite à l'insertion de la micro-antenne RMN implantable dans le tissu cérébral d'intérêt et préalablement aux acquisitions effectuées avec cette dernière, des images anatomiques pondérées T_2 ont été acquises avec l'antenne volumique Bruker afin de vérifier le bon positionnement de la micro-antenne RMN et la possible survenue d'une hémorragie suite à la rupture d'un vaisseau lors de l'implantation.

Pour cela, une séquence Turbo-RARE a été utilisée avec les paramètres suivants : TR/TE = 2500/33 ms, 15 coupes de 0.8 mm d'épaisseur avec un FOV de $35 \times 35 \text{ mm}^2$ et une taille de voxels égale à $136 \times 136 \times 800 \mu\text{m}^3$. La durée de l'acquisition était de 2 min 40 s.

Acquisitions avec la micro-antenne RMN implantée en réception RF :

La séquence PRESS (cf **paragraphe 2.1.3.2**) a été utilisée pour l'acquisition des données spectroscopiques *in vivo* avec la micro-antenne RMN implantable et avec les paramètres suivants : TR/TE = 2000/15.266 ms, taille du voxel = $2 \times 4 \times 2 \text{ mm}^3$, nombre d'accumulations = 256 ou 512, durée de l'acquisition = 8 min 32 s ou 17 min 04 s.

Le module VAPOR (cf **paragraphe 2.1.3.2**) a été employé pour la suppression du signal de l'eau avec une bande passante de 150 Hz. Un ajustement manuel des gains des impulsions de la suppression de l'eau a été effectué pour chaque acquisition afin d'optimiser cette dernière.

L'étape de compensation et de correction des inhomogénéités du champ magnétique statique \vec{B}_0 appelée shim a été faite de manière automatique (premier et second ordre) et la fréquence a été ajustée avant chaque acquisition.

Pour faciliter le positionnement du voxel d'intérêt de la séquence de spectroscopie mono-voxel décrite précédemment, des images IRM ont été acquises avec la micro-antenne RMN implantée.

Une séquence FLASH (pour *Fast Low Angle SHot*, en anglais) a été utilisée pour acquérir des images pondérées T_1 et avec les paramètres suivants : $TR/TE = 200/3.5$ ms, 5 coupes de 0.8 mm d'épaisseur avec un FOV de 10×10 mm² et une taille de voxels égale à $39 \times 39 \times 800$ μm^3 . La durée de l'acquisition était de 2 min 52 s.

Une séquence ZTE, identique à celle utilisée pour les expériences *in vitro*, a aussi été effectuée.

Pour finir, des images anatomiques pondérées T_1 à haute résolution spatiale ont été acquises avec une séquence FLASH et avec les paramètres suivants : $TR/TE = 200/3.5$ ms, 5 coupes de 0.5 mm d'épaisseur avec un FOV de 10×10 mm² et une taille de voxels égale à $33 \times 33 \times 500$ μm^3 . La durée de l'acquisition était de 26 min 40 s.

4.2.4 Traitement des données spectroscopiques

Le traitement des données spectroscopiques est une étape cruciale de la SRM et peut être scindé en deux grandes parties : une partie de pré-traitements et une partie d'identification et de quantification spectrales.

En effet, les signaux SRM *in vivo* peuvent être affectés par quelques limitations (présence du signal résiduel de l'eau, faibles concentrations des métabolites observés, chevauchement des résonances des métabolites d'intérêt et des résonances des macromolécules, mouvements physiologiques,...) entraînant une diminution de la qualité des données et ainsi des erreurs sur la quantification.

Au cours de cette thèse, nous avons choisi d'utiliser le logiciel jMRUI (pour *java-based MR User Interface*, en anglais) [Stefan *et al.* (2009)] pour effectuer les étapes de pré-traitements et d'identification et de quantification spectrales décrites dans les paragraphes suivants.

4.2.4.1 Étape de pré-traitements

Il existe une variété de méthodes de pré-traitements pouvant considérablement améliorer la qualité des signaux en SRM.

Les méthodes de pré-traitements typiques et qui ont été utilisées dans ces travaux sont brièvement décrites ci-dessous :

- **Correction de la phase :**

Idéalement, les spectres RMN devraient avoir une phase nulle mais le délai entre l'excitation et la détection, la variation de l'angle de basculement et les déphasages du filtre utilisé pour réduire le bruit en dehors de la largeur de la bande spectrale

produisent différentes distorsions de la phase [Chen *et al.* (2002)].

En guise de solutions, des approches de correction de la phase ont été utilisées pour améliorer la visualisation et l'analyse spectrale. En pratique, la correction de la phase se compose de deux éléments, l'un dépendant de la fréquence (phase d'ordre 1) et l'autre indépendant de la fréquence (phase d'ordre 0). La correction de la phase d'ordre 0 consiste à multiplier le spectre complexe par un facteur de phase complexe égal à la phase initiale de la FID [Jiru (2008)]. L'ajustement de la phase d'ordre 1 correspond à la modification du temps du début du signal RMN en supposant alors que la FID ne commencerait plus au temps $t=0$ [Chen *et al.* (2002)].

Visuellement, sur le spectre RMN, la correction de la phase se traduit par l'obtention de signaux de résonance symétriques et positifs. Généralement, le signal de l'eau possédant une plus grande amplitude que les signaux de résonance des métabolites cérébraux est utilisé comme repère visuel.

Le logiciel jMRUI permet de faire des corrections manuelles ou automatiques.

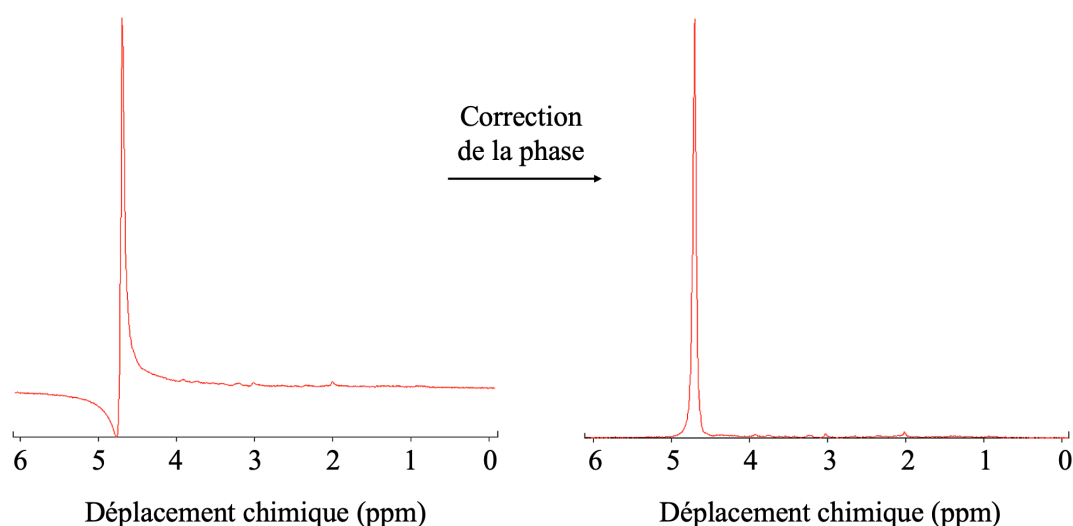


Figure 4.7. Correction manuelle de la phase d'ordre 0 effectuée par jMRUI d'un spectre RMN ^1H *in vivo* représentatif du tissu cérébral de rat sain acquis avec la micro-antenne RMN (volume de détection = 1 μL) et avec une séquence PRESS (TR/TE = 2000/15.266 ms, suppression de l'eau = VAPOR, 512 accumulations, temps d'acquisition = 17 min 04 s).

- **Suppression du signal résiduel de l'eau :**

Malgré la technique utilisée, VAPOR (cf. **paragraphe 2.1.3.2**), permettant d'atténuer fortement le signal de l'eau, il subsiste quasi-systématiquement, sur les spectres RMN ^1H , un signal résiduel de l'eau se traduisant par un pic d'amplitude plus ou moins élevée à 4.7 ppm pouvant perturber les étapes d'identification et de quantification spectrales.

Une technique efficace utilisée pour la suppression de ce signal résiduel et disponible

sur jMRUI est l'algorithme HLSVD (pour *Hankel Lanczos Singular Value Decomposition*, en anglais) [Vanhamme *et al.* (1998); Laudadio *et al.* (2002)]. Cette méthode se base sur une décomposition du signal RMN en valeurs singulières. Toutes les composantes identifiées comme appartenant à la région fréquentielle de l'eau sont soustraites du signal.

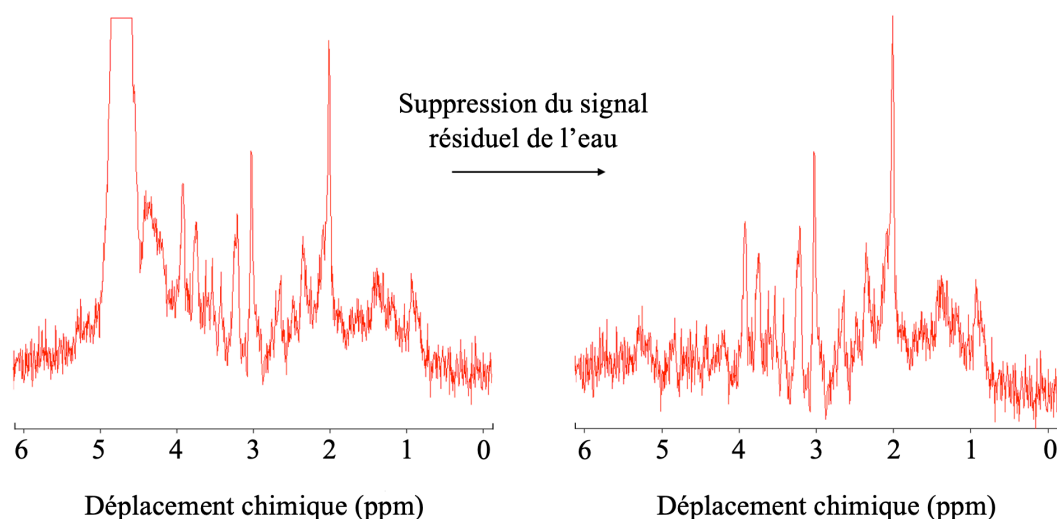


Figure 4.8. Suppression du signal résiduel de l'eau par la technique HLSVD du spectre RMN ^1H dont la phase a été précédemment corrigée.

- **Apodisation :**

L'apodisation est un pré-traitement permettant un gain important en termes de RSB avec, cependant, une diminution négligeable de la résolution spectrale [Bartha *et al.* (1999)].

La réduction du bruit post-acquisition par le biais du traitement du signal est appelée débruitage. L'application de filtres apodiseurs est devenue la méthode de référence pour débruiter le signal RMN. Elle consiste à multiplier la FID par une fonction/filtre qui peut être une fonction décroissante lorentzienne, une fonction exponentielle simple, une fonction gaussienne ou une fonction sinusoïdale. Cette technique peut aussi être utilisée pour éliminer les artefacts de troncature qui sont présents lorsque la FID est tronquée.

Par le logiciel jMRUI, nous avons utilisé une apodisation lorentzienne. La constante d'apodisation, choisie par l'utilisateur, a été comprise entre 5 et 7 Hz en fonction de la qualité spectrale (RSB et résolution spectrale) initiale des spectres RMN traités.

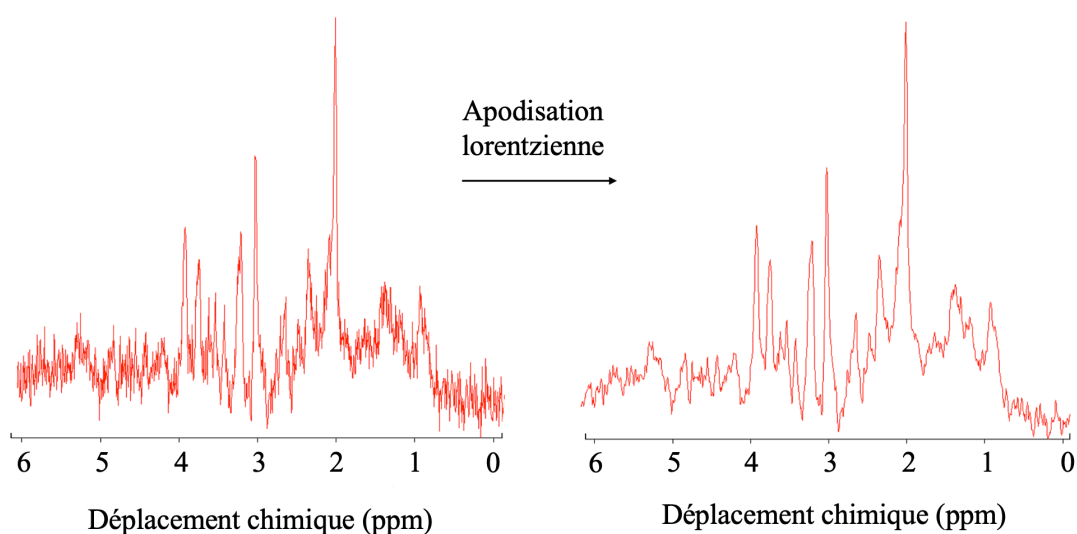


Figure 4.9. Apodisation lorentzienne avec une constante d’apodisation de 5 Hz du spectre RMN précédent.

- **Estimation et correction de la ligne de base :**

Les spectres RMN *in vivo* sont également affectés par la présence de signaux très larges provenant des lipides et des macromolécules (ayant des valeurs de temps de relaxation T_2^* très courtes) formant une ligne de base distordue (aussi appelée *baseline*, en anglais) s’étalant sur tout le spectre. Les contributions macromoléculaires et lipidiques peuvent fournir des informations cliniques importantes et pertinentes, si elles sont correctement évaluées [Hofmann *et al.* (2001)], mais peuvent également être responsables de nombreuses erreurs lors de l’étape de la quantification.

Il existe alors différents moyens de supprimer cette ligne de base afin de faciliter cette dernière. Elle peut être supprimée pendant l’acquisition des données en utilisant des séquences spécifiques d’inversion-récupération [Knight-Scott (1999)] ou en se basant sur la relaxation T_2 en augmentant le TE [Kreis *et al.* (1993)].

La ligne de base peut également être estimée et corrigée lors d’une étape de pré-traitement. Une approche directe et efficace est la troncature des points initiaux de la FID [Ratiney *et al.* (2005a)]. Le signal de la ligne de base s’atténuant très rapidement, la suppression de la partie initiale de la FID entraîne alors une suppression des composantes de cette dernière. Cette méthode est disponible sur jMRUI et est intégrée dans l’algorithme de quantification décrit dans le **paragraphe 4.2.4.2** et utilisé dans ces travaux.

4.2.4.2 Étape d’identification et de quantification spectrales

Le logiciel jMRUI possède deux principaux algorithmes d’analyse quantitative des spectres RMN qui sont l’algorithme AMARES (pour *Advanced Method for Accurate, Ro-*

bust, and Efficient Spectral fitting, en anglais) [Vanhamme *et al.* (1997)] et l'algorithme QUEST (pour *QUantum ESTimation*, en anglais) [Ratiney *et al.* (2005b)].

Ce dernier a été utilisé tout au long de cette thèse et c'est pourquoi nous détaillons uniquement les principes de l'algorithme QUEST.

L'algorithme QUEST est une approche se basant sur des connaissances préalables en utilisant des ensembles de bases de métabolites simulées ou empiriques.

Elle est fondée sur une approche semi-paramétrique et l'estimation des résonances des métabolites repose sur un modèle dont les paramètres sont optimisés par minimisation des moindres carrées. Le modèle est produit soit par une simulation ou soit par une mesure *in vitro* de la signature spectrale de chaque métabolite en fonction des paramètres d'acquisitions.

Dans nos travaux, nous avons utilisé une base de données de métabolites simulée par le module NMRScope-B (pour *NMR Spectra Calculation using OPERators-Brno*, en anglais) de jMRUI et qui repose sur une approche par mécanique quantique [Starcuk *et al.* (2008)]. Elle prend en compte les paramètres d'acquisitions *in vivo* (TE, TR, intensité du champ magnétique statique, fréquence d'échantillonnage et nombre de points) afin de simuler précisément les caractéristiques des métabolites (nombre de spins, déplacements chimiques et couplages scalaires).

11 métabolites (NAA, NAAG, Cho, PCho, Cr, PCr, Glu, Gln, Lac, mI et Tau) ont été inclus dans notre base de données pour le protocole expérimental défini dans le **paragraphe 4.2.3** (séquence PRESS, TE = 15.266 ms, TR = 2000 ms, bande passante de 3301 Hz, 2048 points). Les différents spectres de l'ensemble des métabolites simulés sont affichés à la **figure 4.10**.

Les autres métabolites, présentés dans le **paragraphe 2.1.3.3**, ayant une concentration relativement faible et des résonances se chevauchant avec d'autres résonances de métabolites ayant des concentrations plus élevées n'ont pas été simulés (Ala, GABA, Asp et Glc).

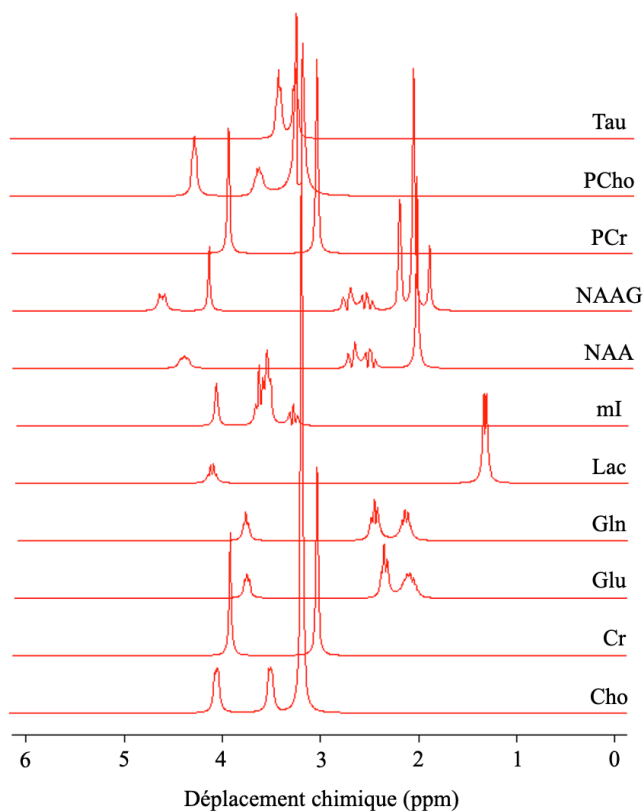


Figure 4.10. Signaux de l'ensemble des métabolites simulés par mécanique quantique avec le module NMRScope-B pour une acquisition spectroscopique *in vivo* effectuée avec une séquence PRESS à 7 T (TR = 2000 ms, TE = 15.266 ms, bande passante = 3301 Hz, nombre de points = 2048).

L'estimation de la ligne de base (cf. [paragraphe 4.2.4.1](#)), intégrée dans l'algorithme QUEST, a été réalisée via une procédure non-paramétrique basée sur les valeurs courtes des temps de relaxation T_2^* des macromolécules et des lipides. L'algorithme QUEST suppose que le signal parasite de la ligne de base est présent uniquement dans les premiers points de la FID.

L'approche de l'estimation de la ligne de base contenue dans l'algorithme QUEST est appelée « Subtract » et la procédure complète comportant l'étape de l'estimation et de la correction de la ligne de base et l'étape de la quantification est appelée « Subtract-QUEST ».

Pour résumer, la procédure « Subtract-QUEST » a été composée des étapes suivantes :

- Troncature des points initiaux de la FID (15-25 points) qui contiennent la contribution macromoléculaire et lipidique.
- Estimation des caractéristiques des métabolites à partir du signal tronqué avec une base de données des métabolites ne contenant pas les signaux de résonance des lipides et des macromolécules.

- Reconstruction du signal non tronqué en utilisant les caractéristiques estimées des différents métabolites et soustraction de la FID pour obtenir le signal bruité macromoléculaire et lipidique.
- Modélisation du signal macromoléculaire et lipidique par une somme de sinusoides amorties exponentiellement en utilisant un algorithme de décomposition en valeurs singulières.
- Soustraction du signal macromoléculaire et lipidique modélisé de la FID et quantification du signal résultant.

La figure suivante illustre le résultat de la quantification par l'algorithme Subtract-QUEST d'un exemple de spectre RMN ^1H *in vivo* représentatif du tissu cérébral de rat sain acquis avec la micro-antenne RMN implantable et pré-traité par le logiciel jMRUI (correction de la phase, suppression du signal résiduel de l'eau et apodisation lorentzienne de 5 Hz).

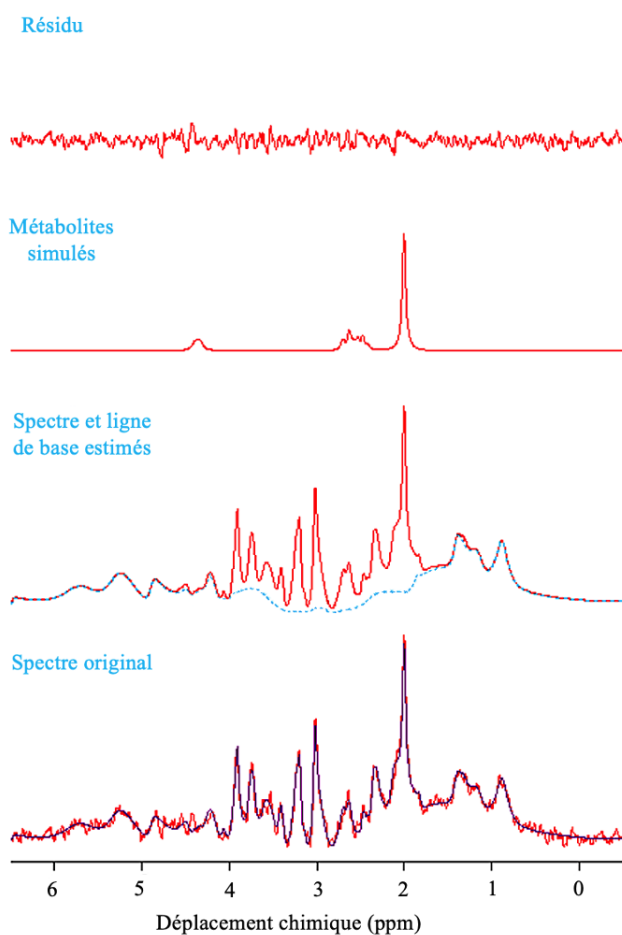


Figure 4.11. Résultat de la quantification par l'algorithme Subtract-QUEST en utilisant la base de métabolites simulés. De bas en haut : exemple d'un spectre RMN original *in vivo* du tissu cérébral de rat sain acquis avec la micro-antenne RMN à 7 T et superposition du spectre estimé (en bleu foncé) ; spectre et ligne de base (ligne bleue en pointillés) estimés ; signaux des métabolites simulés (exemple du signal du NAA) ; résidu.

La quantification par l'algorithme Subtract-QUEST a également fourni les bornes de Cramér-Rao permettant l'évaluation de la fiabilité des estimations des amplitudes et donc des concentrations des différents métabolites.

En effet, S. Cavassila proposa, en 2001, l'utilisation de ces bornes (appelées aussi CRLB pour *Cramér-Rao Lower Bounds*, en anglais) pour évaluer l'erreur sur l'estimation des concentrations en déterminant la limite inférieure des variances des paramètres estimés par un estimateur sans biais [Cavassila *et al.* (2000, 2001)].

La valeur de la borne de Cramér-Rao est directement dépendante du niveau de bruit du signal et est proportionnelle à l'écart-type de ce dernier confirmant ainsi le fait que la présence de bruit rend l'étape de quantification plus délicate et avec des erreurs sur les estimations plus fréquentes.

Un seuil maximal de 20% pour la borne CRLB est souvent utilisé dans la littérature portant sur la quantification des signaux de SRM. Cette valeur a été arbitrairement choisie par S. W. Provencher lorsqu'il développa un autre logiciel pour la quantification des données spectroscopiques, LCModel [Provencher (2001)].

Bien qu'il soit discutable, ce seuil permet de rejeter les estimations trop imprécises et a été utilisé pour les quantifications de cette étude.

4.3 Résultats et discussion

4.3.1 Expériences spectroscopiques sur des cerveaux d'animaux sains

Dans un premier temps, des expériences sur des cerveaux de rats sains ont été effectuées afin d'étudier le caractère reproductible et fiable des mesures spectroscopiques *in vivo* obtenues avec les micro-antennes RMN implantables.

La qualité spectrale, généralement définie par la résolution spectrale (largeur à mi-hauteur en Hz ou FWHM pour *Full Width at Half Maximum*, en anglais) et le RSB, a été analysée pour chaque spectre acquis avec les micro-antennes RMN.

De plus, l'influence de l'introduction intracérébrale de la micro-antenne RMN implantable sur le profil métabolique du tissu sain obtenu avec cette dernière a été examinée. Pour cela, les estimations des concentrations des métabolites obtenues suite à des acquisitions spectroscopiques *in vivo* réalisées avec les micro-antennes RMN ont été comparées avec des estimations obtenues suite à des acquisitions spectroscopiques *in vivo* réalisées avec des antennes conventionnelles externes.

La **figure 4.12** représente une image anatomique pondérée T_2 acquise avec les antennes conventionnelles externes illustrant le positionnement de la micro-antenne RMN implantable dans un cerveau de rat sain et celui du voxel d'acquisition de la séquence de spec-

troscopie localisée PRESS (en rouge).

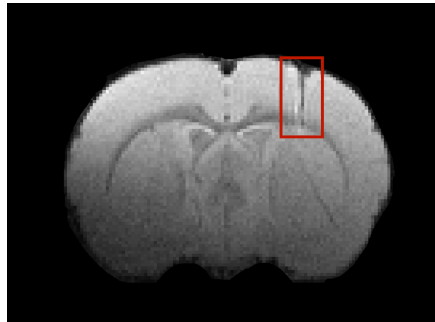


Figure 4.12. Visualisation de la micro-antenne RMN implantée et du voxel d'acquisition de la séquence de spectroscopie PRESS (en rouge) sur une image anatomique pondérée T_2 du cerveau de rat sain. La micro-antenne RMN est située dans le cortex somatosensoriel primaire (S1HL).

Cet exemple d'image IRM pondérée T_2 a permis de contrôler le bon positionnement de la micro-antenne RMN implantable, c'est-à-dire dans le cortex somatosensoriel primaire (S1HF), et l'absence d'hémorragie causée par la rupture de vaisseaux sanguins lors de l'implantation.

La **figure 4.13** présente un spectre RMN ^1H *in vivo* représentatif du tissu cérébral de rat sain acquis avec la micro-antenne RMN implantable ayant un volume de détection de $1 \mu\text{L}$.

Les pré-traitements effectués pour cet exemple de spectre RMN ont été la correction de la phase, la suppression du signal résiduel de l'eau et une apodisation lorentzienne avec une constante d'apodisation de 5 Hz.

L'identification spectrale des métabolites cérébraux réalisée en fonction des caractéristiques énumérées dans les travaux de [Govindaraju *et al.* \(2000\)](#) a permis de distinguer les signaux de résonance suivants : tCho (choline totale = phosphorylcholine (PCho) + choline libre (Cho)), tCr (créatine totale = phosphocréatine (PCr) + créatine (Cr)), tNAA (N-acétylaspartate total = N-acétylaspartate (NAA) + N-acétylaspartylglutamate (NAAG)), Gln (glutamine), Glu (glutamate), mI (myo-inositol), Tau (taurine), Lac (lactate), Glx (complexe glutamine (Gln) + glutamate (Glu)) et MM (macromolécules).

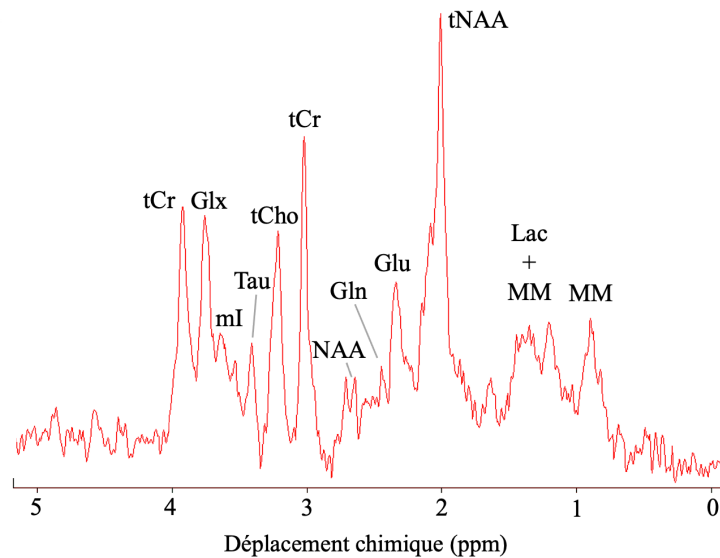


Figure 4.13. Spectre RMN ^1H *in vivo* représentatif du tissu cérébral de rat sain acquis avec la micro-antenne RMN à 7 T et en utilisant une séquence de spectroscopie PRESS (TR/TE = 2000/15.266 ms, 256 accumulations, durée de l'acquisition = 8 min 32 s) après une étape de pré-traitements effectuée par jMRUI (correction de la phase, suppression du signal résiduel de l'eau et apodisation lorentzienne de 5 Hz). Signaux : tCho : choline totale, tCr : créatine totale, tNAA : NAA total, Tau : taurine, mI : myo-inositol, Glx : complexe glutamine (Gln) + glutamate (Glu), Lac : lactate, MM : macromolécules.

Étude de la qualité spectrale des spectres RMN ^1H *in vivo* acquis avec les micro-antennes RMN implantables

12 spectres RMN ^1H *in vivo* du tissu cérébral de rats sains ont pu être acquis et analysés.

Sur les 20 rats sains initialement prévus, 8 ont été exclus de l'étude pour les raisons suivantes : décollement de la canule avant l'expérience (3 animaux), hémorragie lors du retrait du bouchon de la canule (2 animaux), présence de sang suite à l'implantation de la micro-antenne RMN impactant fortement la qualité spectrale (3 animaux).

Les valeurs moyennes des FWMHs et des RSBs et les écarts-types associés de 5 résonances (tNAA - 2.01 ppm, tCr - 3.03 ppm, tCho - 3.20 ppm, Glx - 3.74 ppm, tCr - 3.91 ppm) des 12 spectres RMN acquis avec les micro-antennes RMN implantables sont données dans le **tableau 4.1**.

Tableau 4.1 – Valeurs moyennes et écarts-types des FWHMs et des RSBs des 5 résonances (tNAA, tCr, tCho et Glx).

	FWHM +/- écart-type [Hz]	RSB +/- écart-type
tNAA - 2.01 ppm	16 +/- 2	28 +/- 6
tCr - 3.03 ppm	15 +/- 1	20 +/- 3
tCho - 3.20 ppm	25 +/- 3	14 +/- 4
Glx - 3.74 ppm	19 +/- 2	18 +/- 5
tCr - 3.91 ppm	17 +/- 2	17 +/- 3

A titre de comparaison, 5 spectres RMN ^1H *in vivo* du tissu cérébral de rats sains ont été acquis avec les antennes conventionnelles externes (l'antenne volumique en quadrature a été utilisée en émission RF et l'antenne surfacique en réseau phasé 2×2 éléments en réception RF) et avec les mêmes paramètres d'acquisitions (séquence PRESS, TR/TE = 2000/15.266 ms, 256 accumulations, durée de l'acquisition = 8 min 32 s).

Les valeurs moyennes des FWHMs étaient alors de 21 +/- 4 Hz, 20 +/- 2 Hz, 27 +/- 3 Hz, 20 +/- 2 Hz et 20 +/- 3 Hz pour les résonances de tNAA (2.01 ppm), de tCr (3.03 ppm), de tCho (3.20 ppm), de Glx (3.74 ppm) et de tCr (3.91 ppm), respectivement.

Un histogramme comparatif des valeurs moyennes des FWHMs obtenues lors des acquisitions spectroscopiques effectuées avec l'antenne surfacique conventionnelle externe en réception RF et lors des acquisitions spectroscopiques effectuées avec les micro-antennes RMN implantables en réception RF est présenté ci-dessous.

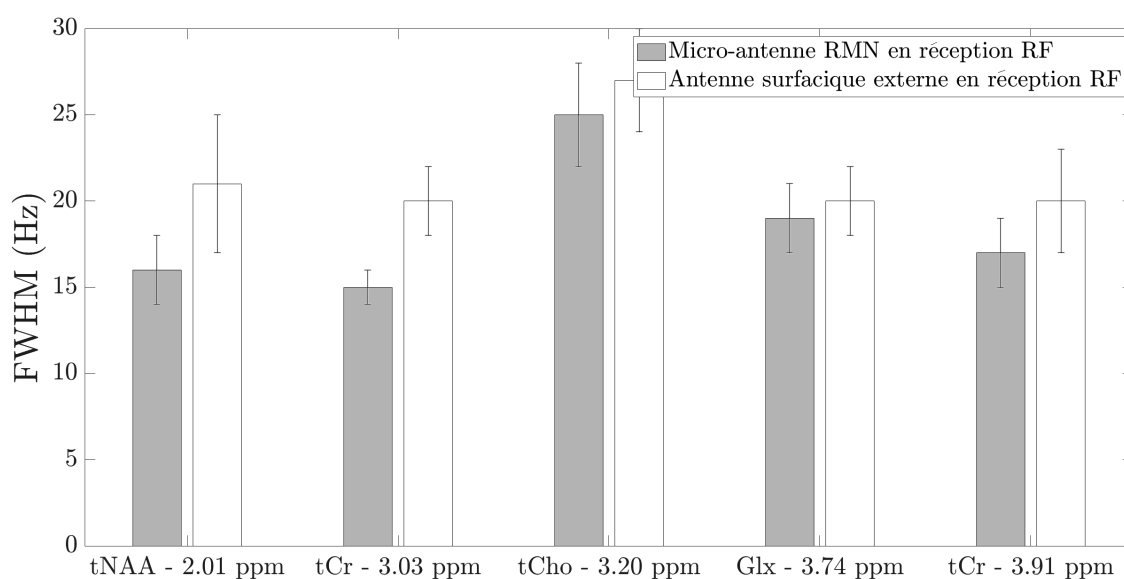


Figure 4.14. Valeurs moyennes et écarts-types associés des FWHMs des 5 résonances pour des acquisitions effectuées avec l'antenne surfacique externe ($n = 5$, barres blanches) et pour des acquisitions effectuées avec les micro-antennes RMN implantées ($n = 12$, barres grises).

Nous avons alors observé une légère amélioration des valeurs moyennes des FWHMs des 5 résonances (tNAA, tCr, tCho et Glx) lors des acquisitions spectroscopiques effectuées avec les micro-antennes RMN implantables. Cette amélioration a pu probablement s'expliquer par le plus petit volume de détection de ces dernières et donc par des inhomogénéités de champ magnétique réduites.

L'obtention de ces valeurs de FWHMs a aussi permis de mettre en évidence l'absence de distorsions du champ magnétique induites par les différences de susceptibilité magnétique entre le cuivre, matériau constitutif des micro-antennes RMN implantables, et le tissu cérébral pouvant alors entraîner un élargissement des résonances (cf. **paragraphe 3.1.2**).

Ainsi, nous en avons conclu que les spectres RMN ^1H *in vivo* acquis avec les micro-antennes RMN implantables possédaient une qualité spectrale tout à fait similaire à celle pouvant être obtenue lors de l'utilisation d'antennes conventionnelles externes.

Étude de la reproductibilité et de la fiabilité des mesures spectroscopiques *in vivo* effectuées avec les micro-antennes RMN implantables

Les 12 spectres RMN ^1H *in vivo* du tissu cérébral de rats sains ont ensuite été quantifiés par le logiciel jMRUI et en suivant les étapes décrites dans le **paragraphe 4.2.4.2**. Une estimation de la concentration a été considérée comme pertinente lorsque la CRLB était inférieure à 20%. En appliquant ce critère, seuls le lactate et le NAAG ont été exclus des résultats de la quantification. Ils possédaient, en effet, pour certains animaux, une CRLB supérieure à 50%.

Les valeurs estimées des concentrations des métabolites ont été établies proportionnellement à la concentration de la créatine totale (tCr = PCr + Cr) utilisée comme référence interne avec une valeur de 8.5 mmol/kg_{ww} [Tkáč *et al.* (2003)].

La figure suivante présente les valeurs moyennes et les écarts-types associés des estimations pertinentes des concentrations des différents métabolites (Cho, Cr, Glu, Gln, mI, NAA, PCr, PCho, et Tau) obtenues par la procédure Subtract-QUEST à partir des données spectroscopiques des 12 rats. A ce stade d'analyse, les écarts-types ont pu alors révéler certains biais de quantification introduits par la faible différence de qualité spectrale des divers spectres RMN et des différences métaboliques interindividuelles.

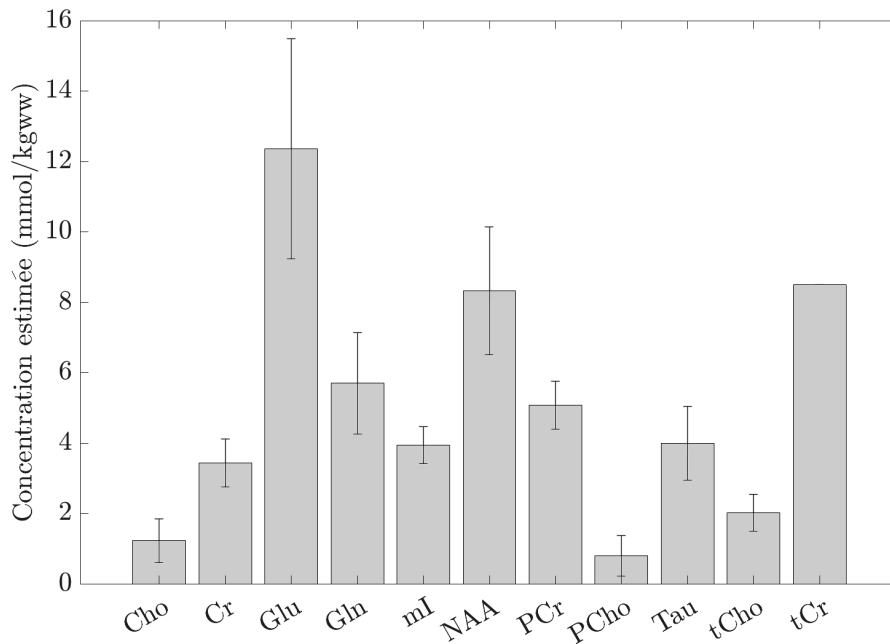


Figure 4.15. Valeurs moyennes et écarts-types associés des estimations des concentrations des différents métabolites obtenues par la procédure Subtract-QUEST du logiciel jMRUI à partir des données spectroscopiques des 12 rats sains. La créatine totale ($tCr = PCr + Cr$) a été utilisée comme référence et ne comporte donc pas d'écart-type.

Nous avons pu remarquer que la grande majorité des écarts-types étaient relativement faibles indiquant une bonne homogénéité et donc une bonne reproductibilité des estimations des concentrations des différents métabolites cérébraux obtenues à la suite des acquisitions spectroscopiques *in vivo* effectuées avec les micro-antennes RMN implantables. Cependant, nous avons également remarqué que les écarts-types des estimations des concentrations de Cho et de PCho étaient relativement importantes par rapport à la moyenne de ces deux estimations. Cela a pu s'expliquer par la superposition de ces deux résonances avec celle de la taurine et des biais d'identification et de quantification spectrales alors introduits.

De plus, afin d'évaluer le maintien de l'intégrité du tissu cérébral suite à l'implantation de la micro-antenne RMN, nous avons choisi de comparer les valeurs précédemment obtenues avec les micro-antennes RMN avec celles obtenues avec des antennes conventionnelles externes dans les travaux de [Doblas *et al.* \(2012\)](#). Les plages des valeurs des concentrations des métabolites cérébraux chez le petit animal couramment indiquées dans la littérature figurent également dans le tableau ci-dessous [[De Graaf \(1998\)](#)]. L'estimation de la concentration du lactate (Lac), bien que classée non pertinente par le critère des CRLBs, a été rajoutée dans le tableau suivant.

Tableau 4.2 – Valeurs moyennes et écarts-types associés des estimations des concentrations des métabolites cérébraux chez des rats sains et valeurs obtenues dans la littérature (mmol/kg_{ww}).

Métabolite	Étude	Littérature	Plage de valeurs
		Doblas <i>et al.</i> (2012)	De Graaf (1998)
tCr	8.5 +/- 0.0	7.5 +/- 0.7	4.2 - 10.2
NAA	8.3 +/- 1.8	5.7 +/- 1.1	7.8 - 12
tCho	2.0 +/- 0.5	1.6 +/- 0.1	0.2 - 2.2
mI	3.9 +/- 0.5	4.6 +/- 1.5	4.0 - 9.0
Gln	5.7 +/- 1.4	4.9 +/- 1.9	3.0 - 6.0
Glu	12.3 +/- 3.1	11.5 +/- 1.3	6.0 - 12.2
Tau	4.0 +/- 1.0	7.6 +/- 1.3	3.0 - 6.0
Lac	0.6 +/- 0.7	0.0 +/- 0.0	0.1 - 1.0

Nous avons alors constaté que les estimations des concentrations des principaux métabolites cérébraux obtenues suite à des acquisitions spectroscopiques *in vivo* effectuées avec les micro-antennes RMN implantables étaient en accord avec les estimations obtenues suite à des acquisitions spectroscopiques *in vivo* réalisées avec des antennes conventionnelles externes et rapportées dans la littérature.

Cela a ainsi démontré que le métabolisme et la fonctionnalité du tissu cérébral sain analysé ont été maintenus après l'implantation de la micro-antenne RMN confirmant son aspect invasif à minima.

Le délai relativement rapide (de l'ordre d'une heure) entre l'implantation de la micro-antenne RMN dans le tissu cérébral d'intérêt et l'acquisition des données spectroscopiques *in vivo* a permis de s'affranchir de l'observation des modifications métaboliques causées par la réponse biologique cérébrale.

Quelques études, portant notamment sur l'analyse de la réponse tissulaire suite à une implantation chronique de différents dispositifs [Szarowski *et al.* (2003); Biran *et al.* (2005); Winslow & Tresco (2009)], ont explicité les différentes phases constitutives de la réponse biologique. Ces dernières sont l'hémostase, l'inflammation, la cicatrisation et la reconstruction tissulaire. Il a également été rapporté qu'il est nécessaire de toujours différencier les processus à court terme et ceux à long terme dans l'évaluation de la réponse tissulaire suite à une implantation.

Dans notre cas, seuls les processus à court terme ont pu intervenir lors de l'acquisition des données de SRM ¹H *in vivo* avec les micro-antennes RMN implantables. Le principal effet à court terme de l'implantation de la micro-antenne RMN dans le tissu cérébral a été l'hémostase. Cette phase a, en effet, débuté dès que la micro-antenne RMN a été insé-

rée dans le tissu cérébral causant une rupture de la BHE et de quelques petits vaisseaux sanguins. L'hémostase possède une durée comprise entre quelques secondes et plusieurs heures et est caractérisée par la libération de sérum et de cellules sanguines. La phase inflammatoire, qui se déclenche plusieurs heures après l'implantation et par la libération de signaux inflammatoires et qui est notamment caractérisée par une augmentation de la résonance des composés à choline (tCho) et de la résonance du lactate (Lac), n'a pas été observée.

Il est également important de souligner que même avec une micro-antenne RMN implantée durant une période beaucoup plus longue que celle utilisée lors des expériences RMN de cette étude, le phénomène de cicatrisation et plus particulièrement la présence d'une cicatrice gliale ne serait pas rédhibitoire comme cela peut être le cas lors de l'utilisation de membranes de microdialyse [Hascup *et al.* (2009)]. En effet, le volume de détection des micro-antennes RMN, estimé dans le **chapitre 3**, s'étend jusqu'à une certaine distance du fil de cuivre (quelques centaines de micromètres) où les tissus sont donc moins susceptibles d'être impactés par l'implantation de la micro-antenne RMN.

Ainsi, cette première partie, réalisée sur des cerveaux d'animaux sains, a permis d'évaluer la faisabilité et le potentiel des micro-antennes RMN implantables dans l'acquisition de données spectroscopiques *in vivo* sur des échantillons ayant un volume de l'ordre du microlitre.

La fiabilité et la reproductibilité des données de SRM obtenues avec les micro-antennes RMN implantées ont pu témoigner de leur caractère mini-invasif et du maintien de l'intégrité du tissu cérébral exploré après l'implantation et ouvre la porte à d'autres applications *in vivo* comme l'étude de diverses pathologies cérébrales telles que les tumeurs.

4.3.2 Différenciations métaboliques et morphologiques entre le tissu cérébral sain et le tissu cérébral tumoral

Suite à la précédente étude ayant permis d'évaluer la bonne reproductibilité et la bonne fiabilité des mesures spectroscopiques *in vivo* obtenues avec les micro-antennes RMN implantées uniquement sur des cerveaux de rats sains, nous avons choisi d'analyser la capacité de ces dernières à différencier un tissu cérébral sain d'un tissu cérébral tumoral sur des échantillons de faible volume.

Pour cela, des mesures spectroscopiques *in vivo* de cerveaux de rats porteurs d'un gliome C6 ont été effectuées avec les micro-antennes RMN et traitées en suivant le protocole décrit dans le **paragraphe 4.2**.

Une comparaison morphologique a également été réalisée suite à l'obtention d'images IRM anatomiques à haute résolution spatiale avec les micro-antennes RMN implantées chez des rats sains et chez des rats porteurs d'un gliome C6.

Sur les 15 rats pathologiques initialement souhaités, 7 rats ont été exclus de l'étude pour les raisons suivantes : absence de développement tumoral (6 animaux) et troubles de la locomotion (1 animal).

Le volume moyen des tumeurs cérébrales des 8 rats de l'étude était d'environ 94 ± 26 mm³. Les volumes tumoraux ont été obtenus en comptant le nombre de pixels contenus dans le volume de la région d'intérêt de la tumeur sur les images anatomiques pondérées T₂ et en multipliant le tout par le volume d'un pixel. Ces images anatomiques pondérées T₂ ont été acquises 16 jours après l'injection des cellules C6 correspondant au jour de l'implantation de la micro-antenne pour les acquisitions RMN (cf. **paragraphe 4.2.1.3**).

Différenciations métaboliques entre le tissu cérébral sain et le tissu cérébral tumoral

La **figure 4.16** présente un exemple de spectre RMN ¹H *in vivo* représentatif du tissu d'un gliome C6 acquis avec la micro-antenne RMN ayant un volume de détection de 1 µL. Les pré-traitements effectués pour cet exemple de spectre ont été la correction de la phase, la suppression du signal résiduel de l'eau et une apodisation lorentzienne avec une constante d'apodisation de 5 Hz.

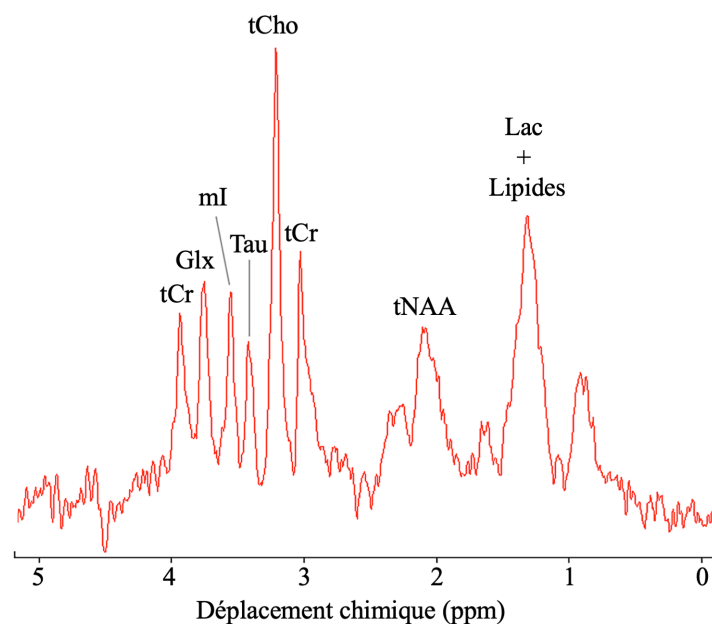


Figure 4.16. Spectre RMN ¹H *in vivo* représentatif du tissu d'un gliome C6 acquis avec la micro-antenne RMN à 7 T et en utilisant une séquence de spectroscopie PRESS (TR/TE = 2000/15.266 ms, 256 accumulations, durée de l'acquisition = 8 min 32 s) après une étape de pré-traitements effectuée par jMRUI (correction de la phase, suppression du signal résiduel de l'eau et apodisation lorentzienne de 5 Hz). Signaux : tCho : choline totale, tCr : créatine totale, tNAA : NAA total, Tau : taurine, mI : myo-inositol, Glx : glutamine + glutamate, Lac : lactate.

Les valeurs moyennes des FWHMs et des RSBs des différents spectres RMN du tissu tumoral acquis sur les 8 rats pathologiques inclus dans cette étude étaient de 19 ± 3 Hz et 18 ± 2 , de 18 ± 2 Hz et 31 ± 5 , de 19 ± 3 Hz et 16 ± 2 , et 21 ± 2 Hz et 17

+/-2, pour les résonances de tCr (3.03 ppm), de tCho (3.20 ppm), de Glx (3.74 ppm) et de tCr (3.91 ppm), respectivement.

Une comparaison qualitative du spectre typique ^1H *in vivo* du tissu cérébral de rat sain (**figure 4.13**) et du spectre typique ^1H *in vivo* du tissu d'un gliome C6 (**figure 4.16**), dont la superposition est illustrée à la **figure 4.17**, a alors montré des différences entre le profil métabolique du tissu cérébral sain et le profil métabolique du tissu cérébral tumoral. En effet, en présence d'un gliome C6, nous avons pu remarquer :

- une importante augmentation de l'amplitude du signal de résonance de la choline totale (tCho) ;
- une importante augmentation de l'amplitude du signal de résonance du complexe lipides + lactate (Lac) ;
- une importante augmentation de l'amplitude du signal de résonance du myo-inositol (mI) ;
- une importante diminution de l'amplitude du signal de résonance du N-acétylaspartate total (tNAA) ;
- une faible diminution de l'amplitude du signal de résonance de la créatine totale (tCr) ;
- une augmentation de l'amplitude du signal de résonance de la taurine (Tau) ;
- et, une augmentation de l'amplitude du signal de résonance du complexe glutamine + glutamate (Glx).

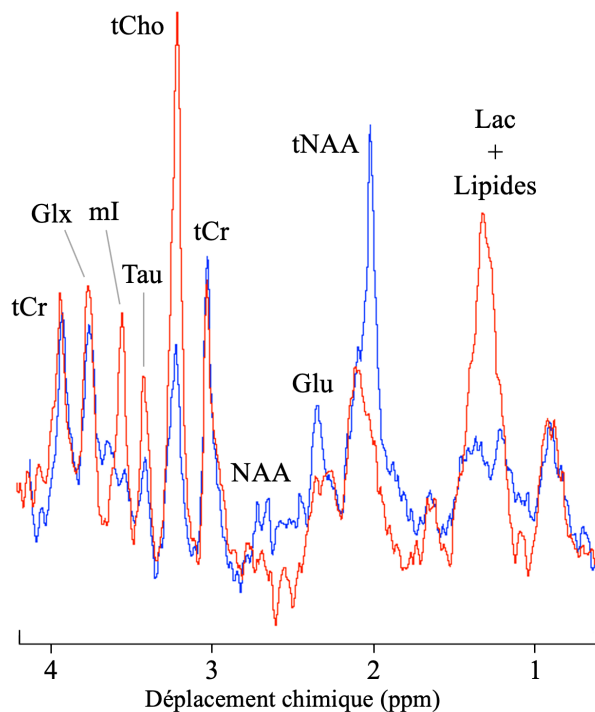


Figure 4.17. Superposition du spectre RMN ^1H *in vivo* typique du tissu cérébral sain (en bleu) et du spectre RMN ^1H *in vivo* typique du tissu cérébral tumoral (en rouge). Les deux spectres RMN ont été acquis avec les micro-antennes RMN implantables (volume de détection = 1 μL). Signaux : tCho : choline totale, tCr : créatine totale, tNAA : NAA total, Tau : taurine, mI : myo-inositol, Glx : glutamine + glutamate, Lac : lactate.

Quelques-unes de ces premières observations spectrales étaient en accord avec celles rapportées dans la littérature et notamment dans les travaux de [Coquery *et al.* \(2015\)](#) sur le modèle du gliome C6.

Certains métabolites précédemment cités ci-dessus représentent, en effet, par leurs fonctions et rôles initiaux, des biomarqueurs caractéristiques d'un développement tumoral. Une diminution de la concentration de tNAA, principal marqueur neuronal [[Barker \(2001\)](#)], est généralement interprétée comme une perte ou un dysfonctionnement du tissu neuronal sain [[Vuori *et al.* \(2004\)](#)], phénomène classiquement observé dans les pathologies tumorales.

Une augmentation de la concentration des différents composés à choline (représentés par l'abréviation tCho), impliqués dans la synthèse et la dégradation de la membrane, est connue pour être un témoin de l'augmentation de la synthèse et du renouvellement membranaire pendant la prolifération cellulaire. Il a également été constaté que la concentration de tCho était proportionnelle à la densité cellulaire de la tumeur [[Gupta *et al.* \(2001\)](#)] et au degré d'infiltration de cette dernière dans le parenchyme cérébral sain [[Croteau *et al.* \(2001\)](#)].

Une augmentation de la concentration des lipides et du lactate donnant lieu à une résonance importante autour de 1.3 ppm est relativement courante en présence d'une tumeur cérébrale. L'augmentation de la concentration du lactate est très probablement le résultat d'une glycolyse anaérobie [[Barker \(2001\)](#)], bien qu'elle puisse également être causée par une ischémie due à un flux sanguin insuffisant ou à la présence d'une nécrose tumorale. L'observation d'une augmentation de la concentration des lipides est, quant à elle, associée à la nécrose et à la dégradation des membranes cellulaires constituées principalement de phospholipides [[Howe *et al.* \(2003\)](#)].

Une augmentation de la concentration du myo-inositol (mI) reflète la présence d'une prolifération gliale. Les cellules gliales contiennent, en effet, des niveaux élevés de mI. La concentration de mI serait principalement élevée dans les gliomes de grade II [[Castillo *et al.* \(2000\)](#)].

Et, enfin, malgré le fait que la créatine soit souvent définie comme référence du fait de sa concentration relativement stable, certaines études ont fait part d'une faible diminution de la concentration de cette dernière dans certains types de tumeurs cérébrales. Une diminution de la créatine est souvent associée à une hypoxie et au caractère malin de la tumeur. [[Papanagiotou *et al.* \(2007\)](#)]

Les 8 spectres RMN ^1H *in vivo* du tissu cérébral de rats porteurs d'un gliome C6 ont ensuite été quantifiés par le logiciel jMRUI et en suivant les étapes décrites dans le **paragraphe 4.2.4.2**.

Une estimation de la concentration a été considérée comme pertinente lorsque la CRLB était inférieure à 20%. En appliquant ce critère, les estimations des concentrations de NAA

et de NAAG ont été exclues des résultats de la quantification. Elles possédaient, en effet, pour certains animaux, une CRLB supérieure à 50%. Cela peut notamment s'expliquer par la forte diminution de l'amplitude du signal de résonance de tNAA entraînant un élargissement de la résonance et ainsi des imprécisions sur l'identification et la quantification spectrales.

Les valeurs estimées des concentrations des métabolites ont été établies proportionnellement à l'amplitude du signal de résonance de la créatine totale ($tCr = PCr + Cr$) utilisée comme référence interne avec une valeur de 8.5 mmol/kg_{ww} dans les expériences spectroscopiques effectuées sur le tissu sain. Cela a pu être réalisé car le RSB (environ 2000) du signal de l'eau non supprimé obtenu suite à des acquisitions de SRM avec les micro-antennes RMN implantables était quasiment similaire pour l'ensemble des spectres RMN du tissu cérébral sain et des spectres RMN du tissu cérébral tumoral.

La figure suivante présente les valeurs moyennes et les écarts-types associés des estimations pertinentes des concentrations des différents métabolites (Glu, Gln, Lac, mI, Tau, tCho et tCr) obtenues par la procédure Subtract-QUEST à partir des données spectroscopiques *in vivo* des 8 rats porteurs d'un gliome C6. Les écarts-types ont alors pu révéler les différences du stade de développement tumoral de chaque rat pathologique et l'hétérogénéité des gliomes C6.

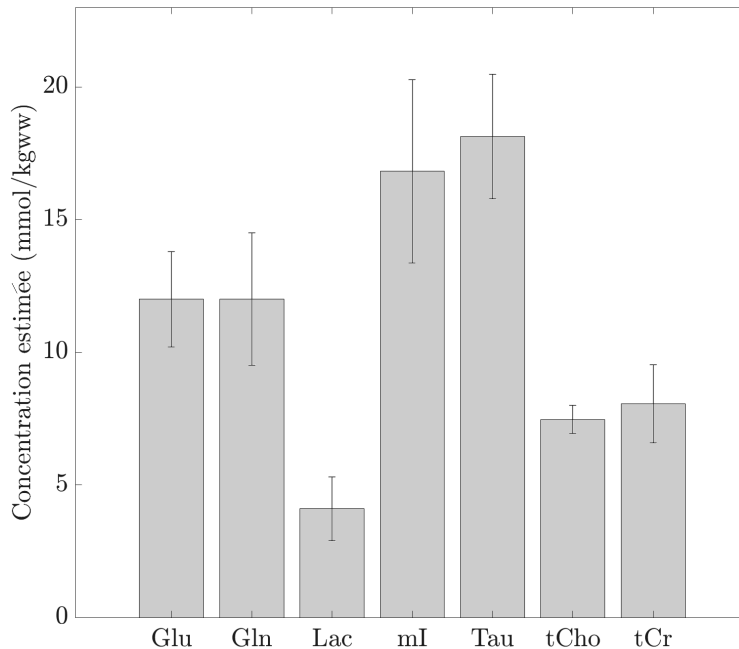


Figure 4.18. Valeurs moyennes et écarts-types associés des estimations des concentrations des différents métabolites obtenues par la procédure Subtract-QUEST du logiciel jMRUI à partir des données spectroscopiques *in vivo* des 8 rats porteurs d'un gliome C6.

Le tableau suivant présente la comparaison des valeurs précédemment obtenues avec les micro-antennes RMN avec celles obtenues avec des antennes conventionnelles externes

dans les travaux de [Doblas *et al.* \(2012\)](#). L'estimation de la concentration de NAA, bien que classée non pertinente par le critère des CRLBs, a été rajoutée dans le tableau suivant.

Tableau 4.3 – Valeurs moyennes et écarts-types associés des estimations des concentrations des métabolites cérébraux chez des rats porteurs d'un gliome C6 et valeurs obtenues dans la littérature (mmol/kg_{ww}).

Métabolite	Étude	Littérature Doblas <i>et al.</i> (2012)
tCr	8.1 +/- 1.5	4.0 +/- 1.0
NAA	2.3 +/- 3.1	1.3 +/- 1.6
tCho	7.5 +/- 0.5	2.1 +/- 1.0
mI	16.8 +/- 3.5	9.9 +/- 4.5
Gln	12.0 +/- 2.5	9.6 +/- 6.2
Glu	12.0 +/- 1.8	10.6 +/- 5.6
Tau	18.1 +/- 2.3	6.7 +/- 1.8
Lac	4.1 +/- 1.2	6.9 +/- 7.1

Les valeurs obtenues dans notre étude et dans celle de [Doblas *et al.* \(2012\)](#) ont été assez différentes bien que la plupart des tendances des variations métaboliques observées entre un tissu sain et un tissu tumoral aient été similaires.

En effet, dans les deux cas, nous avons observé, en présence d'un gliome C6, une diminution de l'estimation des concentrations de NAA, de Glu et de tCr et une augmentation de l'estimation des concentrations de tCho, de mI, de Gln et de Lac.

L'unique différence des tendances de variations a été sur l'estimation de la concentration de la taurine (Tau). Nous avons, en effet, constaté, en présence d'un gliome C6, une forte augmentation de l'estimation de la concentration de Tau (18.1 +/- 2.3 mmol/kg_{ww} pour le tissu cérébral tumoral et 4.0 +/- 1.0 mmol/kg_{ww} pour le tissu cérébral sain) malgré une diminution de cette concentration rapportée dans la littérature [[Doblas *et al.* \(2012\)](#); [Coquery *et al.* \(2015\)](#)]. Bien que les précédentes études aient fait part d'une diminution de la concentration de Tau en présence d'un gliome C6, une élévation de cette dernière pourrait être liée à l'augmentation du tissu vasculaire au coeur de la tumeur ou à son rôle protecteur en tant qu'osmorégulateur face à une agression [[Oja & Saransaari \(1996\)](#)] notamment face à une prolifération cellulaire tumorale accrue [[Cubillos *et al.* \(2006\)](#)]. Différents travaux ont également montré qu'une élévation de la taurine avaient lieu dans des types de tumeurs cérébrales bien particuliers tels que les médulloblastomes, les rétinoblastomes ou encore les tumeurs neuroectodermiques primitives [[Moreno-Torres *et al.* \(2004\)](#); [Verma *et al.* \(2016\)](#)].

De plus, certains rapports de métabolites sont parfois utilisés lors d'études portant sur

l'ensemble des pathologies cérébrales. Ils permettent, d'une part, de s'affranchir des limitations de la quantification relative et, d'autre part, de mettre précisément en évidence la tendance des variations métaboliques observées entre un tissu sain et un tissu pathologique. Il s'agit principalement des rapports suivants : tCho/tCr, tNAA/tCr et tCho/tNAA. D'autres rapports tels que mI/tCr et Glx/tCr peuvent aussi être étudiés. Pour rappel, l'abréviation Glx représente la somme du glutamate (Glu) et de la glutamine (Gln).

En oncologie, par exemple, ces rapports peuvent avoir un rôle fondamental dans la différenciation des tumeurs cérébrales [Fan *et al.* (2004)] et dans l'évaluation du grade tumoral [Bulik *et al.* (2012)] et sont donc couramment utilisés.

Les précédents rapports ont alors été évalués à partir des amplitudes des résonances spectrales des métabolites obtenues avec les micro-antennes RMN implantables sur les 12 animaux sains et sur les 8 animaux porteurs d'un gliome C6 inclus dans cette étude. Les différentes amplitudes des résonances ont été relevées par le logiciel TopSpin.

La **figure 4.16** présente les valeurs moyennes et les écarts-types correspondants des rapports suivants : tCho/tCr, tNAA/tCr, tCho/tNAA, mI/tCr et Glx/tCr, obtenus chez des animaux sains et chez des animaux pathologiques.

Un test-*t* non apparié a été effectué, avec le logiciel de statistiques R, pour la comparaison des différents rapports des métabolites entre les rats sains et les rats porteurs d'un gliome C6 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

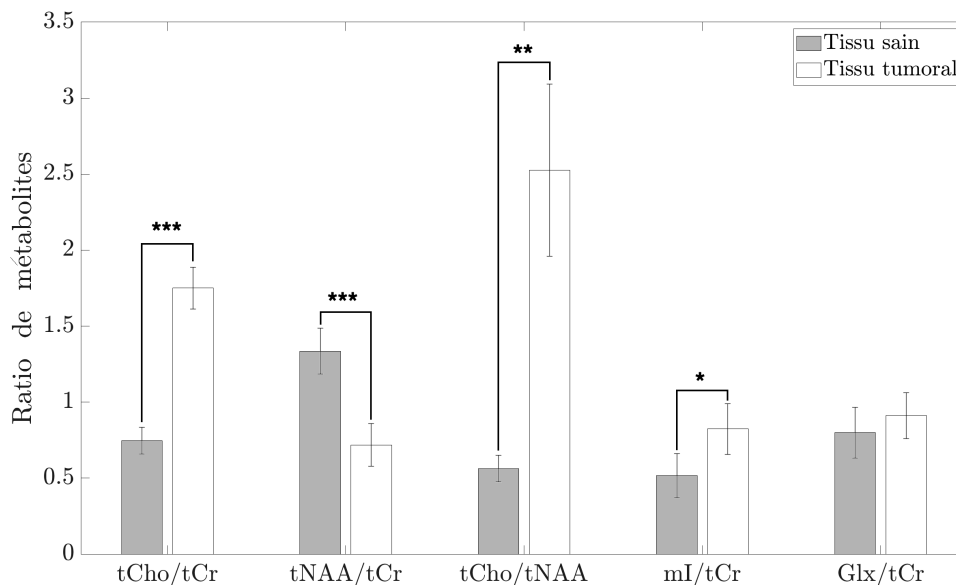


Figure 4.19. Valeurs moyennes et écarts-types associés des différents ratios de métabolites (tCho/tCr, tNAA/tCr, tCho/tNAA, mI/tCr et Glx/tCr) obtenus chez des rats sains ($n = 12$, barres grises) et chez des rats porteurs d'un gliome C6 ($n = 8$, barres blanches) suite à des acquisitions effectuées avec les micro-antennes RMN implantables (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

En présence du gliome C6, nous avons pu, dès lors, constater des augmentations significatives du rapport tCho/tCr ($p < 0.001$), du rapport tCho/tNAA ($p < 0.001$) et du rapport mI/tCr ($p < 0.05$). Une diminution significative du rapport tNAA/tCr a également été observée ($p < 0.001$).

L'évolution quantitative de ces différents rapports ont témoigné des précédentes observations spectrales et métaboliques obtenues en présence du tissu cérébral tumoral, c'est-à-dire, une augmentation accrue du niveau de tCho et une diminution accrue du niveau de tNAA. Une faible diminution du niveau de tCr et une augmentation plus importante du niveau de mI ont témoigné de la légère augmentation significative ($p < 0.05$) du rapport mI/tCr. La faible augmentation moyenne non significative du rapport Glx a pu s'expliquer par l'augmentation notable de l'estimation de Gln (5.7 ± 1.4 mmol/kg_{ww} pour un tissu cérébral sain et 12.0 ± 2.5 mmol/kg_{ww} pour un tissu cérébral tumoral) et par les diminutions relativement faibles des estimations de Glu et de tCr.

Différenciations morphologiques entre le tissu cérébral sain et le tissu cérébral tumoral

En plus des différences métaboliques entre le tissu cérébral sain et le tissu cérébral tumoral, nous avons souhaité étudier les différences morphologiques potentiellement accessibles par l'utilisation des micro-antennes RMN implantables.

Pour cela, des images pondérées T_1 haute-résolution ont été acquises avec les micro-antennes RMN implantées dans le cortex des rats sains et dans le gliome C6 des rats pathologiques et par l'utilisation d'une séquence FLASH dont les paramètres ont été précisés dans le **paragraphe 4.2.3**.

Trois coupes de l'image IRM sagittale pondérée T_1 acquise avec la micro-antenne RMN implantée du tissu cérébral sain sont affichées à la **figure 4.20**.

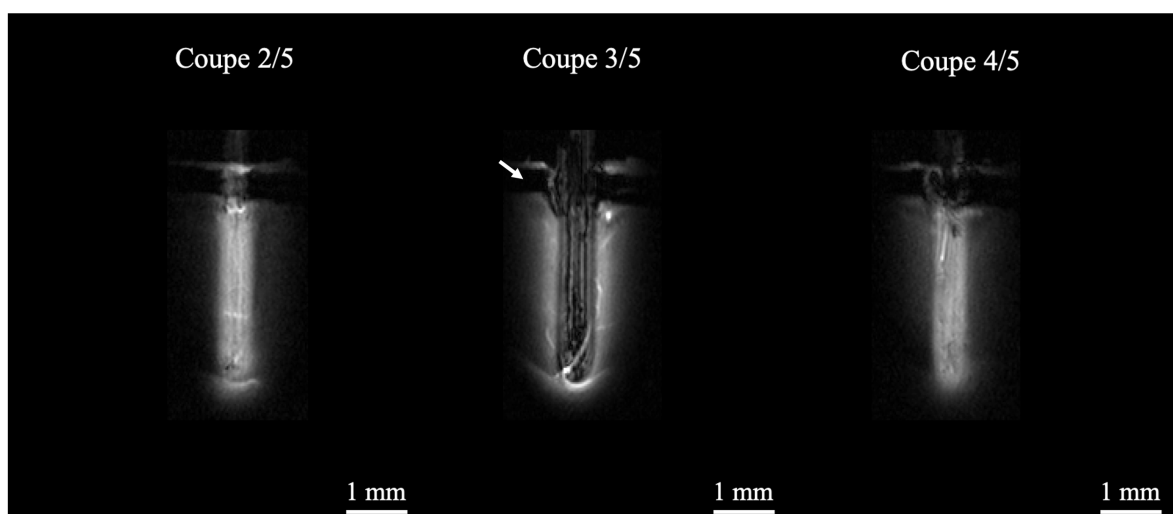


Figure 4.20. Image IRM sagittale pondérée T_1 acquise avec la micro-antenne RMN du tissu cérébral sain. La résolution spatiale était de $33 \times 33 \times 500 \mu\text{m}^3$. La flèche indique la présence de l'os crânien en hyposignal.

Nous avons pu visualiser différentes structures. L'os crânien notamment, est apparu en hyposignal (désigné par la flèche) et le cortex cérébral sain a semblé être une structure relativement homogène avec la présence de quelques petits vaisseaux apparaissant en hypersignal. La structure en hypersignal présente au bout de la boucle de détection de la micro-antenne RMN et observable sur les coupes n°2 et n°3 a été identifiée comme étant le corps calleux. Il est, en effet, parfois arrivé que la boucle de détection d'une longueur de 3 mm soit au contact avec le corps calleux. La profondeur de l'implantation de la micro-antenne RMN implantable a pu être impactée par les incertitudes introduites par les faibles variations de l'épaisseur de l'os crânien entre les différents rats inclus dans l'étude.

La **figure 4.21** représente trois coupes de l'image IRM sagittale pondérée T_1 acquise avec la micro-antenne RMN implantée du gliome C6.

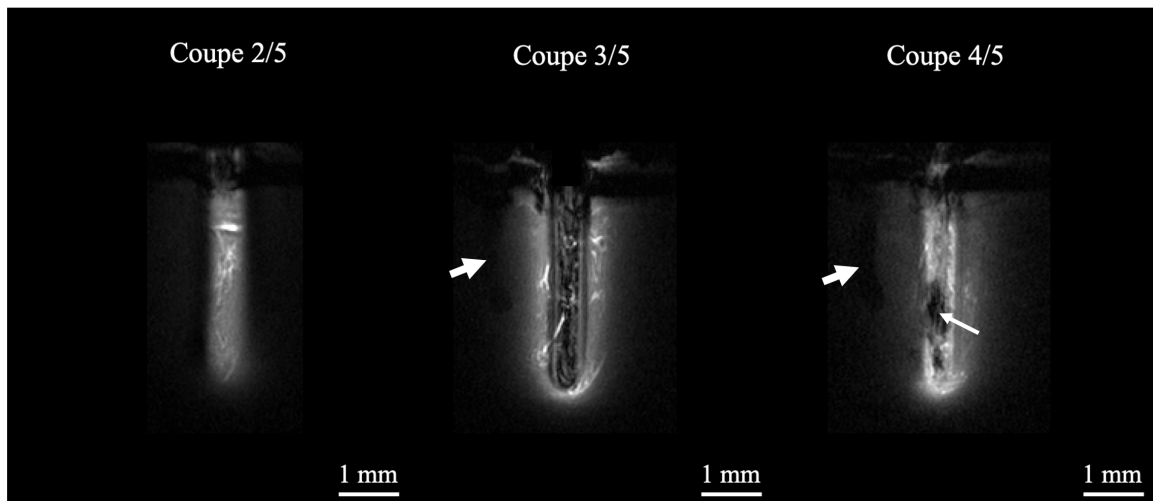


Figure 4.21. Image IRM sagittale pondérée T_1 acquise avec la micro-antenne RMN du gliome C6. La résolution spatiale était de $33 \times 33 \times 500 \mu\text{m}^3$. La petite flèche indique la présence d'une structure en hyposignal observable uniquement sur l'image IRM du tissu cérébral tumoral et les deux grandes flèches indiquent la présence de la lésion causée par l'aiguille lors de l'injection des cellules tumorales C6.

Nous avons pu, en comparaison avec l'image IRM du tissu cérébral sain, observer la présence plus importante de structures en hypersignal et également la présence d'une structure en hyposignal observable sur la coupe n°4 (désignée par la petite flèche). Différentes hypothèses ont été émises sur l'identification de cette dernière. Tout d'abord, les gliomes C6 sont connus pour être un modèle de tumeurs cérébrales présentant une forte hétérogénéité morphologique [Perus & Walsh (2019)] avec notamment la présence de foyers nécrotiques qui peuvent alors apparaître en hyposignal sur des images pondérées T_1 . De plus, une hémorragie survenue lors de l'implantation de la micro-antenne RMN implantable dans le gliome C6 et causant la rupture de vaisseaux sanguins pourrait

également correspondre à cette structure en hyposignal. Cependant, lors du retrait de la micro-antenne RMN implantable, nous n'avons pas constaté la présence de sang ou de caillots sanguins au niveau de la boucle de détection rendant moins probable la seconde hypothèse d'une hémorragie causée lors de l'implantation de la micro-antenne RMN.

La lésion causée par l'aiguille utilisée lors de l'injection des cellules tumorales C6 a également été visible en hyposignal sur les coupes n°3 et n°4. Désignée par les deux grandes flèches sur l'image IRM de la figure précédente, elle est située à gauche de la micro-antenne RMN et est de forme courbée.

Afin de mettre en évidence la différence de proportion des structures apparaissant en hypersignal sur les images précédentes du tissu cérébral sain et sur les images précédentes du tissu cérébral tumoral, nous avons reconstruites ces dernières en utilisant l'algorithme MIP (pour *Maximal Intensity Projection*, en anglais).

Cet algorithme est principalement utilisé lors de la reconstruction d'images d'angiographie par résonance magnétique (ARM) [Persson *et al.* (2004)]. Il permet de réduire l'ensemble des données 3D en une image 2D en projetant dans le plan de visualisation les voxels d'intensité maximale.

L'algorithme MIP a permis d'obtenir une image 2D du tissu cérébral sain et une image 2D du tissu cérébral tumoral représentant la projection des pixels d'intensité maximale des 5 coupes des images IRM précédentes obtenues avec les micro-antennes RMN implantables ayant un volume de détection de 1 μL .

La **figure 4.22** illustre ces deux images MIP 2D du tissu cérébral sain et du tissu cérébral tumoral.

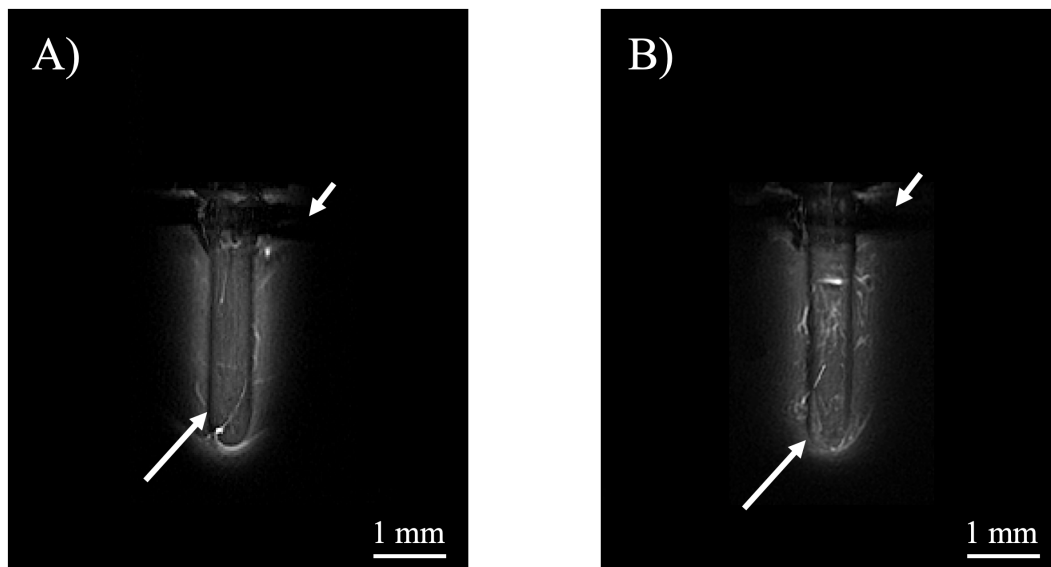


Figure 4.22. Images MIP 2D obtenues avec les micro-antennes RMN implantées (volume de détection = 1 μL) du tissu cérébral sain (A) et du tissu cérébral tumoral (B). Différentes zones en hyposignal sont visibles (os crânien (flèche courte) et fil de cuivre de la boucle de détection de la micro-antenne RMN (flèche longue)).

Nous avons pu, comme précédemment, constater la présence plus importante de structures ramifiées en hypersignal sur l'image 2D MIP du tissu cérébral tumoral.

Une hypothèse principale sur l'identification de ces dernières a été portée sur le processus de néoangiogenèse tumorale, mécanisme permettant le développement de néovaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. Ces derniers jouent un rôle fondamental dans le croissence tumorale en apportant l'oxygène et les nutriments essentiels et en éliminant les déchets métaboliques du micro-environnement tissulaire tumoral. Il a, en effet, été rapporté dans la littérature que les vaisseaux sanguins tumoraux ne suivent pas le modèle observé dans les tissus normaux mais forment alors un réseau de ramifications aléatoires avec une épaisseur et un diamètre réduits [Andleeb *et al.* (2021)].

Les mesures effectuées sur l'image 2D MIP du tissu tumoral ont révélé une architecture vasculaire avec des vaisseaux ayant des diamètres compris entre 60 μm et 100 μm environ confirmant l'observation que les vaisseaux angiogéniques sont essentiellement de petites artérioles.

Ainsi, dans cette seconde partie, nous avons pu valider la capacité des micro-antennes RMN implantables à distinguer un tissu cérébral sain d'un tissu cérébral tumoral. Le gain en sensibilité obtenu par l'utilisation des micro-antennes RMN a, en effet, facilité, à l'échelle submillimétrique, la détection des variations métaboliques caractéristiques du métabolisme tumoral et des différences morphologiques, en particulier, la néoangiogenèse tumorale, entre les deux tissus.

4.4 Conclusion et perspectives

En conclusion, cette étude a permis de prouver le bien-fondé de l'utilisation *in vivo* des micro-antennes RMN développées dans ces travaux chez le petit animal. Le juste équilibre entre le caractère mini-invasif et l'optimisation des performances électromagnétiques de ces dernières a, en effet, été à la base du potentiel *in vivo* des micro-antennes RMN implantables.

Une des principales motivations pour leur utilisation *in vivo* a été le gain en sensibilité par unité de volume obtenu et qui a ainsi pu faciliter l'étude métabolique et anatomique de régions cérébrales saines et tumorales sur des volumes de l'ordre du microlitre et par l'obtention de spectres RMN ^1H et d'images IRM de qualité suffisante.

Les résultats *in vivo* recueillis sur des cerveaux de rats sains ont montré qu'avec une durée d'acquisition de 8 min 32, durée compatible avec l'expérimentation animale, les résonances des principaux métabolites cérébraux tels que le NAA, la créatine, la choline, le glutamate, la taurine, la glutamine et le myo-inositol ont pu être détectées et quantifiées, de manière fiable et reproductible, dans le volume de détection ($= 1 \mu\text{L}$) des

micro-antennes RMN implantables. A cet égard, les similitudes entre les concentrations des métabolites cérébraux estimées à partir des spectres RMN acquis avec les micro-antennes RMN implantables et celles obtenues à partir des spectres RMN acquis avec des antennes conventionnelles externes et rapportées dans la littérature ont aussi démontré que l'implantation de la micro-antenne RMN n'impactait pas, sur la durée de l'expérience, le métabolisme et l'intégrité du tissu cérébral exploré.

Par la suite, nous avons pu mettre en évidence la capacité des micro-antennes RMN implantables à différencier, d'un point de vue métabolique et morphologique, un tissu cérébral sain d'un tissu cérébral tumoral. Le métabolisme tumoral, notamment caractérisé par une augmentation de la concentration de la choline, du myo-inositol et du complexe lipides+lactate et une diminution de la concentration du N-acétylaspartate et de la créatine, et l'aspect morphologique tumoral hétérogène, désigné par la présence d'une néoangiogenèse tumorale et de foyers nécrotiques, ont tous les deux été identifiables par les acquisitions effectuées avec les micro-antennes RMN. La possibilité de réaliser des expériences d'IRM et de SRM sur des échantillons biologiques de faible volume tels que les tumeurs ou les métastases pourrait donc permettre de s'affranchir d'une biopsie, un acte chirurgical largement utilisé en oncologie et plus dommageable pour l'intégrité du tissu.

Cette étude a ouvert la voie à différentes améliorations et perspectives pour diverses applications *in vivo* des micro-antennes RMN implantables chez le petit animal.

Tout d'abord, l'utilisation de fils de cuivre ayant un plus petit diamètre pourrait réduire la taille et donc le caractère invasif des micro-antennes RMN implantables, à condition de maintenir une rigidité suffisante et nécessaire à l'insertion dans le tissu d'intérêt exploré. De plus, la construction de micro-antennes RMN pouvant fonctionner à des champs magnétiques plus élevés (9.4 T et au-delà) permettrait d'augmenter la sensibilité de détection et la résolution spectrale dans les études de SRM.

En ce qui concerne les éventuelles pistes d'applications *in vivo*, l'utilisation de ces micro-antennes RMN implantables pourrait notamment être bénéfique pour la compréhension et la classification de diverses pathologies cérébrales telles que les maladies neurodégénératives ou les différents types de tumeurs cérébrales aux prémices de leurs développements et face à des lésions de très petite taille.

De plus, nous pouvons également envisager l'utilisation de ces micro-antennes RMN implantables pour d'autres types de tissus et donc de tumeurs tels que les sarcomes des tissus mous (tissu adipeux et muscles), par exemple.

Mais encore, par la capacité de ces micro-antennes RMN implantables à pouvoir faire de l'IRM et de la SRM à haute résolution, l'utilisation de ces dernières pourrait alors permettre de détecter et d'évaluer la réponse localisée métabolique (apoptose, nécrose, ...) et morphologique (nécrose, oedème, ...) tumorale lors du développement et d'essais de molécules thérapeutiques en pharmacologie.

Micro-antenne RMN implantable couplée à un moyen d'administration d'un composé d'intérêt : outil de détection et de l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de molécules anticancéreuses dans un modèle de tumeurs cérébrales chez le rat

Ce chapitre porte sur le développement d'un outil combinant une micro-antenne RMN implantable et un moyen d'administration d'un composé d'intérêt.

Nous présentons, tout d'abord, les raisons pour lesquelles nous avons choisi d'associer ces deux entités différentes.

Ensuite, la conception de cet outil et des analyses préliminaires composées d'essais *in vitro* et *in vivo* sur des cerveaux de rats sains sont décrites.

Et, pour finir, nous présentons un exemple d'application *in vivo* de cet outil avec la perfusion de différents composés d'intérêt, deux molécules antitumorales, et l'observation de l'effet, en temps réel, de ces dernières sur le métabolisme tumoral chez des rats porteurs d'un gliome C6.

5.1 Contexte

Pouvoir injecter un médicament anticancéreux directement au sein de la tumeur et suivre les effets de ce dernier en temps réel représente un véritable challenge et objectif dans le domaine de l'oncologie et de la pharmacologie.

Depuis quelques années, l'immunothérapie et la chimiothérapie intratumorales constituent deux techniques prometteuses pour le traitement de certaines tumeurs telles que les tumeurs cérébrales comme les gliomes.

L'administration par voie intraveineuse d'agents chimiothérapeutiques ou immunothérapeutiques, permettant la distribution du médicament anticancéreux dans l'ensemble de l'organisme, fait parfois face à quelques difficultés limitant alors son efficacité. Dans le cas des tumeurs cérébrales, par exemple, l'efficacité des traitements administrés par voie systémique peut être fortement impactée par la barrière hémato-encéphalique (BHE), barrière physiologique présente entre la circulation sanguine et le système nerveux central et ayant pour rôle principal le maintien de l'homéostasie cérébrale en isolant le cerveau du reste de l'organisme et donc de la circulation sanguine.

Malgré l'altération de l'intégrité de la BHE en présence d'un gliome pouvant alors suggérer que cette dernière ne limiterait plus l'administration systémique de médicaments [Cao *et al.* (2006)], de nombreuses études ont montré que cette perturbation de la BHE pouvait être hétérogène avec notamment la présence de cellules tumorales dans des zones où la BHE resterait totalement intacte [Law *et al.* (2004); Santarosa *et al.* (2016)].

Diverses stratégies ont donc été étudiées de manière à surmonter la limitation induite par la présence d'une BHE saine afin d'améliorer l'administration systémique de médicaments à des concentrations efficaces sans pour autant accroître leur toxicité [Parrish *et al.* (2015)]. Les principales stratégies se sont basées sur des approches visant à augmenter la perméabilité des médicaments par l'intermédiaire de modifications chimiques ou encore sur des approches permettant d'ouvrir la BHE afin de la rendre perméable. Ces deux exemples qui ont pu être considérés comme des solutions tout à fait envisageables, en clinique, pour améliorer l'efficacité du traitement administré par voie systémique ont, cependant, parfois entraîné des effets secondaires néfastes. Ils ont, en effet, pu conduire à une large distribution du médicament dans le cerveau entraînant alors des dommages aux tissus sains ou diverses complications comme l'épilepsie et l'oedème cérébral [Marchi *et al.* (2007)].

Une autre solution permettant de surmonter le manque de perméabilité de la BHE consiste alors à injecter directement au sein de la tumeur cérébrale primitive ou métastatique l'agent chimiothérapeutique ou immunothérapeutique [Duvillard *et al.* (2007); Hong *et al.* (2020)]. Malgré un acte thérapeutique plus invasif, cette méthode présente plusieurs avantages par rapport à l'administration systémique qui ont été démontrés dans divers travaux. En effet, il a, par exemple, été constaté une augmentation de la concentration locale du médicament associée à une meilleure activité antitumorale et une réduction des toxicités systémiques [Tator & Wassenaar (1977); Penn *et al.* (1983)].

Depuis quelques récentes années notamment, le nombre d'essais cliniques portant sur l'administration locale de traitements anticancéreux a explosé [Champiat *et al.* (2020)].

Si la thérapie intratumorale est une technique très encourageante, beaucoup d'interroga-

tions subsistent encore : pour quelles indications tumorales ? Quels sont les médicaments les plus adaptés ? Quelle périodicité des traitements ?

Les techniques de RMN telles que l'IRM et la SRM sont très couramment utilisées en oncologie et en pharmacologie en raison de leur capacité à apporter des informations cruciales sur le diagnostic, sur le pronostic ou encore sur le suivi de la réponse à un traitement. L'existence de biomarqueurs fiables en IRM du micro-environnement tumoral et en SRM du métabolisme tumoral ont permis et permettent encore aujourd'hui d'étudier la réponse thérapeutique et ainsi évaluer l'efficacité antitumorale du médicament administré [Bell *et al.* (2011); Nelson (2011)].

Afin d'analyser précisément la réponse à un traitement administré localement, il semble alors nécessaire de concevoir de nouvelles méthodes de surveillance adaptées à cette technique de thérapie intratumorale.

En effet, la plupart du temps, la réponse tumorale est évaluée par l'utilisation de critères se concentrant principalement sur les changements dimensionnels de la tumeur [Watanabe *et al.* (2009)] et qui ne reflètent pas les autres modifications fonctionnelles, métaboliques et non morphologiques qui peuvent survenir lors de thérapies moléculaires ciblées, d'immunothérapies et de traitements locaux. De plus, la diminution potentielle de la taille de la tumeur durant le traitement et la faible sensibilité inhérente de l'IRM et de la SRM peuvent être responsables d'erreurs sur l'évaluation de la réponse thérapeutique [Kasten *et al.* (2019)].

Par conséquent, l'utilisation de micro-antennes RMN implantables telles que celles développées dans ces travaux pourrait être alors une solution qui permettrait d'apprécier au mieux la réponse thérapeutique induite lors d'une thérapie intratumorale.

L'association d'un système d'injection et d'une micro-antenne RMN implantable positionnée à proximité immédiate de la zone d'administration de la molécule thérapeutique pourrait, en effet, permettre d'évaluer très localement et avec une sensibilité de détection RMN améliorée la réponse tumorale thérapeutique. De plus, cette association pourrait également accélérer considérablement le processus d'évaluation de cette réponse en pouvant suivre, en temps réel, l'effet de la molécule anticancéreuse lors de l'injection intratumorale de cette dernière. Ce gain de temps serait alors très utile durant les nombreuses phases de développements et d'essais *in vitro* et *in vivo* de nouvelles molécules thérapeutiques et pourrait être aussi bénéfique aux médecins lors de l'ajustement des traitements suite à l'observation d'une faible voire d'une absence de réponse curative afin d'améliorer les chances de guérison des patients.

Cette étude décrit un dispositif qui non seulement délivre un composé d'intérêt tel qu'une molécule chimiothérapeutique ou immunothérapeutique à la tumeur, mais rend aussi compte de son effet et de son efficacité potentielle, en temps réel, par des acquisitions de RMN.

5.2 Matériel et méthodes

5.2.1 Conception de l'outil combinant une micro-antenne RMN implantable et un capillaire d'injection

Le dispositif combinant une micro-antenne RMN implantable et un capillaire d'injection a été réalisé en associant une micro-antenne RMN implantable ayant une largeur de $700\ \mu\text{m}$ et une longueur de $3\ \text{mm}$ et un capillaire en polyimide biocompatible ayant un diamètre extérieur de $230\ \mu\text{m}$ et un diamètre intérieur de $200\ \mu\text{m}$ (MicroLumen Medical Tubing, Oldslar, Floride, États-Unis). L'entrée du capillaire a été reliée, par un système de connexion, à un autre capillaire connecté à un pousse-seringue (Pousse-seringue CMA 402, Phymep, Paris, France).

Deux dispositifs ont été développés, un avec le capillaire ayant une longueur de $1.5\ \text{mm}$ et un avec le capillaire ayant une longueur de $2.7\ \text{mm}$ et couvrant la totalité de celle de la boucle de détection de la micro-antenne RMN implantable.

La **figure 5.1** illustre deux prototypes de ces dispositifs.

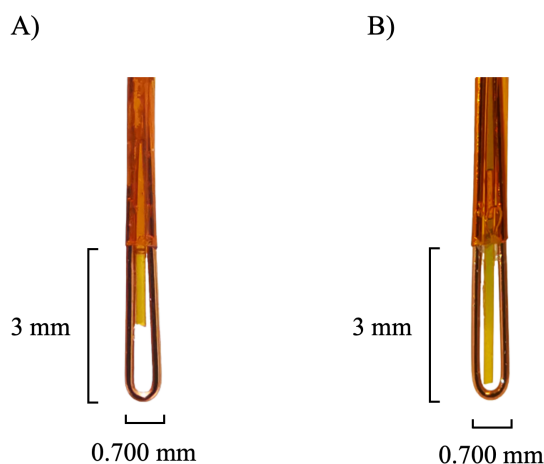


Figure 5.1. Association d'une micro-antenne RMN implantable ayant une largeur de $700\ \mu\text{m}$ et d'un capillaire d'injection ayant un diamètre extérieur de $230\ \mu\text{m}$ et un diamètre intérieur de $200\ \mu\text{m}$. (A) Prototype avec le capillaire ayant une longueur de $1.5\ \text{mm}$. (B) Prototype avec le capillaire ayant une longueur couvrant la totalité de celle de la boucle de détection de la micro-antenne RMN.

La présence du capillaire d'injection au centre de la boucle de détection de la micro-antenne RMN a entraîné une diminution du volume de détection de $1\ \mu\text{L}$ précédemment déterminé dans le **chapitre 3**. Pour le prototype avec le capillaire ayant une longueur de $1.5\ \text{mm}$, le volume de détection de la micro-antenne RMN était alors d'environ $940\ \text{nL}$, et pour celui avec le capillaire ayant une longueur de $2.7\ \text{mm}$, d'environ $890\ \text{nL}$.

La **figure 5.2** représente une photographie du dispositif combinant une micro-antenne

RMN et un capillaire d'injection (prototype B de la **figure 5.1**) et de ses principaux éléments (circuit électronique de la micro-antenne RMN et connexion du capillaire d'injection).

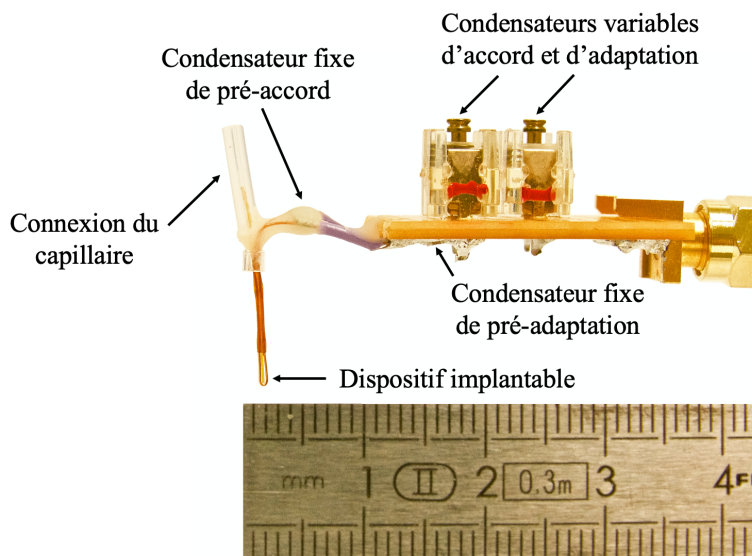


Figure 5.2. Photographie du dispositif combinant une micro-antenne RMN implantable et un capillaire d'injection (prototype B de la **figure 5.1**) et de ses principaux éléments (circuit électronique de la micro-antenne RMN et connexion du capillaire d'injection).

5.2.2 Analyses préliminaires

Préalablement aux expériences *in vivo* effectuées sur des cerveaux de rats porteurs d'un gliome C6, des analyses préliminaires incluant des manipulations *in vitro* et *in vivo* sur des cerveaux de rats sains ont été menées.

Ces analyses préliminaires ont eu plusieurs objectifs.

Le premier objectif a, tout d'abord, été de déterminer lequel des deux prototypes décrits ci-dessus était le plus adapté pour les expériences futures effectuées sur les cerveaux d'animaux porteurs d'un gliome C6 en appréciant l'homogénéité de la perfusion et de la diffusion de la solution administrée par le capillaire. Le deuxième objectif a été d'évaluer le bon fonctionnement de chaque entité constitutive du dispositif. En effet, l'association d'une micro-antenne RMN implantable et d'un capillaire d'injection ne devait pas perturber la perfusion d'un composé d'intérêt par le capillaire et par la technique CED présentée dans la **partie 2.4.2** et la détection RMN par la micro-antenne implantable.

5.2.2.1 Expériences *in vitro*

Afin de déterminer le prototype le plus adapté, nous avons choisi d'évaluer l'homogénéité de la diffusion d'une solution d'intérêt injectée par le capillaire du dispositif.

Pour cela, les deux prototypes (cf. **figure 5.1**) ont été implantés dans un gel d'agarose à 1% permettant de simuler la densité d'une tumeur cérébrale telle que le modèle du gliome

C6. Une solution de bleu de méthylène a été perfusée par le capillaire d'injection pendant 10 min et avec un débit de 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$. Des photographies ont été prises toutes les 1 min 40 s durant la perfusion de la solution de bleu de méthylène.

A la suite de cette expérience nous ayant permis de choisir le prototype le plus adapté et dont les résultats sont illustrés dans le **paragraphe 5.3**, d'autres expériences *in vitro* d'IRM et de SRM ont été réalisées dans le but de vérifier, par la détection RMN effectuée avec la micro-antenne implantable, la bonne diffusion et la bonne détection d'une solution d'intérêt. La micro-antenne RMN a été utilisée uniquement en réception RF et l'émission RF a été faite avec l'antenne volumique Bruker en quadrature (diamètre interne = 86 mm).

Pour les mesures d'IRM, le dispositif a été implanté dans un gel d'agarose à 1% et une solution d'agent de contraste à base de gadolinium (Gd) (Dotarem®, Guerbet Group, Villepinte, France) à une concentration de 5 mM a été perfusée par le capillaire avec un débit de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Des images sagittales pondérées T_1 ont été acquises, toutes les 4 min 34 s, avec la micro-antenne RMN utilisée en réception RF et en employant une séquence FLASH avec les paramètres suivants : $\text{TR}/\text{TE} = 200/3.5$ ms, 3 coupes de 1 mm d'épaisseur avec un FOV de 10×10 mm² et une résolution spatiale égale à $39 \times 39 \times 1000$ μm^3 . La durée de l'acquisition était de 1 min 08 s.

Afin d'éviter la formation de bulles d'air au cours de la perfusion de la solution de Gd, le capillaire d'injection a été pré-rempli par cette dernière avant l'implantation du dispositif dans le gel d'agarose.

Pour les mesures de SRM, le dispositif a été implanté dans un gel d'agarose à 1% comprenant 25 mM de glutamine (Gln). Une solution de 25 mM de lactate (Lac) et de 25 mM de créatine (Cr) a été perfusée par le capillaire avec un débit de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Des spectres RMN ^1H ont été acquis avec la micro-antenne RMN et en utilisant une séquence PRESS avec les paramètres suivants : $\text{TR}/\text{TE} = 2000/15.266$ ms, taille du voxel = $2 \times 4 \times 2$ mm³, suppression de l'eau = VAPOR, nombre d'accumulations = 128, durée de l'acquisition = 4 min 16 s.

5.2.2.2 Expériences *in vivo* sur des cerveaux d'animaux sains

Une fois la compatibilité de l'association entre une micro-antenne RMN implantable et un capillaire d'injection validée par les précédentes expériences *in vitro*, des expériences sur des cerveaux d'animaux sains ont été réalisées.

Ces expériences ont été considérées comme une étape nécessaire et primordiale à réaliser entre les expériences *in vitro* et les expériences *in vivo* effectuées sur des cerveaux d'animaux porteurs d'un gliome C6 afin d'évaluer les différences et les difficultés potentiellement rencontrées lors de l'implantation *in vivo* et du fonctionnement intracérébral

du dispositif.

Pour le choix du composé d'intérêt administré par le capillaire d'injection du dispositif dans le tissu cérébral sain, nous avons choisi de nous orienter sur une molécule ayant à la fois une résonance visible en SRM ^1H (et qui, si possible, ne chevauchait pas une résonance d'un métabolite cérébral) et un effet potentiel direct sur le métabolisme typique du tissu cérébral sain et observable sur les spectres RMN ^1H acquis avec la micro-antenne RMN du dispositif au cours de la perfusion.

Le diméthylsulfoxyde (DMSO), dont la structure chimique est illustrée à la **figure 5.3**, semblait alors répondre à ces deux critères.

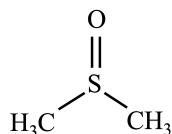


Figure 5.3. Structure chimique du diméthylsulfoxyde (DMSO).

Il s'agit d'un solvant polaire aprotique, de formule chimique $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$, couramment utilisé en recherche clinique et préclinique et notamment pour solubiliser des molécules hydrophobes.

Il possède une résonance à 2.7 ppm visible en SRM protonique.

Au cours des années 2000, l'utilisation du DMSO comme véhicule de composés neuroactifs insolubles dans l'eau dans des études utilisant des injections centrales s'est fortement popularisée [Blevins *et al.* (2002)]. En effet, en raison de sa forte miscibilité avec l'eau et de sa capacité à augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire, l'absorption de composés insolubles dans l'eau en a été grandement améliorée.

Cependant, certaines études ont, par la suite, suggéré que le DMSO pouvait posséder une certaine toxicité et entraîner des effets néfastes jetant alors un doute sur son utilisation *in vivo* appropriée. Il a été rapporté que des injections systémiques et répétées de DMSO produisaient des effets neurotoxiques en fonction de la concentration administrée [Authier *et al.* (2002)]. Les travaux récents de Rabow *et al.* (2021) ont montré que l'administration de DMSO par voie intrapéritonéale à des concentrations précédemment considérées comme sûres et sans danger avait provoqué des changements significatifs de la biochimie cérébrale avec une augmentation des marqueurs de stress oxydatif, des altérations chroniques des cellules gliales et des modifications du comportement chez le rat. De plus, une dégénérescence apoptotique généralisée du cerveau de souris en développement a été constatée suite à une administration de DMSO par voie intrapéritonéale [Hanslick *et al.* (2009)].

Pour cette expérience *in vivo* effectuée sur des cerveaux de rats sains, nous avons donc voulu évaluer l'effet, en temps réel, d'une perfusion intracérébrale de DMSO sur

le métabolisme du tissu cérébral sain. Le DMSO a été administré par le capillaire du dispositif et les mesures de SRM ont été réalisées avec la micro-antenne RMN du dispositif. Les résultats sont présentés dans le **paragraphe 5.3**.

5.2.3 Expériences *in vivo* sur des cerveaux d'animaux porteurs d'un gliome C6

5.2.3.1 Métabolisme de la choline et pathologies cancéreuses

Au cours de ces dernières années, la recherche portant sur l'identification des différents mécanismes intervenant dans la reprogrammation métabolique des cellules tumorales lors du processus de la transformation maligne a connu une véritable recrudescence [Hanahan & Weinberg (2011)].

En effet, une meilleure compréhension des processus moléculaires et métaboliques à l'origine de l'oncogenèse a grandement facilité la découverte de traitements médicamenteux ciblant les voies et les molécules responsables de l'apparition et de la progression du cancer [Gibbs (2000)].

Un des principaux métabolites dérégulé lors d'une transformation maligne est la choline, un nutriment essentiel et nécessaire à la synthèse de la phosphatidylcholine (PC). Cette dernière, principal constituant phospholipidique des membranes, joue un rôle fondamental dans le maintien de l'intégrité de la membrane cellulaire, tant dans des conditions physiologiques normales que dans des conditions pathologiques telles que les maladies cancéreuses.

La PC est principalement synthétisée par la voie de Kennedy [Gibellini & Smith (2010)]. L'une des principales enzymes de cette dernière, la choline kinase, permet la phosphorylation de la choline libre, en présence d'adénosine triphosphate (ATP) et de magnésium, générant ainsi de la PCho. Chez les mammifères, cette enzyme existe sous deux isoformes : la choline kinase α (CHK α) et la choline kinase β (CHK β). Il a été rapporté que la CHK β ne participait pas aux processus de l'oncogenèse incluant le développement et la progression tumorale contrairement à la CHK α [Gallego-Ortega *et al.* (2009); Aoyama *et al.* (2004)].

La génération de PCho par la CHK α a, en effet, été décrite comme un événement important dans la chaîne de signalisation des facteurs de croissance essentiels à l'activation du développement et de la multiplication cellulaire tumorale. Une activité accrue de la CHK α , nécessaire à la biosynthèse de la PC, a pu être observée dans un grand nombre de tumeurs telles que les cancers du sein, du poumon, du cerveau ou encore les ostéosarcomes conduisant alors à une accumulation de PCho [Ramírez de Molina *et al.* (2002a,b)].

Les tumeurs présentent précisément une caractéristique métabolique appelée « phénotype cholinique » notamment démontrée dans le chapitre précédent (cf. **paragraphe 4.3.2**) et qui est caractérisée par une augmentation de la phosphorylcholine (PCho) et donc des

composés à choline (tCho). Ce phénotype cholinique a été identifié comme principal soutien de la transformation maligne et de la croissance cellulaire tumorale [Glunde *et al.* (2011)].

L'ensemble de ces observations ont ainsi conduit aux deux conclusions suivantes : la présence d'un métabolisme anormal de la choline (« phénotype cholinique ») est une caractéristique métabolique fortement associée à l'apparition et à la progression tumorale et la CHK α représente une cible thérapeutique prometteuse pour le pronostic et le traitement du cancer [Hernandez-Alcoceba *et al.* (1997); Lacal (2001)].

De ce fait, la diminution de la concentration des composés à choline (tCho), observable par SRM, peut alors être utilisée comme biomarqueur pharmacodynamique efficace de la réponse à un traitement antitumoral ciblant la CHK α .

5.2.3.2 Inhibiteurs de la choline kinase α

Suite à l'identification de la CHK α comme étant potentiellement une cible thérapeutique pour le traitement du cancer, divers travaux ont été menés afin d'identifier et d'élaborer des molécules inhibitrices de cette dernière.

Plusieurs inhibiteurs de la CHK α ont été développés à partir de l'hémicholine, également connu sous le nom d'hémicholinium (HC-3). Ce dernier, inhibiteur connu de la choline kinase [Cannon (1994)], possède une toxicité extrêmement élevée rendant impossible son utilisation comme médicament anticancéreux.

Le développement de molécules dérivées de HC-3 a été un moyen de déployer de nouveaux inhibiteurs de la CHK α . Ce dernier s'est principalement basé sur la modification des caractéristiques chimiques dans le but de réduire la haute toxicité de HC-3 et de limiter les effets indésirables. Quelques études ont, par la suite, démontré le potentiel antiprolifératif et antitumoral de ces composés dans de nombreux modèles de tumeurs xéno greffées [Hernandez-Alcoceba *et al.* (1997)].

Deux générations d'inhibiteurs de la CHK α ont ainsi été développées.

- Un exemple d'inhibiteur de la première génération est la molécule MN58b, de formule chimique $C_{32}H_{40}Br_2N_4$.

La structure chimique de cette dernière est illustrée à la **figure 5.4**.

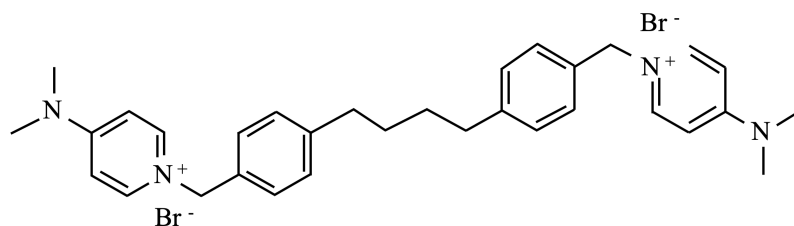


Figure 5.4. Structure chimique de la molécule MN58b, une molécule inhibitrice de première génération de la CHK α .

La MN58b est une molécule anticancéreuse qui présente une inhibition sélective de l'activité de la CHK α entraînant une diminution des niveaux de PCho, une réduction de la prolifération des cellules cancéreuses *in vitro* et un retard de croissance des tumeurs xénotransplantées [Lacal (2001); Rodríguez-González *et al.* (2004a,b); Al-Saffar *et al.* (2006)].

Des travaux plus récents effectués par Kumar *et al.* ont démontré l'efficacité de la molécule MN58b dans la suppression de la production de PCho dans trois lignées cellulaires de tumeurs cérébrales [Kumar *et al.* (2015)]. En effet, leurs études de SRM *in vivo* menées sur des rats porteurs d'une tumeur cérébrale F98 ont démontré une diminution significative (de l'ordre de 44%) de la concentration des composés à choline (tCho) dans le tissu tumoral après un traitement avec de la MN58b. De façon concomitante, une augmentation significative des résonances lipidiques polyinsaturées a également été observée dans les tumeurs traitées. Des expériences de SRM *ex vitro* ont confirmé que la diminution de la concentration de tCho était due à une réduction significative de la production de PCho. De plus, les mesures des volumes tumoraux, effectuées par un suivi par IRM, ont démontré un arrêt significatif de la croissance des tumeurs des rats traités par de la MN58b par rapport à celles des rats traités par une solution saline. Et enfin, d'un point de vue histologique, les tumeurs des rats traités par de la MN58b présentaient une diminution de 16% de la densité cellulaire tumorale, ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules apoptotiques, par rapport à celles des rats traités par une solution saline.

La **figure 5.5** présente leurs résultats spectroscopiques *in vivo* obtenus avant et après 5 jours de traitement avec de la MN58b administrée par voie intrapéritonéale (2 mg/kg/jour). Les spectres RMN ont été acquis avec des antennes conventionnelles externes et à un champ magnétique statique de 9.4 T.

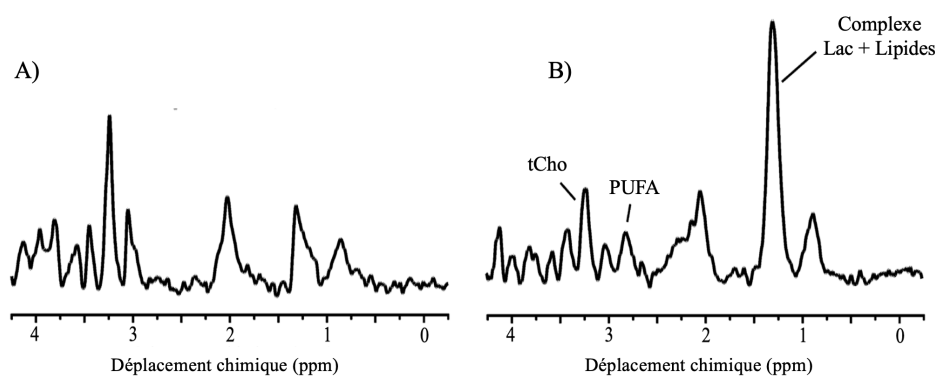


Figure 5.5. Spectres RMN ^1H *in vivo* représentatifs d'un tissu tumoral F98 non traité (A) et d'un tissu tumoral F98 traité avec de la MN58b (B). Le traitement par de la MN58b a entraîné une réduction de l'amplitude du signal de résonance de la choline totale (tCho) et une augmentation de l'amplitude du signal de résonance du complexe lipides+lactate (Lac) à 1.3 ppm et de l'amplitude du signal de résonance des acides gras polyinsaturés (PUFA, pour *PolyUnsaturated Fatty Acid*, en anglais) à 2.8 ppm [Kumar *et al.* (2015)].

Ce papier a été utilisé comme référence pour l'analyse de nos résultats spectroscopiques obtenus avec la micro-antenne RMN et au cours de la perfusion d'une solution contenant de la MN58b par le capillaire d'injection après l'implantation du dispositif dans le tissu cérébral tumoral d'un rat porteur d'un gliome C6.

- La molécule RSM-932A, également connue sous le nom de TCD-717 et de formule chimique $\text{C}_{46}\text{H}_{38}\text{Br}_2\text{Cl}_2\text{N}_4$, fait quant à elle partie des inhibiteurs de deuxième génération. La structure chimique de cette molécule est affichée à la **figure 5.6**.

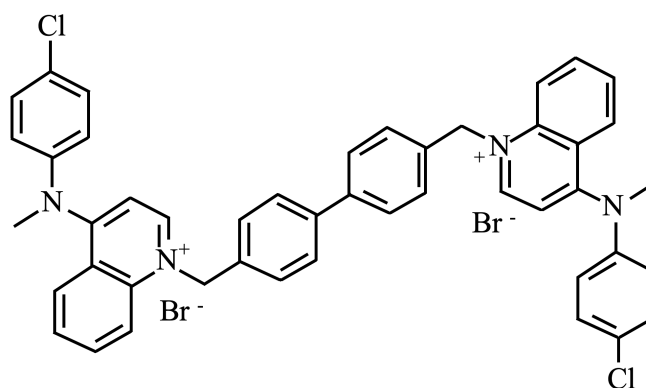


Figure 5.6. Structure chimique de la molécule RSM-932A, une molécule inhibitrice de deuxième génération de la CHK α .

Cette molécule a été le premier inhibiteur de la CHK α à être entré en phase I d'essais cliniques [ClinicalTrials (2011)].

Lacal & Campos (2014) ont réalisé, en 2014, une étude complète portant sur la caractérisation préclinique de la molécule RSM-932A. Ils ont alors pu prouver que

cette dernière était moins toxique et mieux tolérée à des doses plus importantes et plus efficaces comme inhibiteurs de la croissance tumorale que la molécule MN58b. Son mode d'action est similaire à la molécule MN58b en provoquant un arrêt réversible du cycle cellulaire des cellules non tumorales et en favorisant la mort cellulaire par apoptose des cellules tumorales [Sanchez Lopez *et al.* (2013)].

Les résultats obtenus dans les travaux de Lacal *et al.* ont fait de la molécule RSM-932A, un très bon candidat pour d'autres études cliniques.

Les objectifs du premier essai clinique de phase I, débuté en 2011 et réalisé sur une cohorte de patients atteints de tumeurs solides à un stade avancé, ont été d'évaluer la toxicité du médicament et de déterminer la dose maximale tolérée et la dose appropriée pour les études de phase II. Afin d'évaluer la corrélation potentielle entre les niveaux tumoraux des composés à choline et la dose maximale tolérée lors d'un traitement par de la RSM-932A administré par voie systémique, les investigateurs ont privilégié l'utilisation de la SRM.

Au cours de cette étude, nous avons donc choisi d'évaluer l'efficacité thérapeutique de la molécule MN58b et l'efficacité thérapeutique de la molécule RSM-932A lors d'une injection continue intratumorale effectuée par le capillaire du dispositif préalablement implanté dans le gliome C6.

L'efficacité thérapeutique a été principalement jugée par l'évolution de la concentration des composés à choline, témoin de la réponse à un traitement fondé sur l'utilisation de molécules inhibitrices de la CHK α , par des mesures spectroscopiques *in vivo* effectuées avec la micro-antenne RMN du dispositif.

Les résultats de cette étude sont présentés dans le **paragraphe 5.3.2.1**, pour la molécule MN58b, et dans le **paragraphe 5.3.2.2**, pour la molécule RSM-932A.

5.2.4 Protocole expérimental *in vivo*

Dans cette étude, nous avons utilisé une cohorte de 2 rats sains et de 2 rats pathologiques porteurs d'un gliome C6.

Toutes les étapes suivantes ont été réalisées de manière similaire au chapitre précédent (cf. **chapitre 4**).

Concernant les rats porteurs d'un gliome C6, pour plus d'informations sur l'injection des cellules C6 par chirurgie stéréotaxique et sur le suivi de la croissance tumorale, veuillez vous référer aux **paragraphes 4.2.1.2** et **4.2.1.3**.

Concernant l'ensemble des animaux sains et pathologiques, pour plus détails sur la conception et la pose de la canule par chirurgie stéréotaxique, veuillez vous référer au **paragraphe 4.2.2**.

Concernant le protocole d'IRM et de SRM, les acquisitions RMN ont été réalisées en

suivant le même protocole décrit dans le **paragraphe 4.2.3**.

En particulier, la séquence PRESS (cf **paragraphe 2.1.3.2**) a été utilisée pour l'acquisition des données spectroscopiques *in vivo* par la micro-antenne RMN du dispositif avec les paramètres suivants : TR/TE = 2000/15.266 ms, taille du voxel = $2 \times 4 \times 2$ mm³, suppression de l'eau = VAPOR, nombre d'accumulations = 256, durée de l'acquisition = 8 min 32 s).

La figure suivante illustre le positionnement d'un rat dans le berceau du système RMN préclinique et après l'implantation du dispositif dans le tissu cérébral sain pour les rats sains et dans le gliome C6 pour les rats pathologiques.

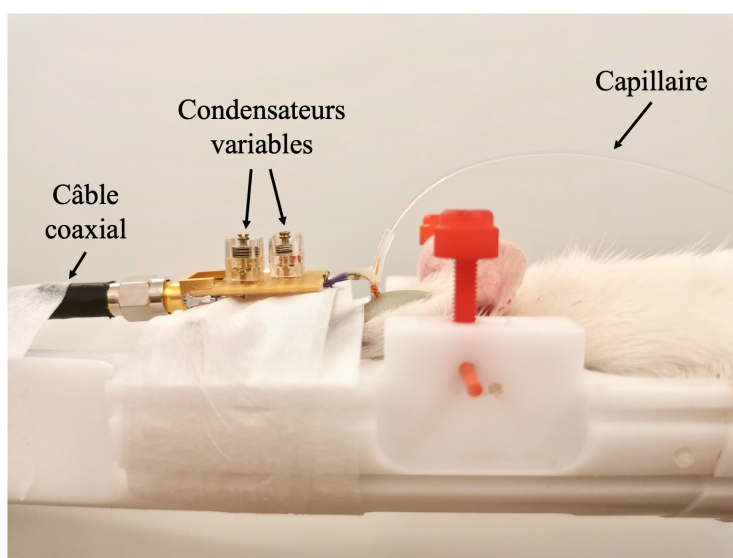


Figure 5.7. Positionnement d'un rat dans le berceau du système RMN préclinique et après l'implantation du dispositif dans le tissu cérébral sain pour les rats sains et dans le gliome C6 pour les rats pathologiques. La tête a été maintenue immobile par des barres d'oreilles (en rouge).

5.3 Résultats et discussion

5.3.1 Analyses préliminaires

5.3.1.1 Expériences *in vitro*

La **figure 5.8** et la **figure 5.9** illustrent la diffusion de la solution de bleu de méthylène dans le gel d'agarose à 1% au cours de la perfusion par le capillaire des deux prototypes (cf. **paragraphe 5.2.1**).

Début de la perfusion de la solution de bleu de méthylène par le capillaire (débit = $0.4 \mu\text{L}/\text{min}$)

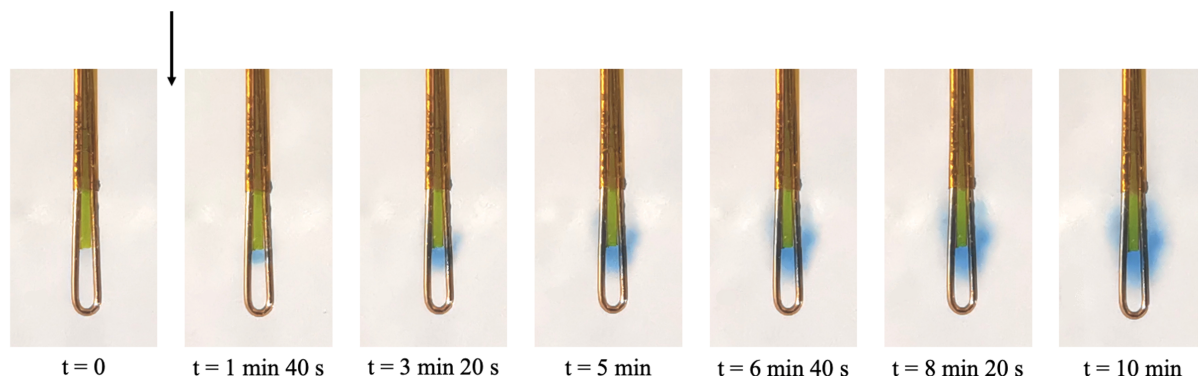


Figure 5.8. Diffusion de la solution de bleu de méthylène dans le gel d'agarose à 1% au cours de la perfusion (débit = $0.4 \mu\text{L}/\text{min}$) par le capillaire ayant une longueur de 1.5 mm.

Début de la perfusion de la solution de bleu de méthylène par le capillaire (débit = $0.4 \mu\text{L}/\text{min}$)

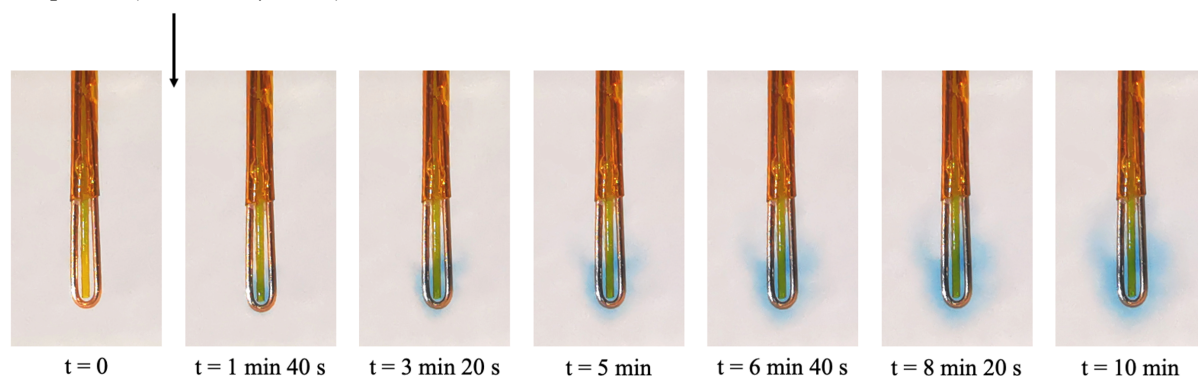


Figure 5.9. Diffusion de la solution de bleu de méthylène dans le gel d'agarose à 1% au cours de la perfusion (débit = $0.4 \mu\text{L}/\text{min}$) par le capillaire ayant une longueur couvrant la totalité de celle de la boucle de détection de la micro-antenne RMN implantable.

Comme l'illustre les deux précédentes figures, la diffusion de la solution de bleu de méthylène dans le gel d'agarose a différé selon la longueur du capillaire.

Nous avons observé, dans la **figure 5.8**, une diffusion ayant principalement lieu sur la partie centrale et haute de la boucle de détection de la micro-antenne RMN et, dans la **figure 5.9**, une diffusion plutôt centrée sur la partie basse de la boucle de détection.

Dans le dernier cas, nous avons, de plus, pu supposer que durant un temps de perfusion plus long que celui utilisé lors de ces expériences *in vitro*, la solution de bleu de méthylène aurait eu tendance à remonter par capillarité et à se diffuser sur le long de la boucle de détection de la micro-antenne RMN implantable.

Ainsi, afin d'obtenir une diffusion homogène du composé perfusé par le capillaire sur l'intégralité du tissu d'intérêt présent dans le volume de détection de la micro-antenne

RMN, le prototype ayant un capillaire dont la longueur couvrait la totalité de celle de la micro-antenne RMN nous a semblé être le plus approprié.

Les expériences futures *in vitro* et *in vivo* ont donc été effectuées avec ce prototype du dispositif.

Expérience d'IRM *in vitro*

La figure suivante illustre le résultat de l'expérience d'IRM *in vitro* dont le but a été d'évaluer la diffusion de la solution d'agent de contraste à base de gadolinium (Gd) par le capillaire du dispositif pendant l'acquisition d'images IRM pondérées T_1 effectuée avec la micro-antenne RMN.

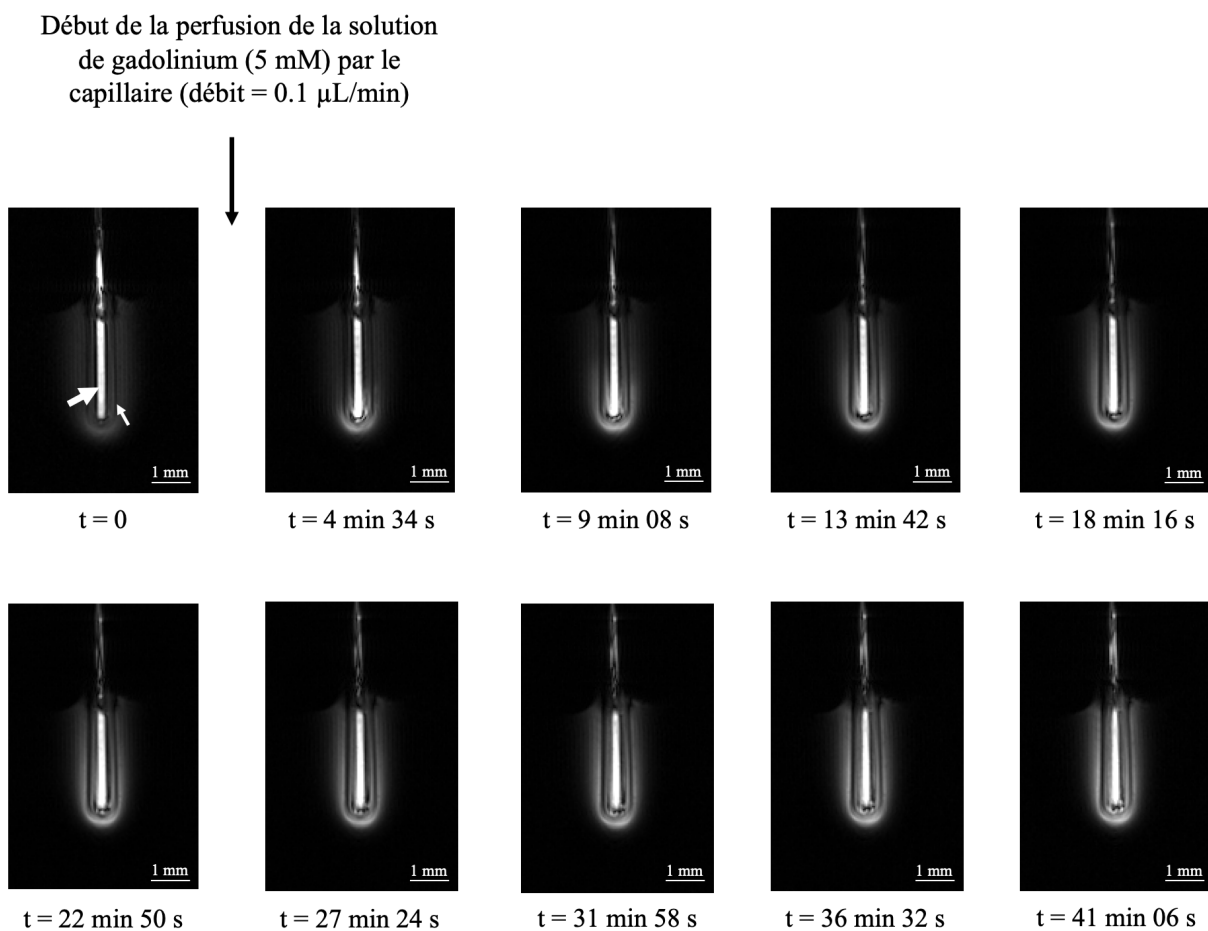


Figure 5.10. Images IRM sagittales pondérées T_1 acquises avec la micro-antenne RMN utilisée en réception RF au cours de la perfusion (débit = 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$) de la solution d'agent de contraste à base de Gd (5 mM) par le capillaire. Les images ont été acquises avec une séquence FLASH et avec les paramètres suivants : TR/TE = 200/3.5 ms, 3 coupes, épaisseur de coupes = 1 mm, FOV = $10 \times 10 \text{ mm}^2$, résolution spatiale = $39 \times 39 \times 1000 \mu\text{m}^3$, temps d'acquisition = 1 min 08 s. La petite flèche montre le fil de cuivre de la boucle de détection de la micro-antenne RMN apparaissant en hyposignal et la grande flèche montre le capillaire pré-rempli avec la solution d'agent de contraste à base de Gd.

Sur l'image IRM pondérée T_1 acquise avant le début de la perfusion de la solution d'agent

de contraste à base de Gd, nous avons pu très facilement identifier la présence du capillaire pré-rempli apparaissant en hypersignal (grande flèche). Il a été aussi simple de vérifier le positionnement parfaitement centré du capillaire dans la boucle de détection de la micro-antenne RMN implantable dont le fil de cuivre était visible en hyposignal (petite flèche). La présence de quelques lignes répétées parallèlement au capillaire s'est expliquée par l'artefact de troncature (aussi appelé artefact de Gibbs), phénomène souvent présent dans les zones de transitions brutales de signal.

Au cours de la perfusion de la solution d'agent de contraste à base de Gd par le capillaire d'injection, l'augmentation de l'intensité du signal (hypersignal), générée par l'effet T_1 prédominant du gadolinium, a été facilement observable sur les images pondérées T_1 et acquises avec la micro-antenne RMN. Similairement aux observations obtenues précédemment avec la diffusion de la solution de bleu de méthylène (**figure 5.9**), la solution d'agent de contraste à base de Gd s'est diffusée, tout d'abord, sur la partie basse de la boucle de détection avant de se diffuser par capillarité sur l'entièreté de la longueur de la boucle de détection de la micro-antenne RMN.

Nous avons pu alors en conclure que la diffusion du composé d'intérêt (ici, la solution d'agent de contraste à base de Gd) était homogène et affectait l'intégralité du milieu (ici, le gel d'agarose) présent dans le volume de détection de la micro-antenne RMN implantable.

La **figure 5.11.C** illustre l'image résultante de la soustraction entre l'image IRM pondérée T_1 acquise avec la micro-antenne RMN et à la fin de la perfusion de la solution d'agent de contraste à base de Gd par le capillaire (**figure 5.11.A**) et l'image IRM pondérée T_1 acquise avec la micro-antenne RMN et avant le début de la perfusion de la solution d'agent de contraste à base de Gd par le capillaire (**figure 5.11.B**).

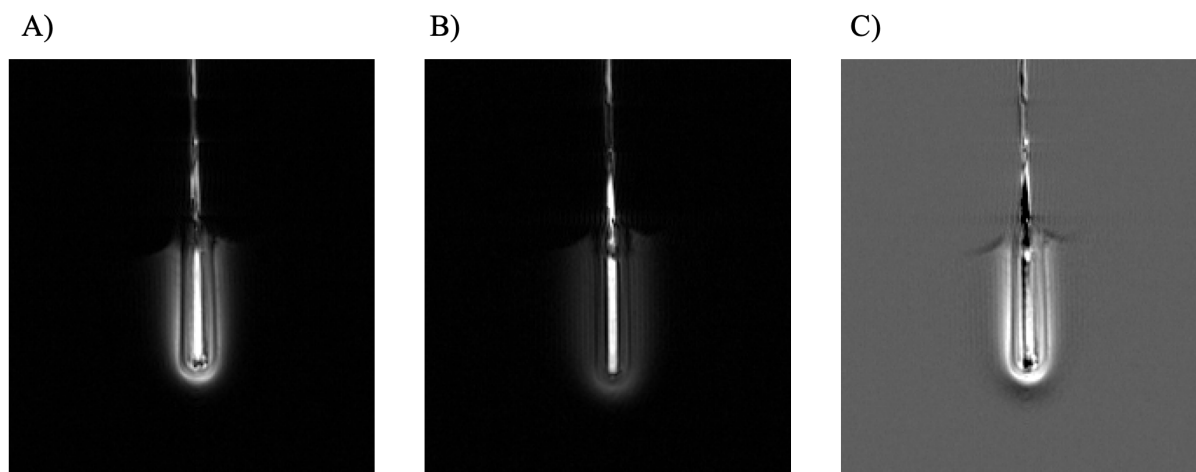


Figure 5.11. Perfusion de la solution d'agent de contraste à base de Gd par le capillaire et détection RMN de la diffusion dans le gel d'agarose par la micro-antenne RMN implantable. (A) Image IRM pondérée T_1 acquise avec la micro-antenne RMN à la fin de la perfusion de la solution d'agent de contraste à base de Gd. (B) Image IRM pondérée T_1 acquise avec la micro-antenne RMN avant le début de la perfusion de la solution d'agent de contraste à base de Gd. (C) Image résultante de la soustraction entre l'image (A) et l'image (B).

Malgré le pré-remplissage du capillaire avec la solution d'agent de contraste à base de Gd, nous avons constaté la présence d'une bulle d'air sur les images IRM à la fin de l'expérience.

La **figure 5.12** illustre deux images IRM axiales pondérées T_1 acquises avec la micro-antenne RMN avant et après la perfusion de la solution d'agent de contraste à base de Gd par le capillaire.

La bulle d'air, visible sur la **figure 5.12.B**, est désignée par la flèche.

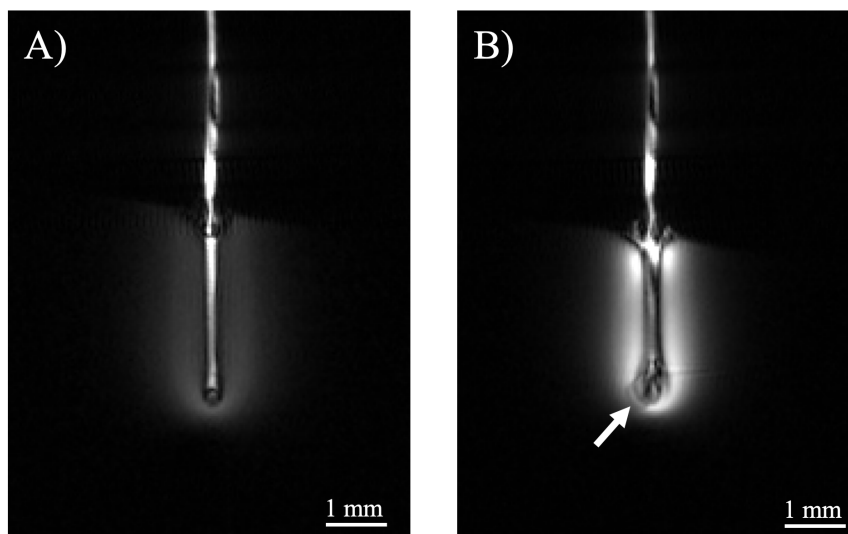


Figure 5.12. Images IRM axiales pondérées T_1 acquises avec la micro-antenne RMN avant (A) et après (B) la perfusion (débit = $0.1 \mu\text{L}/\text{min}$) de la solution d'agent de contraste à base de Gd (5 mM) par le capillaire. Les images ont été acquises avec une séquence FLASH et avec les paramètres suivants : $\text{TR}/\text{TE} = 200/3.5 \text{ ms}$, 3 coupes, épaisseur de coupes = 1 mm , $\text{FOV} = 10 \times 10 \text{ mm}^2$, résolution spatiale = $39 \times 39 \times 1000 \mu\text{m}^3$, temps d'acquisition = $1 \text{ min } 08 \text{ s}$. La flèche montre la bulle d'air présente à la fin de l'expérience.

Au cours de ces différentes expériences d'IRM *in vitro*, nous avons alors noté qu'il fallait être très vigilant à la présence de micro-bulles dans le capillaire placé dans la boucle de détection mais également sur tout le volume mort entre ce dernier et le pousse-seringue. Afin d'éviter la présence de micro-bulles lors des expériences *in vivo* futures et pouvant fortement dégrader la qualité spectrale des expériences de SRM ^1H *in vivo*, le capillaire a été purgé plusieurs fois avec la solution d'intérêt.

Expérience de SRM *in vitro*

La **figure 5.13** présente les 4 spectres RMN ^1H acquis avec la micro-antenne RMN du dispositif préalablement implanté dans le gel d'agarose à 1% contenant 25 mM de glutamine (Gln) et au cours de la perfusion, par le capillaire du dispositif, d'une solution composée de lactate (25 mM) et de créatine (25 mM), avec un débit de $0.1 \mu\text{L}/\text{min}$. Une correction de la phase et une apodisation lorentzienne avec une constante d'apodisation de 3 Hz ont été réalisées.

Pour rappel, nous avons choisi de focaliser cette expérience de SRM *in vitro* sur l'étude de l'évolution de la qualité spectrale des spectres RMN ^1H acquis avec la micro-antenne RMN du dispositif et au cours de la perfusion de la solution d'intérêt.

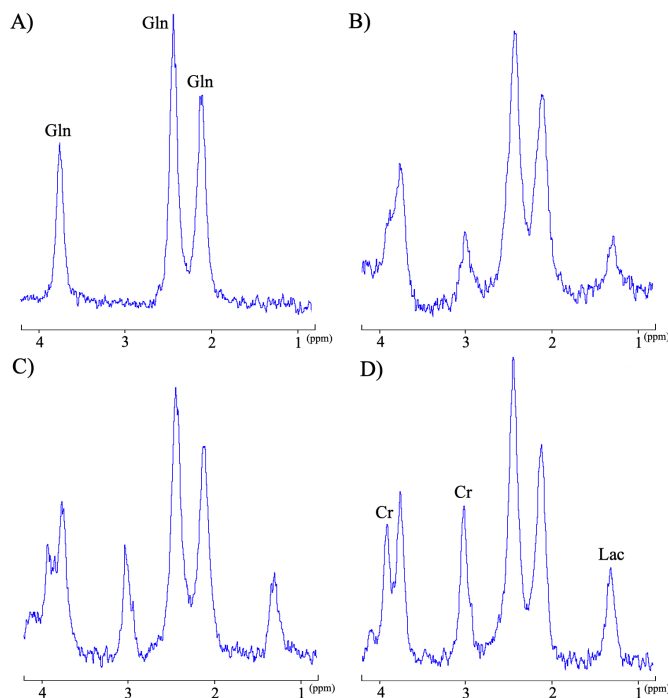


Figure 5.13. Spectres RMN ^1H acquis avec la micro-antenne RMN du dispositif préalablement implanté dans du gel d'agarose à 1% et contenant 25 mM de glutamine (Gln) et au cours de la perfusion (débit = 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$) de la solution composée de lactate (25 mM) et de créatine (25 mM) par le capillaire du dispositif. (A) $t = 0$, avant le début de la perfusion de la solution, (B) $t = 4 \text{ min } 16 \text{ s}$, (C) $t = 8 \text{ min } 32 \text{ s}$, (D) $t = 12 \text{ min } 48 \text{ s}$. Les spectres RMN ^1H ont été acquis avec une séquence PRESS et avec les paramètres suivants : TR/TE = 2000/15.266 ms, taille du voxel = $2 \times 4 \times 2 \text{ mm}^3$, suppression de l'eau = VAPOR, nombre d'accumulations = 128, durée de l'acquisition = 4 min 16 s. Signaux : Cr : créatine, Gln : glutamine, Lac : lactate.

Les 3 résonances principales de la glutamine (à 2.12 ppm, à 2.43 ppm et à 3.75 ppm) ont été observables sur le spectre RMN acquis juste avant le début de la perfusion de la solution de créatine et de lactate.

Au cours de la perfusion de la solution, nous avons pu facilement visualiser l'apparition des résonances principales de la créatine (à 3.02 ppm et à 3.91 ppm) et celle du lactate (à 1.31 ppm). Les FWHMs des résonances du lactate à 1.31 ppm, de la glutamine à 2.12 ppm et à 2.43 ppm, et de la créatine à 3.02 ppm étaient, respectivement, de 25 Hz, de 27 Hz, de 24 Hz et de 18 Hz, sur le dernier spectre RMN acquis 12 min après le début de la perfusion.

En comparant la qualité spectrale du spectre RMN acquis avant le début de la perfusion de la solution (spectre A. de la figure précédente) et celle du dernier spectre RMN acquis durant la perfusion de la solution (spectre D. de la figure précédente), nous avons noté une diminution du RSB d'environ 20% de la résonance de la glutamine à 2.43 ppm et une augmentation de la FWHM de cette dernière d'environ 2.5 Hz. Les effets de « flux » engendrés par la perfusion de la solution par le capillaire d'injection placé au centre de la boucle de détection de la micro-antenne RMN ont pu expliquer ces différentes observations. En

effet, à plus grande échelle, lors d'examens spectroscopiques cliniques du cerveau, il a été montré que des faibles mouvements de la tête du patient pouvaient interférer avec l'intégrité des mesures de SRM et les affecter de trois manières distinctes avec des erreurs de localisation, des décalages de fréquence et de phase et une perturbation de l'homogénéité du champ magnétique, causant généralement un élargissement des résonances et une atténuation du signal [Saleh *et al.* (2020)].

5.3.1.2 Expériences *in vivo* sur des cerveaux d'animaux sains

La figure 5.14 présente 6 spectres RMN ^1H *in vivo* acquis avec la micro-antenne RMN du dispositif et au cours de la perfusion de la solution composée de LCR artificiel et de DMSO (20 mM) par le capillaire du dispositif avec un débit de $0.4 \mu\text{L}/\text{min}$.

Les spectres RMN ont été acquis toutes les 15 min et une correction de la phase et une apodisation lorentzienne avec une constante d'apodisation de 7 Hz ont été réalisées.

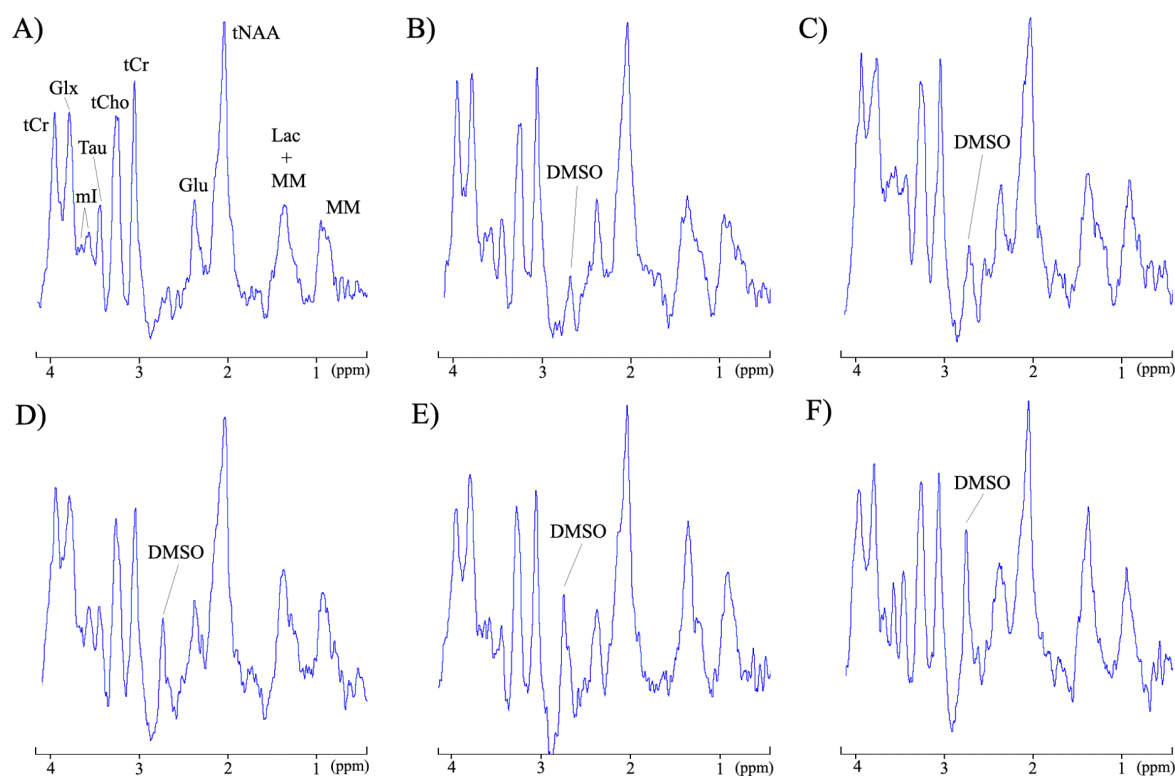


Figure 5.14. Spectres RMN ^1H acquis avec la micro-antenne RMN du dispositif et au cours de la perfusion (débit = $0.4 \mu\text{L}/\text{min}$) de la solution composée de LCR artificiel et de DMSO (20 mM) par le capillaire du dispositif. (A) $t = 0$, avant le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de DMSO, (B) $t = 15 \text{ min}$, (C) $t = 30 \text{ min}$, (D) $t = 45 \text{ min}$, (E) $t = 1 \text{ h}$, (F) $t = 1 \text{ h } 15 \text{ min}$. Les spectres RMN ^1H ont été acquis avec une séquence PRESS et avec les paramètres suivants : TR/TE = 2000/15.266 ms, taille du voxel = $2 \times 4 \times 2 \text{ mm}^3$, suppression de l'eau = VAPOR, nombre d'accumulations = 256, durée de l'acquisition = 8 min 32 s. Signaux : tCho : choline totale, tCr : créatine totale, tNAA : NAA total, Tau : taurine, mI : myo-inositol, Glx : glutamine + glutamate, Glu : glutamate, Lac : lactate, MM : macromolécules, DMSO : diméthylsulfoxyde.

Pour les deux rats sains inclus dans cette étude, le spectre RMN ^1H *in vivo* acquis avec la micro-antenne RMN et avant le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de DMSO par le capillaire était typiquement représentatif du profil métabolique d'un tissu cérébral sain.

Les FWHMs étaient de 17 +/- 2 Hz, 12 +/- 1 Hz, 25 +/- 3 Hz, 17 +/- 2 Hz et 17 +/- 1 Hz pour les résonances de tNAA (2.01 ppm), de tCr (3.03 ppm), de tCho (3.20 ppm), de Glx (3.74 ppm) et de tCr (3.91 ppm), respectivement, témoignant d'une bonne qualité spectrale.

Les spectres RMN ^1H *in vivo* acquis avant le début de la perfusion de la solution ont ensuite été quantifiés par le logiciel jMRUI et en suivant les différentes étapes du traitement des données spectroscopiques décrites dans le **paragraphe 4.2.4**. Comme pour les quantifications effectuées dans le **chapitre 4**, les valeurs estimées des concentrations des métabolites ont été établies proportionnellement à la concentration de la créatine totale (tCr = PCr + Cr) utilisée comme référence interne avec une valeur de 8.5 mmol/kg_{ww} [Tkáč *et al.* (2003)].

Le tableau suivant présente les valeurs moyennes et les écarts-types associés des estimations des concentrations des différents métabolites cérébraux chez les deux rats sains avant le début de la perfusion de la solution. Bien que classée non pertinente par le critère des CRLBs, l'estimation de la concentration de Lac a été aussi présentée.

Tableau 5.1 – Valeurs moyennes et écarts-types associés des estimations des concentrations des différents métabolites cérébraux chez les deux rats sains avant le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de DMSO (mmol/kg_{ww}).

Métabolite	Etude (Avant le début de la perfusion de la solution)	Chapitre 4 (n = 12)
tCr	8.5 +/- 0.0	8.5 +/- 0.0
NAA	7.5 +/- 0.8	8.3 +/- 1.8
tCho	2.3 +/- 0.3	2.0 +/- 0.5
mI	3.6 +/- 0.4	3.9 +/- 0.5
Gln	6.1 +/- 1.0	5.7 +/- 1.4
Glu	9.2 +/- 1.1	12.3 +/- 3.1
Tau	6.1 +/- 1.5	4.0 +/- 1.0
Lac	0.1 +/- 0.2	0.6 +/- 0.7

Les estimations des concentrations des métabolites étaient alors en accord avec celles quantifiées dans le **chapitre 4** sur les 12 cerveaux d'animaux sains et celles rapportées dans la littérature et présentées dans le **tableau 4.2**.

Au cours de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de DMSO, l'apparition du signal de résonance du DMSO à 2.7 ppm a été facilement observable. Nous avons également pu constater une importante augmentation de la résonance du complexe lactate (Lac) + macromolécules (MM) à 1.3 ppm.

Les évolutions moyennes, au cours de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de DMSO, du rapport entre les amplitudes du signal de résonance du DMSO et du signal de résonance de tCr et du rapport entre les amplitudes du signal de résonance du complexe Lac + MM et du signal de résonance de tCr ont été tracées.

Le signal de résonance de tCr a été pris comme référence afin de s'affranchir des biais introduits par les faibles différences de RSB entre les différents spectres RMN et les amplitudes ont été mesurées par le logiciel TopSpin.

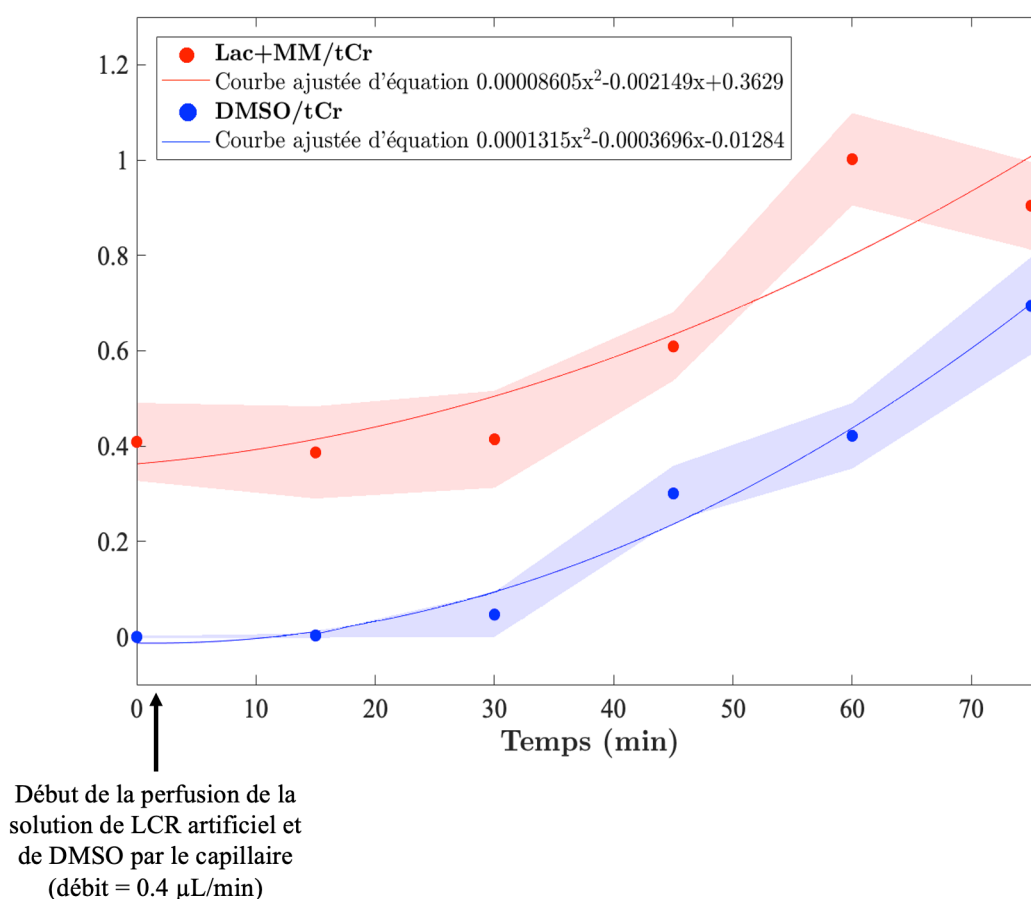


Figure 5.15. Évolutions moyennes temporelles du rapport entre les amplitudes du signal de résonance du DMSO et du signal de résonance de tCr et du rapport entre les amplitudes du signal de résonance du complexe Lac+MM et du signal de résonance de tCr. Les zones ombrées représentent les écarts-types des moyennes sur les 2 animaux.

Les courbes ajustées de l'évolution moyenne temporelle des deux rapports ont été calculées par une régression linéaire polynomiale d'ordre 2 effectuée par le logiciel Matlab R2022a (The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, USA).

Nous avons alors pu remarquer, pour les deux rats sains inclus dans cette étude, que la diffusion de la solution de LCR artificiel et de DMSO dans le tissu cérébral sain, entraînant une augmentation du rapport entre les amplitudes du signal de résonance du DMSO et du signal de résonance de tCr, s'est accompagnée d'une augmentation corrélée ($R^2 \simeq 0.90$) du rapport entre les amplitudes du signal de résonance du complexe Lac + MM et du signal de résonance de tCr.

Cette corrélation a pu s'expliquer par la neurotoxicité du DMSO causant une élévation de la concentration du complexe Lac+MM. En effet, il a été fréquemment démontré dans la littérature que l'augmentation du niveau de lactate était particulièrement corrélée avec une souffrance cérébrale comme dans les ischémies par exemple [Woo *et al.* (2010)]. De plus, il a également été rapporté que le métabolisme lipidique était couramment modifié au cours d'un phénomène apoptotique tel que celui rencontré lors d'une exposition cérébrale au DMSO [Kettunen & Brindle (2005)]. Nous avons alors pu considérer que l'augmentation de l'amplitude du signal de résonance à 1.3 ppm et représentant la contribution des macromolécules incluant les lipides et celle du lactate était un marqueur de la neurotoxicité du DMSO.

De plus, l'allure exponentielle des deux courbes a pu être considérée comme un indicateur du comportement de la solution perfusée au sein du volume de détection. En effet, malgré l'utilisation d'un débit de perfusion constant (0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$), nous avons observé une augmentation exponentielle et non linéaire du rapport entre les amplitudes du signal de résonance du DMSO et du signal de résonance de tCr pouvant attester d'une accumulation de la solution de LCR artificiel et de DMSO dans le volume de détection de la micro-antenne RMN. Cette accumulation a ainsi pu mettre en évidence que le flux entrant dans le volume de détection était supérieur au flux sortant.

La **figure 5.16.C** présente la superposition du spectre RMN ^1H *in vivo* acquis avec la micro-antenne RMN du dispositif et avant le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de DMSO par le capillaire (**figure 5.16.A**) et du spectre RMN ^1H *in vivo* acquis avec la micro-antenne RMN et après 1 h 15 min du début de la perfusion (**figure 5.16.B**).

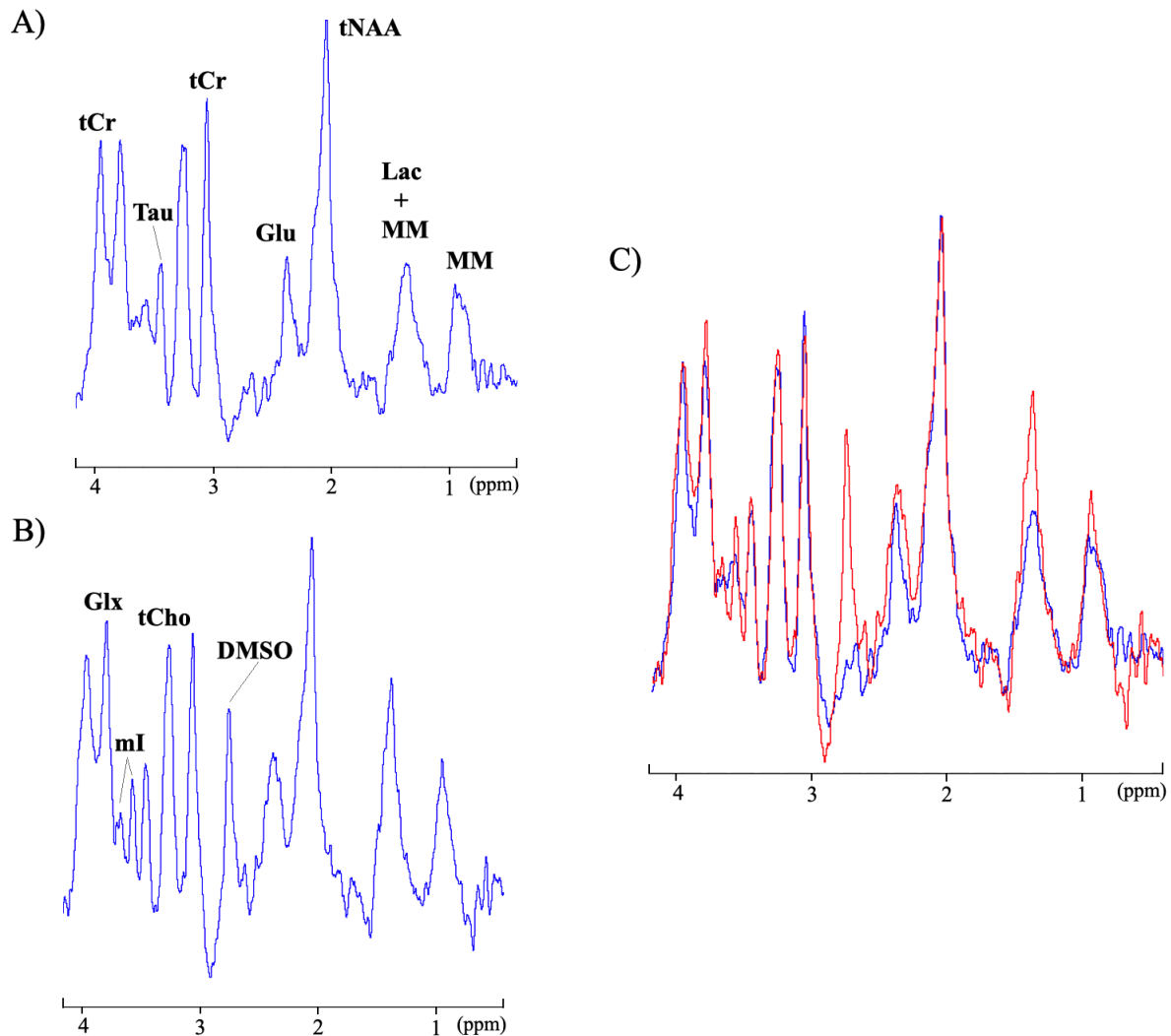


Figure 5.16. Comparaison spectrale entre le spectre RMN ^1H *in vivo* acquis avant le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de DMSO (A) et le spectre RMN ^1H *in vivo* acquis 1 h 15 min après le début de la perfusion (B). (C) Superposition des deux spectres (A, en bleu et B, en rouge). Signaux : tCho : choline totale, tCr : créatine totale, tNAA : NAA total, Tau : taurine, mI : myo-inositol, Glx : glutamine + glutamate, Glu : glutamate, Lac : lactate, MM : macromolécules.

Cette superposition a permis de visualiser plus facilement les effets de la perfusion intratissulaire de la solution de LCR artificiel et de DMSO sur le profil métabolique du tissu cérébral sain.

La présence du signal de résonance du DMSO de forte amplitude à 2.7 ppm a ainsi confirmé la bonne détection par la micro-antenne RMN de la solution perfusée par le capillaire et s'étant diffusée au fur et à mesure dans le tissu cérébral sain.

Outre l'importante augmentation des niveaux de lactate et des macromolécules témoignant de la neurotoxicité du DMSO à 1.3 ppm et à 0.9 ppm, nous avons pu observer une forte augmentation de l'amplitude du signal de résonance du myo-inositol (mI) à 3.5 ppm sur le spectre RMN ^1H acquis avec la micro-antenne RMN du dispositif et 1 h 15

min après le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de DMSO par le capillaire.

Des expériences *in vitro* effectuées sur des cultures de neurones et d'astrocytes et traitées avec du DMSO ont montré qu'une réponse proliférative inattendue des astrocytes, cellules gliales possédant un fort taux de mI, pouvait avoir lieu [Zhang *et al.* (2016)]. En effet, une exposition à 0.5% et 1% de DMSO pendant 24 ou 48 heures a augmenté la prolifération de ces derniers malgré une perturbation nette de la viabilité et de la morphologie neuronale. Bien que des études supplémentaires soient nécessaires pour déterminer précisément les mécanismes sous-jacents impliqués dans cette prolifération astrocytaire, les auteurs ont rapporté qu'il pouvait s'agir d'une réponse au stress cellulaire impliquée à la fois dans la neuroprotection à court terme et dans la suppression à long terme de la régénération neuronale.

Ainsi, à travers cette étude *in vivo* menée sur des cerveaux de rats sains, nous avons pu mettre en évidence le bon fonctionnement du dispositif implanté dans le tissu cérébral sain et constitué d'une micro-antenne RMN et d'un capillaire d'injection.

La perfusion par le capillaire d'injection et la diffusion de la solution de LCR artificiel et de DMSO dans le tissu cérébral ont pu être suivies, en temps réel, par des expériences de SRM ^1H *in vivo* effectuées avec la micro-antenne RMN.

5.3.2 Expériences *in vivo* sur des cerveaux d'animaux porteurs d'un gliome C6

5.3.2.1 Détection et évaluation de l'efficacité thérapeutique de la molécule MN58b

Au cours de cette expérience, la solution composée de LCR artificiel et de MN58b à une concentration de 10 mM a été perfusée par le capillaire d'injection du dispositif préalablement implanté dans le gliome C6 avec un débit de 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Des spectres RMN ^1H *in vivo* ont été acquis avec la micro-antenne RMN du dispositif et toutes les 45 min.

La **figure 5.17** présente les 6 spectres RMN acquis avec la micro-antenne RMN et durant la perfusion de la solution de LCR artificiel et de MN58b par le capillaire d'injection.

Une correction de la phase et une apodisation lorentzienne avec une constante d'apodisation de 7 Hz ont été réalisées.

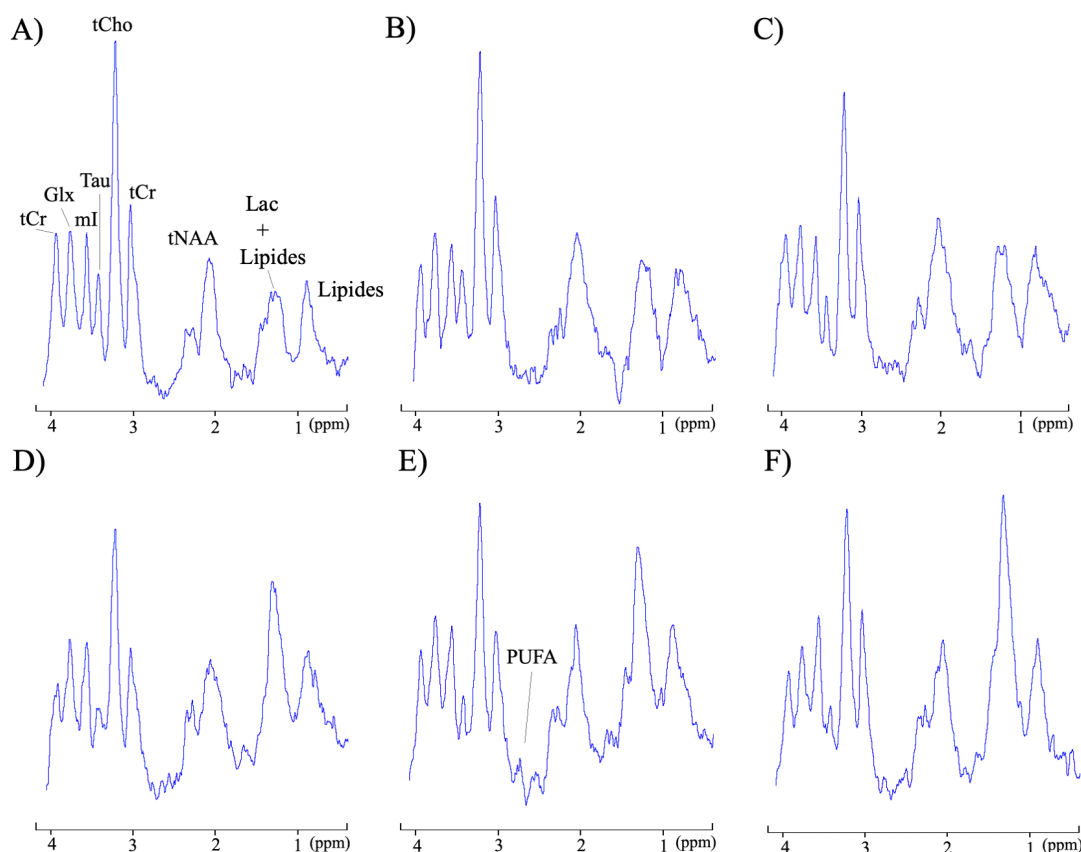


Figure 5.17. Spectres RMN ^1H *in vivo* acquis avec la micro-antenne RMN implantable du dispositif durant la perfusion (débit = $0.4 \mu\text{L}/\text{min}$) de la solution de LCR artificiel et de MN58b (10 mM) par le capillaire du dispositif. Le dispositif a été préalablement implanté dans le gliome C6. (A) $t = 0$, avant le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de MN58b, (B) $t = 45 \text{ min}$, (C) $t = 1 \text{ h } 30 \text{ min}$, (D) $t = 2 \text{ h } 15 \text{ min}$, (E) $t = 3 \text{ h}$, (F) $t = 3 \text{ h } 45 \text{ min}$. Les spectres RMN ^1H ont été acquis avec une séquence PRESS et avec les paramètres suivants : TR/TE = 2000/15.266 ms, taille du voxel = $2 \times 4 \times 2 \text{ mm}^3$, suppression de l'eau = VAPOR, nombre d'accumulations = 256, durée de l'acquisition = 8 min 32 s. Signaux : tCho : choline totale, tCr : créatine totale, tNAA : NAA total, Tau : taurine, mI : myo-inositol, Glx : glutamine + glutamate, Lac : lactate.

Le spectre RMN ^1H acquis avec la micro-antenne RMN et avant le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de MN58b (spectre A. de la figure précédente) était représentatif d'un spectre RMN typique d'un tissu cérébral tumoral avec un phénotype cholinique clairement observable.

Les FWHMs étaient de 15 Hz, 17 Hz, 20 Hz et 19 Hz pour les résonances de tCr (3.03 ppm), de tCho (3.20 ppm), de Glx (3.74 ppm) et de tCr (3.91 ppm), respectivement, témoignant d'une bonne qualité spectrale.

Ce spectre RMN ^1H *in vivo* acquis avant le début de la perfusion de la solution a ensuite été quantifié par le logiciel jMRUI et en suivant les différentes étapes du traitement des données spectroscopiques décrites dans le **paragraphe 4.2.4**. Pour établir les valeurs estimées des concentrations des métabolites, nous avons utilisé comme référence interne, la

valeur moyenne estimée de la concentration de la créatine totale (tCr) de 8.1 mmol/kg_{ww} chez les 8 rats porteurs d'un gliome C6 inclus dans l'étude présentée dans le **chapitre 4**. Le tableau suivant présente les valeurs estimées des concentrations des différents métabolites cérébraux chez le rat porteur d'un gliome C6 inclus dans cette étude. Bien que classée non pertinente par le critère des CRLBs, l'estimation de la concentration de NAA a été aussi présentée.

Tableau 5.2 – Valeurs des estimations des concentrations des différents métabolites cérébraux chez le rat porteur d'un gliome C6 avant le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de MN58b (mmol/kg_{ww}).

Métabolite	Étude (Avant le début de la perfusion de la solution)	Chapitre 4 (n = 8)
tCr	8.1	8.1 +/- 1.5
NAA	2.5	2.3 +/- 3.1
tCho	7.9	7.5 +/- 0.5
mI	13.8	16.8 +/- 3.5
Gln	10.4	12.0 +/- 2.5
Glu	11.0	12.0 +/- 1.8
Tau	15.5	18.1 +/- 2.3
Lac	2.0	4.1 +/- 1.2

Les estimations des concentrations des métabolites étaient alors en accord avec celles quantifiées dans le **chapitre 4** sur les 8 cerveaux d'animaux porteurs d'un gliome C6 et présentées dans le **tableau 4.3**. En effet, une concentration importante de tCho, de mI et de Tau et une concentration relativement faible de NAA ont été relevées.

Lors de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de MN58b par le capillaire d'injection, nous avons constaté une dégradation de la qualité de la suppression du signal de l'eau malgré un ajustement manuel des gains des impulsions et un important déphasage pouvant impacter les étapes d'identification et de quantification spectrales. C'est la raison pour laquelle le dernier spectre RMN a été acquis juste après l'arrêt de la perfusion afin d'obtenir un spectre RMN ayant une qualité spectrale similaire à celui acquis avant le début de la perfusion.

Malgré les perturbations spectrales causées par la perfusion de la solution, nous avons pu observer, en temps réel, une diminution légère de l'amplitude du signal de résonance de la choline totale (tCho) à 3.20 ppm et une forte augmentation de l'amplitude du signal de résonance du complexe lipides+lactate (Lac) à 1.3 ppm. Une diminution relativement importante de l'amplitude du signal de la taurine (Tau) à 3.42 ppm a également pu être

visualisée.

La superposition des deux spectres RMN ^1H *in vivo* acquis avec la micro-antenne RMN avant le début et 3 h 45 min après le début de la perfusion intratumorale de la solution de LCR artificiel et de MN58b a permis de visualiser plus facilement les changements métaboliques, biomarqueurs de l'effet de la molécule MN58b sur le tissu cérébral tumoral.

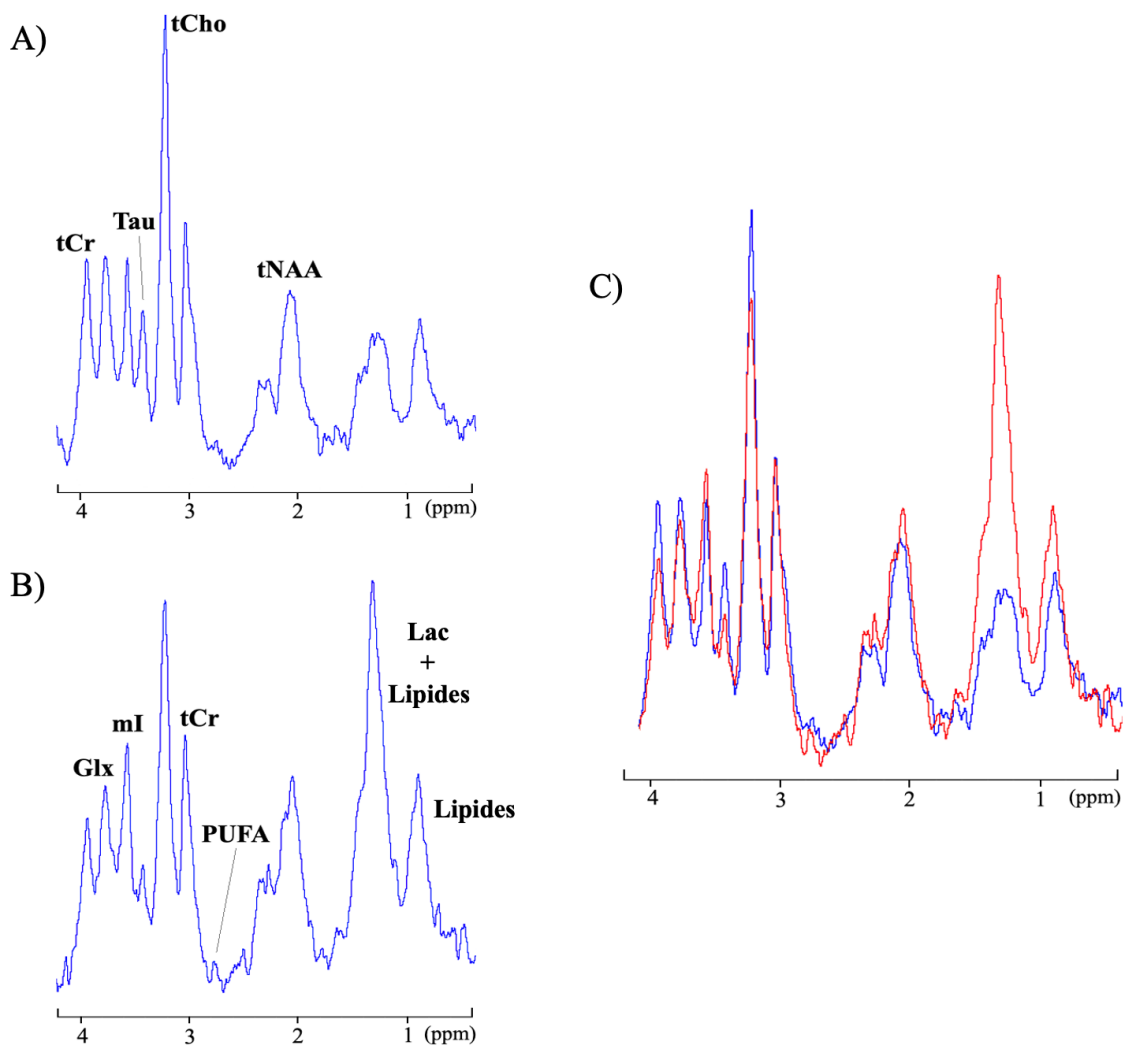


Figure 5.18. Comparaison spectrale entre le spectre RMN ^1H *in vivo* acquis avant le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de MN58b (A) et le spectre RMN ^1H *in vivo* acquis 3 h 45 min après le début de la perfusion (B). (C) Superposition des deux spectres (A, en bleu et B, en rouge). Signaux : tCho : choline totale, tCr : créatine totale, tNAA : NAA total, Tau : taurine, mI : myo-inositol, Glx : glutamine + glutamate, Lac : lactate, PUFA : acides gras polyinsaturés.

Comme observé ci-dessus, la perfusion et la diffusion intratumorale de la solution de LCR artificiel et de MN58b a entraîné une importante modification du profil métabolique représentatif du gliome C6 avec une diminution de l'amplitude du signal de résonance de tCho et de l'amplitude du signal de résonance de Tau et une augmentation de l'amplitude du signal de résonance du complexe Lipides+Lac. Nous avons également pu visualiser

l'apparition d'une résonance correspondant au signal des acides gras polyinsaturés (PUFA, pour *PolyUnsaturated Fatty Acid*, en anglais) à 2.8 ppm, bien qu'elle ait été relativement proche du niveau du bruit.

Afin de comparer quantitativement les variations des métabolites citées précédemment lors de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de MN58b, nous avons étudié la valeur du rapport entre les amplitudes du signal de résonance de tCho et du signal de résonance de tCr, celle du rapport entre les amplitudes du signal de résonance du complexe Lipides+Lac et du signal de résonance de tCr et celle du rapport entre les amplitudes du signal de résonance de Tau et du signal de résonance de tCr, obtenues avant et 3 h 45 min après le début de la perfusion de la solution. Nous avons également étudié l'évolution du rapport entre les amplitudes du signal de résonance de mI et du signal de résonance de tCr afin de faciliter la comparaison entre les résultats spectroscopiques obtenus suite à l'utilisation de la molécule MN58b ou de la molécule RSM-932A.

L'amplitude du signal de résonance de tCr, jugée relativement stable au cours de l'expérience, a été prise comme référence afin de réduire les biais introduits par la distorsion de la ligne de base et par les différences des corrections de phase des deux spectres RMN. Les amplitudes des différents signaux ont été obtenues par le logiciel TopSpin.

La **figure 5.19** présente l'histogramme comparatif des différents rapports (tCho/tCr, Lipides+Lac/tCr, Tau/tCr et mI/tCr) relevés sur les deux spectres RMN ^1H *in vivo* acquis avant et 3 h 45 min après le début de la perfusion intratumorale de la solution de LCR artificiel et de MN58b.

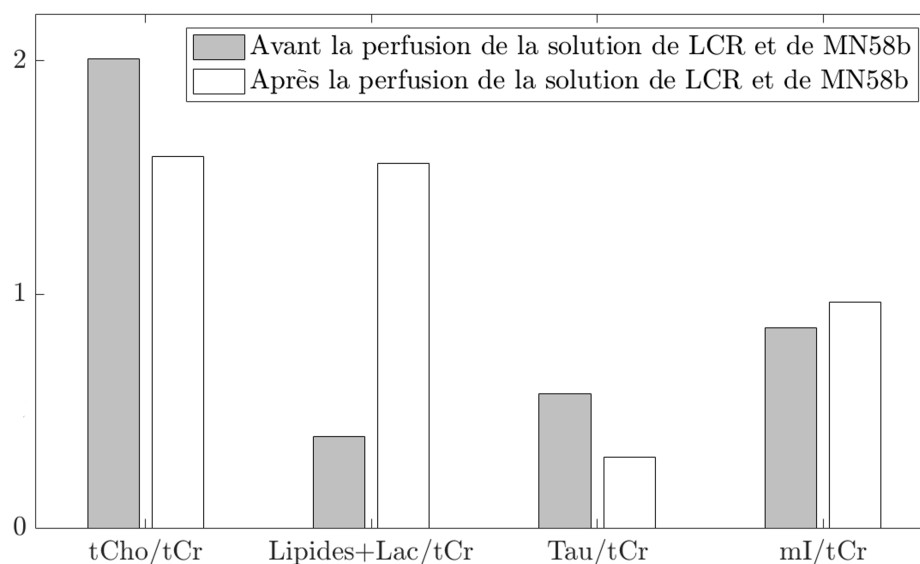


Figure 5.19. Histogramme illustrant les variations des rapports entre les amplitudes du signal des différents métabolites (tCho/tCr, Lipides+Lac/tCr, Tau/tCr et mI/tCr) avant (barres grises) et 3 h 45 min après (barres blanches) le début de la perfusion intratumorale de la solution de LCR artificiel et de MN58b.

Suite à la perfusion intratumorale de la solution de LCR artificiel et de MN58b par le capillaire du dispositif préalablement implanté dans le gliome C6, nous avons ainsi pu constater une diminution de 20% du rapport entre les amplitudes du signal de résonance de tCho et du signal de résonance de tCr, une forte augmentation de 299% du rapport entre les amplitudes du signal de résonance du complexe Lipides + Lac et du signal de résonance de tCr, une diminution de 47% du rapport entre les amplitudes du signal de résonance de Tau et du signal de résonance de tCr et une augmentation de 13% du rapport entre les amplitudes du signal de résonance de mI et du signal de résonance de tCr.

Les travaux de [Kumar *et al.* \(2015\)](#), dont les résultats spectroscopiques *in vivo* sont illustrés à la **figure 5.5**, ont également rapporté, après un traitement avec de la MN58b d'une durée de 5 jours, une réduction significative de la concentration de tCho (de l'ordre de 44%) et une forte augmentation significative de la concentration du complexe Lipides+Lac. Ils n'ont, cependant, pas étudié la variation du signal de résonance de Tau suite à un traitement avec la molécule MN58b.

La diminution de l'amplitude du signal de résonance de la choline totale (tCho) a alors été interprétée comme un témoin de l'efficacité de l'inhibition de la CHK α . Dans la littérature, cette diminution a été particulièrement associée à une réponse positive suite à un traitement de chimiothérapie conventionnel appuyant alors le rôle des composés à choline comme biomarqueurs potentiels de l'évaluation de la réponse thérapeutique [[McCann *et al.* \(2009\)](#)].

[Kumar *et al.* \(2015\)](#) ont aussi rapporté que l'augmentation de l'amplitude du signal de résonance du complexe lipides + lactate (Lac) à 1.3 ppm et l'apparition du signal de résonance des acides gras polyinsaturés à 2.8 ppm étaient des biomarqueurs caractéristiques d'une réponse cellulaire tumorale suite à un traitement avec la molécule MN58b. Ces modifications métaboliques ont été désignées comme étant des marqueurs de l'induction apoptotique des cellules tumorales [[Liimatainen *et al.* \(2008\)](#)]. Les auteurs ont également suggéré que l'augmentation du signal de résonance du complexe lipides + lactate pouvait refléter le début d'une nécrose tumorale. D'autres travaux ont aussi rapporté qu'une augmentation de la contribution totale des lipides dans les cellules tumorales pouvait évoquer la présence de différents mécanismes de réponses cellulaires au stress induit par le traitement anticancéreux [[Hakumäki *et al.* \(1999\)](#); [Milkevitch *et al.* \(2005\)](#); [Delikatny *et al.* \(2011\)](#)].

De plus, nous avons précédemment vu, dans le **chapitre 4**, qu'une augmentation de la concentration de la taurine (Tau) était observable dans les gliomes C6 et était associée à une forte croissance maligne. Par conséquent, nous avons supposé qu'une diminution de l'amplitude du signal de résonance de la taurine pouvait alors refléter l'effet antitumoral de la molécule MN58b. Une étude effectuée sur des modèles animaux de carcinomes a, par exemple, montré que les tumeurs répondant à un traitement de virothérapie antitumorale présentaient des taux de taurine significativement plus bas que les tumeurs non traitées

et que celles ne répondant pas au traitement [Hemminki *et al.* (2014)].

5.3.2.2 Détection et évaluation de l'efficacité thérapeutique de la molécule RSM-932A

Au cours de cette expérience, la solution composée de LCR artificiel et de RSM-932A à une concentration de 2 mM a été perfusée par le capillaire du dispositif préalablement implanté dans le gliome C6 avec un débit de 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Des spectres RMN ^1H *in vivo* ont été acquis avec la micro-antenne RMN du dispositif et toutes les 45 min.

La **figure 5.20** présente les 6 spectres RMN acquis avec la micro-antenne RMN et durant la perfusion de la solution de LCR artificiel et de RSM-932A par le capillaire d'injection. Une correction de la phase et une apodisation lorentzienne avec une constante d'apodisation de 7 Hz ont été réalisées.

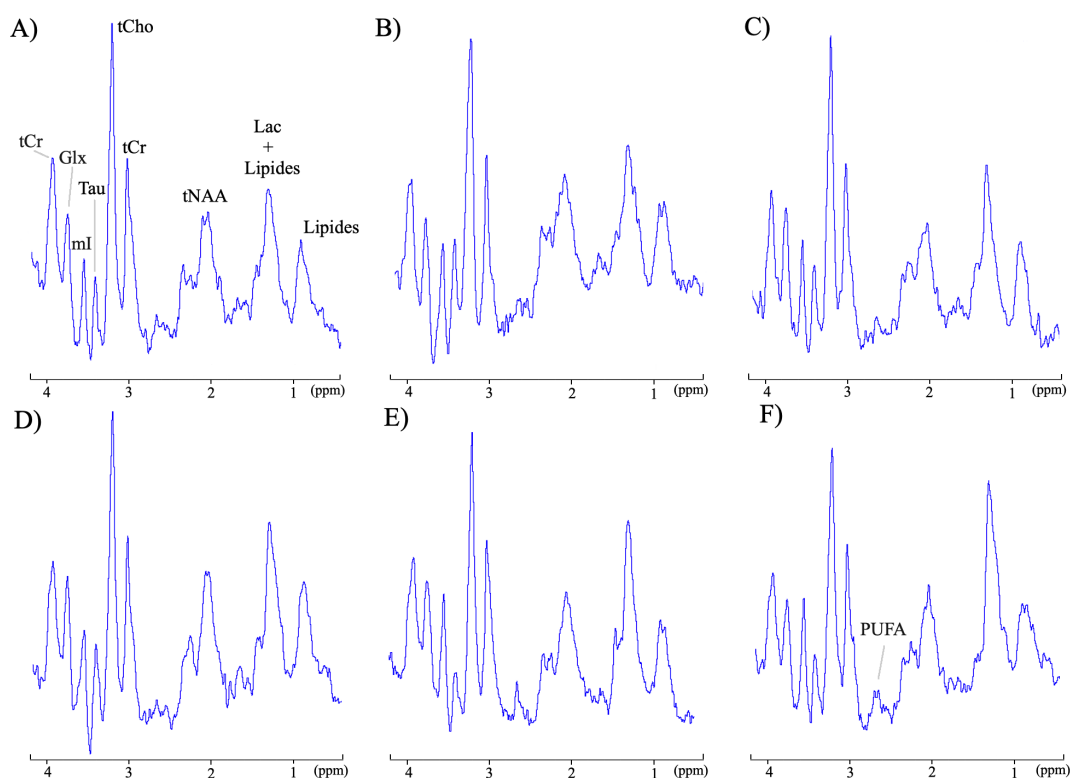


Figure 5.20. Spectres RMN ^1H *in vivo* acquis avec la micro-antenne RMN implantable du dispositif durant la perfusion (débit = 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$) de la solution de LCR artificiel et de RSM-9321A (2 mM) par le capillaire du dispositif. Le dispositif a été préalablement implanté dans le gliome C6. (A) $t = 0$, avant le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de RSM-932A, (B) $t = 45$ min, (C) $t = 1$ h 30 min, (D) $t = 2$ h 15 min, (E) $t = 3$ h, (F) $t = 3$ h 45 min. Les spectres RMN ^1H ont été acquis avec une séquence PRESS et avec les paramètres suivants : TR/TE = 2000/15.266 ms, taille du voxel = $2 \times 4 \times 2$ mm³, suppression de l'eau = VAPOR, nombre d'accumulations = 256, durée de l'acquisition = 8 min 32 s. Signaux : tCho : choline totale, tCr : créatine totale, tNAA : NAA total, Tau : taurine, mI : myo-inositol, Glx : glutamine + glutamate, Lac : lactate.

Comme dans l'étude portant sur l'efficacité antitumorale de la molécule MN58b présentée dans la partie précédente, le spectre RMN ^1H acquis avec la micro-antenne RMN et avant le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de RSM-932A (spectre A. de la figure précédente) présentait les caractéristiques métaboliques d'un tissu cérébral tumoral, dont un phénotype cholinique.

Les FWHMs étaient de 20 Hz, 19 Hz, 20 Hz et 24 Hz pour les résonances de tCr (3.03 ppm), de tCho (3.20 ppm), de Glx (3.74 ppm) et de tCr (3.91 ppm), respectivement, témoignant d'une bonne qualité spectrale.

Le tableau suivant présente les valeurs estimées des concentrations des différents métabolites cérébraux chez le rat porteur d'un gliome C6 inclus dans cette étude et quantifiées par le logiciel jMRUI et en suivant les étapes décrites dans le **paragraphe 4.2.4**. La valeur moyenne estimée de la concentration de la créatine totale (tCr) de 8.1 mmol/kg_{ww} chez les 8 rats porteurs d'un gliome C6 inclus dans l'étude présentée dans le chapitre précédent a été utilisée comme référence interne.

Tableau 5.3 – Valeurs des estimations des concentrations des différents métabolites cérébraux chez le rat porteur d'un gliome C6 avant le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de RSM-932A (mmol/kg_{ww}).

Métabolite	Étude (Avant le début de la perfusion de la solution)	Chapitre 4 (n = 8)
tCr	8.1	8.1 +/- 1.5
NAA	1.9	2.3 +/- 3.1
tCho	8.0	7.5 +/- 0.5
mI	12.1	16.8 +/- 3.5
Gln	9.7	12.0 +/- 2.5
Glu	11.0	12.0 +/- 1.8
Tau	14.3	18.1 +/- 2.3
Lac	3.4	4.1 +/- 1.2

Les estimations des concentrations des métabolites étaient elles aussi en accord avec celles quantifiées dans le **chapitre 4** sur les 8 cerveaux d'animaux porteurs d'un gliome C6 confirmant à nouveau le caractère reproductible et fiable des mesures spectroscopiques obtenues avec les micro-antennes RMN implantables.

L'injection continue intratumorale de la solution de LCR artificiel et de RSM-932A est allée de pair avec une augmentation de l'amplitude du signal de résonance du complexe lipides + lactate (Lac) à 1.3 ppm, de l'amplitude du signal de résonance du myo-inositol (mI) à 3.5 ppm et de l'amplitude du signal de résonance des acides gras polyinsaturés

(PUFA) à 2.8 ppm et une diminution de l'amplitude du signal de résonance de la choline totale (tCho) à 3.20 ppm.

Ces observations spectroscopiques, témoins de l'effet métabolique de la molécule RSM-932A sur le tissu cérébral tumoral, ont été plus facilement identifiables sur la superposition des deux spectres RMN ^1H *in vivo* acquis avec la micro-antenne RMN avant et 3 h 45 après le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de RSM-932A et présentée dans la figure suivante.

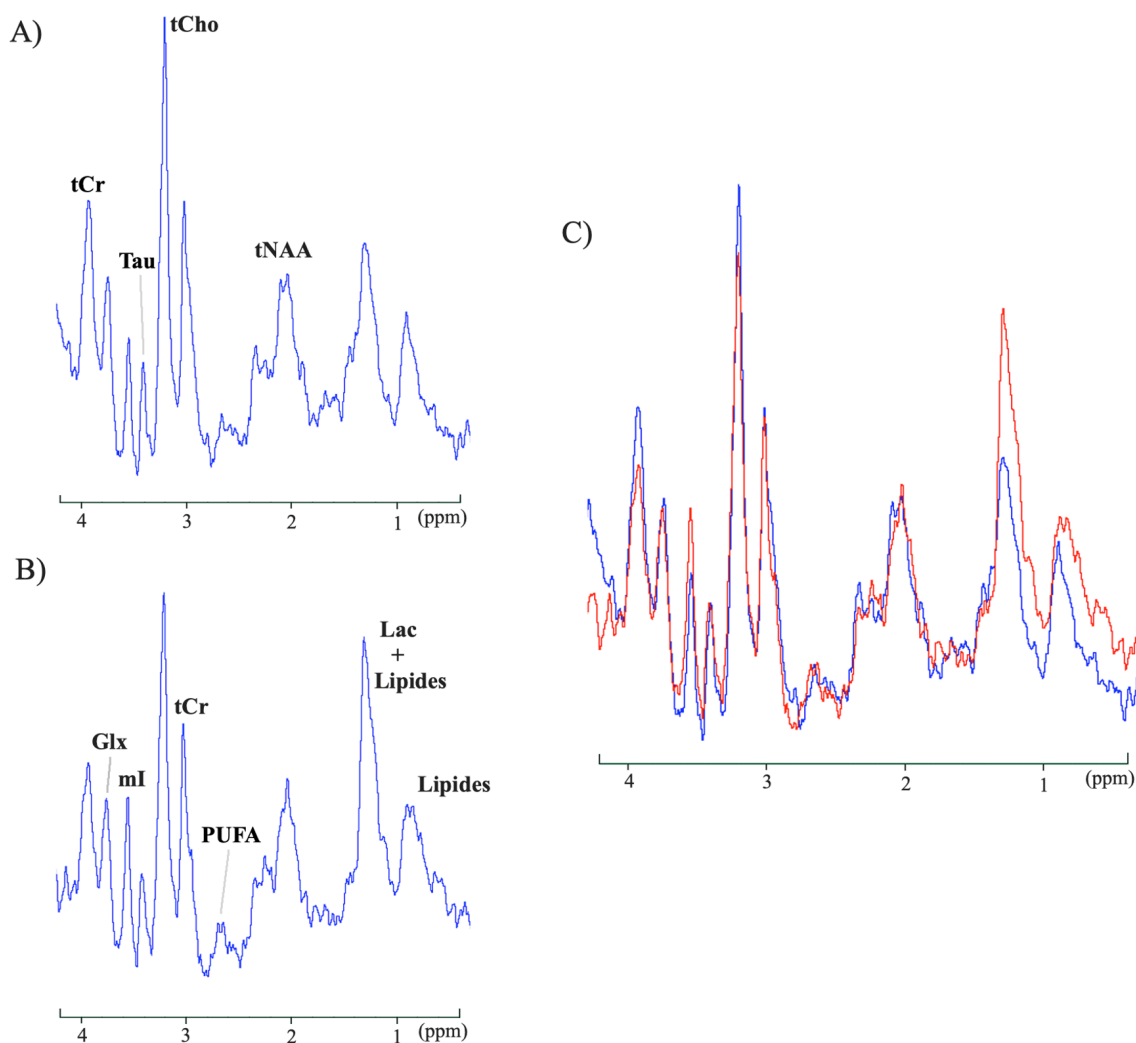


Figure 5.21. Comparaison spectrale entre le spectre RMN ^1H *in vivo* acquis avant le début de la perfusion de la solution de LCR artificiel et de RSM-932A (A) et le spectre RMN ^1H *in vivo* acquis 3 h 45 min après le début de la perfusion (B). (C) Superposition des deux spectres (A, en bleu et B, en rouge). Signaux : tCho : choline totale, tCr : créatine totale, tNAA : NAA total, Tau : taurine, mI : myo-inositol, Glx : glutamine + glutamate, Lac : lactate, PUFA : acides gras polyinsaturés.

A partir des deux spectres RMN de la figure précédente, nous avons, de la même manière que lors de l'étude portant sur l'efficacité thérapeutique de la molécule MN58B, étudié l'évolution des rapports des amplitudes des signaux de résonances suivants : tCho/tCr,

Lipides + Lac/tCr, Tau/tCr et mI/tCr.

L'amplitude du signal de résonance de tCr, jugée relativement stable au cours de l'expérience, a été prise comme référence afin de réduire les biais introduits par la distorsion de la ligne de base et par les différences des corrections de phase des deux spectres RMN. Les amplitudes des différents signaux ont été obtenues par le logiciel TopSpin.

La **figure 5.22** présente l'histogramme comparatif des différents rapports (tCho/tCr, Lipides+Lac/tCr, Tau/tCr et mI/tCr) relevés sur les deux spectres RMN ^1H *in vivo* acquis avant et 3 h 45 min après le début de la perfusion intratumorale de la solution de LCR artificiel et de RSM-932A.

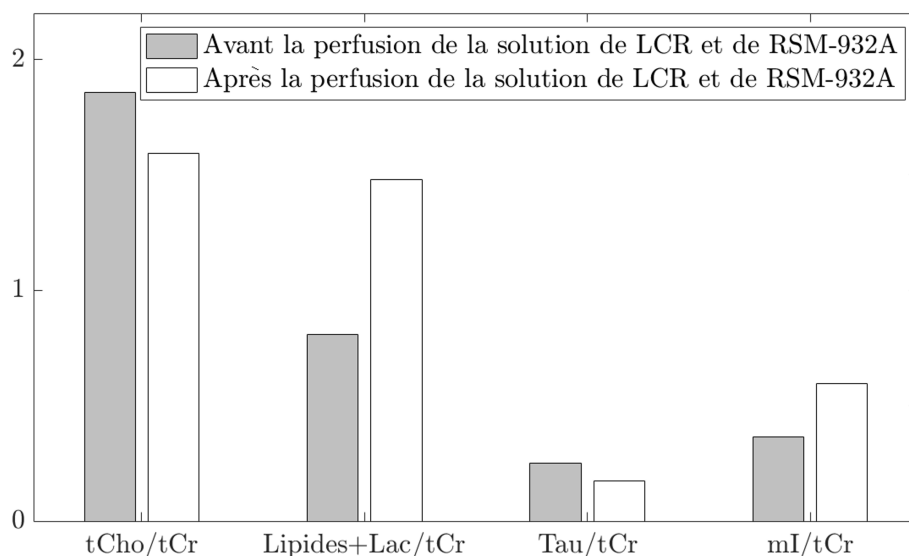


Figure 5.22. Histogramme illustrant les variations des rapports entre les amplitudes du signal des différents métabolites (tCho/tCr, Lipides+Lac/tCr, Tau/tCr et mI/tCr) avant (barres grises) et 3 h 45 min après (barres blanches) le début de la perfusion intratumorale de la solution de LCR artificiel et de RSM-932A.

Nous avons ainsi pu constater, suite à la perfusion intratumorale de la solution de LCR artificiel et de RSM-932A, une diminution de 14% du rapport entre les amplitudes du signal de résonance de tCho et du signal de résonance de tCr, une augmentation de 84% du rapport entre les amplitudes du signal de résonance du complexe Lipides + Lac et du signal de résonance de tCr, une diminution de 31% du rapport entre les amplitudes du signal de résonance de Tau et du signal de résonance de tCr et une augmentation de 63% du rapport entre les amplitudes du signal de résonance de mI et du signal de résonance de tCr.

Ces dernières tendances spectroscopiques ont été relativement similaires à celles obtenues lors de la perfusion intratumorale d'une solution de LCR artificiel et de MN58b et présentées dans le **paragraphe 5.3.2.1**, avec notamment une forte augmentation du rapport Lipides+Lac/tCr et une légère diminution du rapport tCho/tCr, témoins de l'efficacité de l'inhibition de la CHK α et de la mort cellulaire apoptotique des cellules tumorales.

Nous avons aussi observé une augmentation relativement importante du signal de résonance de mI (63%) que nous n'avons pas significativement visualisé lors de la perfusion intratumorale de la molécule MN58b avec une augmentation de seulement 13% du rapport mI/tCr.

Bien qu'aucune étude effectuée sur les molécules inhibitrices de la CHK α n'ait discuté des effets potentiels sur l'évolution du niveau de myo-inositol dans le tissu tumoral après un traitement par ces dernières, nous avons pu expliquer cette augmentation par différentes suppositions. Tout d'abord, la modification du micro-environnement tumoral et, en particulier, la modification de l'environnement osmotique, au cours de la perfusion intratumorale de la molécule RSM-932A, a pu induire une élévation de la concentration en myo-inositol, métabolite jouant un rôle important dans l'osmorégulation cellulaire du cerveau. Il a notamment été démontré que ce dernier pouvait être un biomarqueur particulièrement intéressant lors de l'étude de l'efficacité thérapeutique de traitements anti-angiogéniques chez des patients atteints de glioblastome récurrent [Steidl *et al.* (2016)]. De plus, l'augmentation de l'amplitude du signal de résonance du myo-inositol pourrait également s'expliquer par une réaction astrocytaire suite au stress cellulaire induit par la molécule RSM-932A sur les cellules tumorales causant alors une prolifération de ces dernières et une augmentation de la densité cellulaire, préalablement à la mort cellulaire apoptotique.

Ainsi, par l'utilisation du dispositif développé dans ce chapitre et combinant une micro-antenne RMN et un capillaire d'injection, nous avons été en mesure de suivre, en temps réel, les effets causés par une injection intratumorale de molécules inhibitrices de la choline kinase α sur le profil métabolique du tissu cérébral tumoral. Les variations métaboliques obtenues suite à des acquisitions de SRM effectuées avec la micro-antenne RMN du dispositif ont été alors caractéristiques d'une réponse antitumorale.

Bien que les deux molécules antitumorales étudiées dans cette partie aient été deux inhibiteurs de la CHK α , quelques petites variations des tendances spectroscopiques, témoins de l'effet de ces dernières sur le métabolisme tumoral, ont été observées.

Nous avons, en effet, rapporté :

- une diminution plus importante du rapport tCho/tCr lors d'une perfusion intratumorale de MN58b (20%) que de RSM-932A (14%) ;
- une augmentation plus importante du rapport Lipides+Lac/tCr lors d'une perfusion intratumorale de MN58b (299%) que de RSM-932A (84%) ;
- une diminution plus importante du rapport Tau/tCr lors d'une perfusion intratumorale de MN58b (47%) que de RSM-932A (31%) ;
- et, une augmentation plus importante du rapport mI/tCr lors d'une perfusion intratumorale de RSM-932A (63%) que de MN58b (13%).

Par la diminution plus importante du rapport tCho/tCr et par l'augmentation plus importante du rapport Lipides+Lac/tCr lors d'une perfusion intratumorale de MN58b, nous avons pu ainsi supposer que l'efficacité antitumorale de la molécule MN58b à une concentration de 10 mM semblait plus importante que l'efficacité antitumorale de la molécule RSM-932A à une concentration de 2 mM. Toutefois, quelques travaux portant sur l'étude de l'efficacité thérapeutique de différentes molécules inhibitrices de la CHK α ont démontré que la molécule RSM-932A était plus efficace que la molécule MN58b et mieux tolérée à des fortes doses [Lacal & Campos (2014)], indiquant alors que l'utilisation d'une concentration de 2 mM pour la molécule RSM-932A n'a potentiellement pas permis d'obtenir une réponse thérapeutique positive totale. À noter que nous avons pu obtenir une concentration maximale de RSM-932A de seulement 2 mM en raison de sa faible solubilité dans le LCR artificiel (2 mg/ml).

5.4 Conclusion et perspectives

Pour conclure, à travers ce chapitre, nous avons développé un nouvel outil implantable combinant une micro-antenne RMN et un moyen d'administration d'un composé d'intérêt tel qu'un capillaire d'injection.

L'objectif principal de cette étude a été de mettre en évidence l'aptitude de ce dispositif à détecter et à évaluer l'efficacité thérapeutique de molécules anticancéreuses chez un modèle animal de tumeurs cérébrales.

Les expériences préliminaires *in vitro* et *in vivo* sur des cerveaux d'animaux sains ont montré que l'association de ces deux entités était tout à fait réalisable et pertinente.

En effet, l'étude *in vivo* a, par exemple, permis de visualiser, en temps réel et par des mesures spectroscopiques effectuées avec la micro-antenne RMN, l'effet d'une solution de LCR artificiel et de DMSO perfusée par le capillaire d'injection dans le tissu cérébral sain sur le profil métabolique de ce dernier. Une augmentation de l'amplitude du signal de résonance du complexe lipides+lactate, témoin du caractère neurotoxique du DMSO, a notamment été observée au cours de la perfusion de la solution. La détection RMN optimale de la micro-antenne RMN et la perfusion et la diffusion homogène de la solution d'intérêt dans le tissu cérébral sain ont ainsi été conservées.

Le bon fonctionnement de la micro-antenne RMN implantable et celui du capillaire d'injection ont alors été maintenus malgré l'existence de petites fluctuations de la qualité spectrale des spectres RMN acquis avec la micro-antenne RMN du dispositif, causées par les effets de flux lors de la perfusion de la solution par le capillaire placé au centre de la boucle de détection de cette dernière.

Par la suite, nous avons choisi d'évaluer l'utilisation du dispositif dans un cadre pathologique. Pour cela, un modèle animal de tumeurs cérébrales, le gliome C6, et deux molécules thérapeutiques, la MN58b et la RSM-932A, des inhibiteurs de la choline kinase α , ont été

choisis. L'efficacité antitumorale de ces dernières a ainsi pu être observée, en temps réel, au cours de la perfusion intratumorale d'une solution contenant du LCR artificiel et de la MN58b et d'une solution contenant du LCR artificiel et de la RSM-932A. Une diminution de l'amplitude du signal de résonance de la choline totale et une augmentation de l'amplitude du signal de résonance du complexe lipides+lactate, témoignant de l'inhibition de la choline kinase α et de l'effet anticancéreux par l'induction de l'apoptose cellulaire tumorale, ont été constatées.

Ainsi, grâce à l'administration intratumorale par le capillaire d'injection et à la micro-antenne RMN positionnée à proximité immédiate de la zone d'administration de la solution d'intérêt contenant une molécule anticancéreuse, l'efficacité antitumorale de cette dernière a pu être évaluée très localement et très rapidement contrairement à une grande majorité d'études précliniques relativement longues notamment à cause de l'administration du traitement évalué sur plusieurs jours voire plusieurs semaines.

Le développement de cet outil et les applications *in vivo* effectuées au cours de ce chapitre ont alors permis d'envisager d'autres utilisations.

Plus précisément, similairement aux expériences de SRM effectuées avec la micro-antenne RMN, des images IRM du micro-environnement tumoral pourraient être acquises au cours de la perfusion d'une molécule anticancéreuse afin d'évaluer les variations structurales et morphologiques pouvant être induites par la thérapie telles qu'une nécrose, un oedème, une fibrose ou encore une modification de la vascularisation. Nous avons vu, dans le **chapitre 4**, qu'il était, en effet, tout à fait possible d'observer les foyers nécrotiques et la néoangiogenèse tumorale des gliomes C6 suite à l'acquisition d'images IRM à haute résolution spatiale avec les micro-antennes RMN implantables.

Outre l'appréciation de l'efficacité antitumorale, la réalisation d'expériences d'IRM et de SRM pourrait aussi permettre d'évaluer les profils pharmacocinétiques et la distribution *in vivo* tumorale de la molécule anticancéreuse administrée par le capillaire du dispositif. Ces informations supplémentaires pourraient alors faciliter la compréhension des différents modes d'action des molécules thérapeutiques étudiées de façon localisée.

En clinique, notamment, il a été rapporté que l'insuffisance de données pharmacocinétiques et/ou pharmacodynamiques pouvait rendre difficile le choix de la dose thérapeutique à administrer et que la variabilité interindividuelle pharmacocinétique pouvait fortement affecter l'efficacité et la tolérabilité du traitement médicamenteux.

Concernant les limitations de cette étude, la principale a été le nombre limité d'animaux sains et pathologiques utilisés. En effet, le nombre restreint d'expériences *in vivo* menées sur des cerveaux d'animaux pathologiques n'a pas permis d'évaluer la reproductibilité de l'effet thérapeutique des deux molécules inhibitrices de la choline kinase α sur le profil métabolique du tissu cérébral tumoral. Toutefois, l'observation d'effets métaboliques quasi-identiques que ceux rapportés dans la littérature portant sur l'utilisation des ces

molécules comme drogues anticancéreuses a permis de consolider le fait que nos résultats spectroscopiques obtenus avec la micro-antenne RMN étaient bien représentatifs de la réponse thérapeutique attendue. De plus, la réalisation d'expériences contrôles *in vivo* menées sur des cerveaux d'animaux porteurs d'un gliome C6 avec la perfusion d'une solution de LCR artificiel uniquement pourrait aussi permettre de confirmer, en l'absence d'une modification du profil métabolique tumoral, que les variations spectroscopiques observées lors de la perfusion intratumorale de molécules inhibitrices de la choline kinase α sont entièrement dues à la réponse thérapeutique.

L'une des perspectives centrales que nous avons pu aussi évoquer est l'utilisation d'un autre moyen d'administration tel qu'une membrane de microdialyse pour l'injection intratissulaire du composé d'intérêt.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons déjà commencé à travailler sur l'association d'une micro-antenne RMN implantable ayant une largeur de 700 μm et une longueur de 3 mm et une membrane de microdialyse ayant une longueur de 2 mm et un diamètre externe de 0.240 mm (CMA Microdialysis AB, Solna, Suède). La membrane utilisée était en cuprophane et possédait un *cut-off* de 6 kDa.

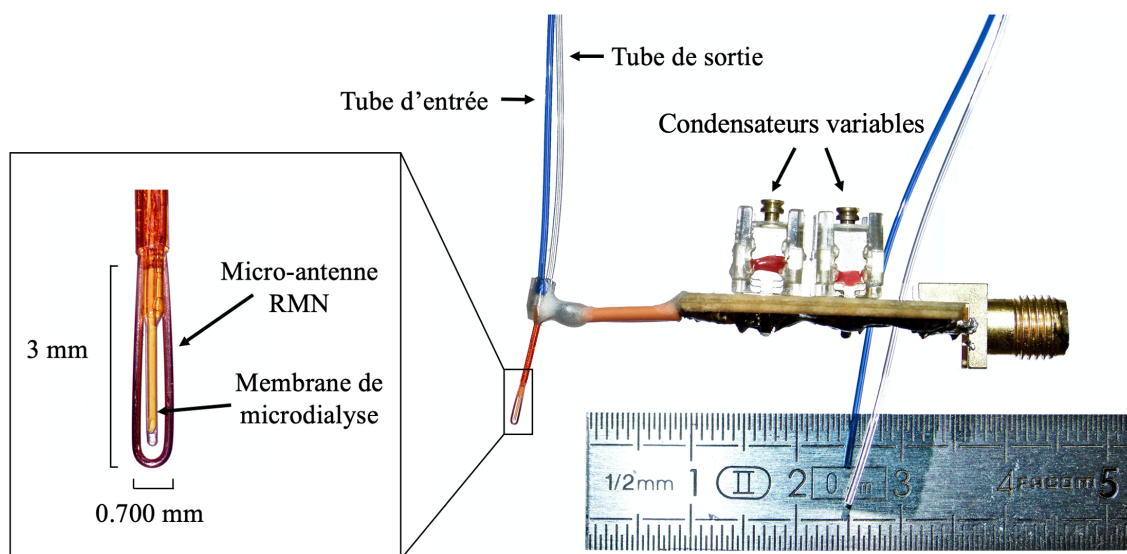


Figure 5.23. (A) Association d'une micro-antenne RMN implantable ayant une longueur de 3 mm et une largeur de 700 μm et d'une membrane de microdialyse ayant une longueur de 2 mm et un diamètre externe de 0.24 mm. Le *cut-off* de la membrane était de 6 kDa. (B) Photographie du dispositif et de ses principaux éléments (circuit électronique de la micro-antenne RMN implantable et tubes d'entrée et de sortie de la membrane de microdialyse).

L'idée de cette association a été principalement évoquée suite à la réalisation de deux travaux de l'équipe ayant porté sur l'utilisation d'un micro-solénoïde externe entourant un capillaire dont l'entrée était reliée à la sortie d'une membrane de microdialyse implantée

dans le cerveau du rat [Crémillieux *et al.* (2018, 2019)].

Dans l'étude datant de 2019, aussi présentée dans le **paragraphe 2.3.2.1**, la membrane de microdialyse était implantée dans le gliome C6 de rats pathologiques et une molécule antitumorale, l'oxamate, était perfusée par cette dernière. La perfusion de la solution d'intérêt s'est basée sur la technique de microdialyse inverse décrite dans le **paragraphe 2.4.1**. Au cours de cette étude, la diminution de la concentration extracellulaire de lactate a pu être suivie au cours de la perfusion intratumorale d'oxamate et par des mesures spectroscopiques ^1H *in vivo* effectuées sur le dialysat par le micro-solénoïde externe. L'oxamate est, en effet, connu pour son effet inhibiteur compétitif du lactate déshydrogénase, une enzyme catalysant la conversion du pyruvate en lactate et dont le taux a été rapporté comme étant plus élevé dans les tumeurs [Valvona *et al.* (2015)].

Par rapport à ce dispositif combinant un micro-solénoïde externe et une membrane de microdialyse et au dispositif développé dans ce chapitre et associant une micro-antenne RMN implantable et un capillaire d'injection, l'outil composé d'une micro-antenne RMN implantable et d'une membrane de microdialyse permettrait alors :

- de perfuser un composé d'intérêt de manière moins traumatique pour le tissu implanté par la technique de microdialyse inverse par rapport à l'utilisation d'un capillaire d'injection ;
- de pouvoir associer des mesures de concentrations extracellulaires effectuées a posteriori sur le dialysat recueilli au cours de la circulation de la solution d'intérêt à travers la membrane de microdialyse aux mesures spectroscopiques effectuées avec la micro-antenne RMN reflétant à la fois les contributions extracellulaires et intracellulaires ;
- et, bien sûr, de pouvoir réaliser des expériences *in vivo* d'IRM et de SRM, en temps réel, du tissu impacté par le composé d'intérêt administré par la membrane de microdialyse. À ce jour, les premiers essais *in vitro* et *in vivo* effectués avec le dispositif combinant une micro-antenne RMN implantable et une membrane de microdialyse n'ont pas été concluants.

Tout d'abord, nous nous sommes régulièrement aperçu, préalablement aux expériences RMN, que la membrane de microdialyse pouvait être facilement endommagée entraînant la rupture de cette dernière. Sa fragilité importante a alors rendu plus délicate la construction et la manipulation de ce dispositif.

De plus, nous avons, comme pour le dispositif implantable combinant une micro-antenne RMN et un capillaire d'injection, souhaité étudier, par des expériences *in vitro*, la diffusion d'une solution d'intérêt perfusée par la membrane de microdialyse de ce dispositif. Pour cela, le dispositif associant une micro-antenne RMN et une membrane de microdialyse a été implanté dans du gel d'agarose à 1% et une solution de bleu de méthylène a été perfusée à travers la membrane avec un débit de 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$.

La **figure 5.24** illustre la diffusion de la solution de bleu de méthylène dans le gel d'agarose à 1% au cours de la perfusion par la membrane de microdialyse.

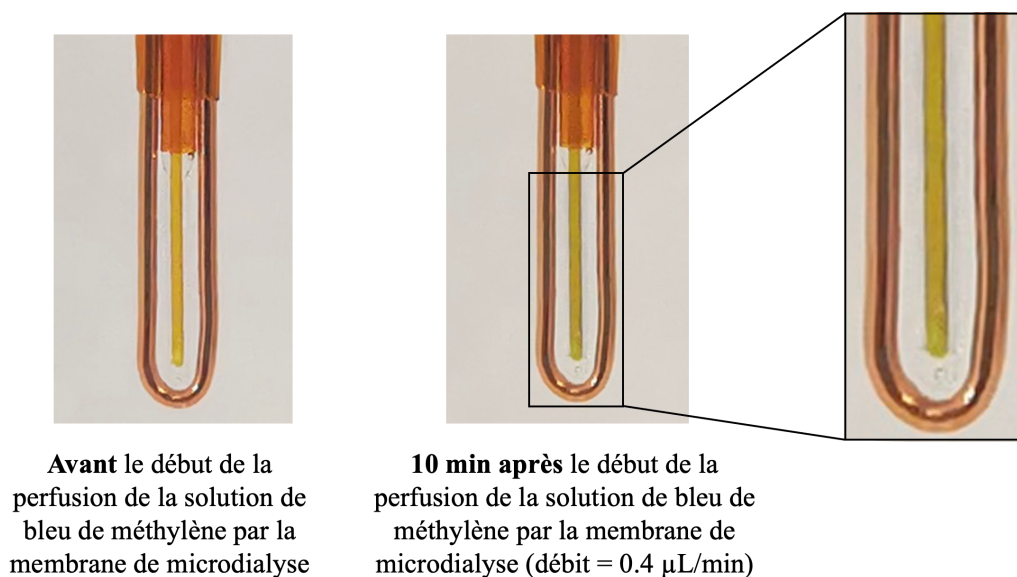


Figure 5.24. Diffusion de la solution de bleu de méthylène dans le gel d'agarose à 1% au cours de la perfusion (débit = 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$) par la membrane de microdialyse du dispositif.

Nous avons alors pu constater, sur la photographie prise 10 min après le début de la perfusion de la solution de bleu de méthylène par le membrane de microdialyse, que le conduit interne de cette dernière, initialement de couleur jaune, était de teinte plus bleutée, témoignant d'une bonne circulation de la solution perfusée dans les conduits constitutifs de la membrane.

De plus, seule une région extrêmement proche du conduit interne et très légèrement bleutée a été aussi identifiable.

Nous en avons conclu que la diffusion de la solution de bleu de méthylène s'effectuait uniquement dans une région extrêmement proche de la membrane de microdialyse sans impacter la zone située dans l'entièreté du volume de détection de la micro-antenne RMN comme cela était le cas lors de la perfusion avec le capillaire d'injection.

D'autres réflexions futures devront ainsi être menées pour améliorer la perfusion d'une solution d'intérêt et la détection RMN de cette dernière comme, par exemple, diminuer la largeur de la boucle de détection de la micro-antenne RMN afin d'être encore plus proche de la zone de diffusion de la membrane de microdialyse en dépit d'une diminution du volume de détection ou encore l'utilisation d'une membrane de microdialyse ayant d'autres caractéristiques telles qu'une longueur ou un *cut-off* plus importants.

Conclusion générale et perspectives

6.1 Conclusion générale

Les travaux présentés dans ce manuscrit se sont inscrits dans une démarche de recherche continue portant sur l'amélioration de la sensibilité intrinsèque des deux principales techniques de la RMN, l'IRM et la SRM, par le développement d'antennes RMN miniatures et implantables. Ce dernier représente, en effet et depuis quelques années, un moyen couramment utilisé pour s'affranchir de la faible sensibilité de la RMN en augmentant le RSB et pouvant ainsi faciliter les études morphologiques, fonctionnelles et spectroscopiques afin de mieux comprendre les processus physiologiques et pathologiques en recherche clinique et préclinique.

Tout au long de ce projet de thèse, principalement d'ordre expérimental et interdisciplinaire, le fil conducteur a été d'élaborer un modèle de micro-antennes RMN implantables simple, reproductible, peu onéreux et capable d'analyser, par des expériences RMN *in vivo*, des échantillons biologiques de faible volume (de l'ordre du μL) en se focalisant principalement sur l'étude du tissu cérébral dans des conditions saines et pathologiques chez le petit animal.

Cette thèse a été réalisée à l'interface de la physique de la RMN incluant l'IRM et la SRM, de l'électronique et de la biologie et sa réalisation a nécessité diverses étapes.

Tout d'abord, nous avons développé deux micro-antennes RMN possédant des boucles elliptiques résonantes et implantables, en cuivre, de différentes dimensions.

Nous avons montré, par des simulations RF et des expériences RMN *in vitro*, que l'utilisation de ces dernières permettait d'avoir une haute sélectivité spatiale par leurs faibles volumes de détection (550 nL et 1 μL) et une sensibilité de détection améliorée par l'obtention d'un facteur de gain moyen en sensibilité valant 55 ou 119 par rapport à l'utilisation d'une antenne conventionnelle extracorporelle.

De plus, les limites de détection obtenues pour différents métabolites cérébraux et par des expériences *in vitro* réalisées avec les micro-antennes RMN implantables ont été relativement proches des concentrations *in vivo* chez le petit animal rapportées dans la littérature. Cette première contribution a alors consolidé le fait que l'utilisation de ces micro-antennes RMN implantables était prometteuse pour l'exploration cérébrale *in vivo* de régions d'in-

térêt de faible volume chez le petit animal.

Par la suite, nous avons démontré le potentiel des micro-antennes RMN implantables à distinguer un tissu cérébral sain d'un tissu cérébral tumoral lors d'expériences RMN *in vivo* effectuées avec ces dernières chez des rats sains et chez des rats porteurs d'un modèle de tumeurs cérébrales, le gliome C6.

Dans un premier temps, le maintien de l'intégrité du tissu implanté et donc le caractère mini-invasif des micro-antennes RMN implantables ont été établis par la réalisation d'expériences RMN *in vivo* sur des cerveaux d'animaux sains. Les concentrations des métabolites cérébraux estimées à partir des spectres RMN acquis avec les micro-antennes RMN implantables étaient, en effet, en accord avec celles obtenues à partir des spectres RMN acquis avec des antennes conventionnelles externes et rapportées dans la littérature montrant alors que le métabolisme du tissu cérébral sain implanté n'a pas été impacté par la présence de la micro-antenne RMN. De plus, l'utilisation d'une cohorte de 12 rats sains a mis en évidence le caractère reproductible et fiable des mesures spectroscopiques *in vivo* acquises avec les micro-antennes RMN implantables.

Dans un second temps, ces dernières ont été implantées chez une cohorte de 8 rats porteurs d'un gliome C6 dans le but de caractériser le profil métabolique et la structure morphologique du micro-environnement du tissu cérébral tumoral. La réalisation de spectres RMN et d'images IRM à haute résolution spatiale avec les micro-antennes RMN implantables a ainsi permis de mettre en évidence les différenciations métaboliques et morphologiques entre un tissu cérébral sain et un tissu cérébral tumoral sur des échantillons de faible volume. En particulier, le tissu cérébral tumoral a été facilement distingué par le phénotype cholinique, principal caractéristique métabolique dans un grand nombre de tumeurs, et par la présence de foyers nécrotiques et d'une néoangiogenèse tumorale, respectivement, observables sur les spectres RMN et sur les images IRM acquis avec les micro-antennes RMN implantées dans le gliome C6 des 8 rats pathologiques.

Cette seconde contribution a ainsi validé un exemple d'application *in vivo* des micro-antennes RMN implantables développées au cours de cette thèse, application rendue possible par le juste compromis entre leur caractère mini-invasif et leurs performances électromagnétiques.

La troisième contribution de ce projet de thèse a porté sur le développement d'un dispositif implantable combinant une micro-antenne RMN et un système d'injection d'un composé d'intérêt tel qu'un capillaire d'injection.

Les principaux objectifs de ce dispositif étaient de détecter et d'évaluer la réponse thérapeutique de deux molécules anticancéreuses et inhibitrices de la choline kinase α par des expériences de SRM ^1H *in vivo* effectuées avec la micro-antenne RMN et au cours de la perfusion intratumorale de ces dernières par le capillaire d'injection. L'originalité de cette étude, par rapport à la littérature, a été de pouvoir suivre, très localement et en temps

réel, les effets des molécules anticancéreuses sur le profil métabolique typique du tissu cérébral tumoral par des variations des niveaux de certains métabolites cérébraux connus pour être des biomarqueurs caractéristiques d'une efficacité thérapeutique antitumorale. Au préalable, le maintien du bon fonctionnement de la micro-antenne RMN et du capillaire d'injection a été évalué par des expériences RMN *in vitro* et *in vivo* sur des cerveaux d'animaux sains. Ces dernières ont montré que l'association de ces deux entités ne perturbait ni la détection par la micro-antenne RMN et ni la perfusion par le capillaire d'injection. Lors des expériences *in vivo* sur des cerveaux d'animaux sains, nous avons pu évaluer, en temps réel, le caractère neurotoxique du DMSO administré directement au sein du tissu cérébral sain par l'augmentation du niveau du complexe lipides + lactate à 1.3 ppm sur le spectre RMN acquis avec la micro-antenne RMN.

De la même manière, lors de la perfusion intratumorale des deux molécules inhibitrices de la choline kinase α , les variations des niveaux de la choline totale à 3.2 ppm, de la taurine à 3.4 ppm et aussi du complexe lipides + lactate à 1.3 ppm ont été révélatrices de l'efficacité antitumorale de ces dernières, connues pour grandement favoriser la mort cellulaire par apoptose des cellules tumorales.

Ces résultats ont alors démontré que l'utilisation d'un tel dispositif permettait d'avoir accès à des indicateurs plus précoces de l'effet d'un traitement que le critère classiquement utilisé, la croissance tumorale, dont les changements mesurables se produisent beaucoup plus tard dans le traitement (critère RECIST).

En conclusion, les micro-antennes RMN implantables ainsi que le dispositif combinant une micro-antenne RMN et un capillaire d'injection développés dans le cadre de cette thèse offrent la possibilité d'être réutilisés au sein de l'équipe et vont permettre de poursuivre et d'initier de nouvelles études sur la caractérisation métabolique et morphologique de divers modèles rongeurs de pathologies cérébrales et sur d'autres agents thérapeutiques. Il est alors probable que ces outils donnent lieu à différentes collaborations dans les années à venir.

L'ensemble de ces travaux a pu être valorisé à travers plusieurs communications aux congrès de l'EMIM (congrès virtuel, 2020), du WMIC (congrès virtuel, 2020), de la SFRMBM (Lyon, 2021) et de la journée du Cancéropole Grand Sud-Ouest (Carcassonne, 2021). Deux articles ont également été publiés dans deux revues à comité de lecture international (*Metabolites* et *NMR in Biomedicine*) et un article portant sur le développement et les applications du dispositif implantable combinant une micro-antenne RMN et un capillaire d'injection d'un composé d'intérêt est en cours de rédaction.

6.2 Perspectives

Ces travaux de thèse ont ouvert la voie à de nombreuses perspectives possibles. Nous détaillons, tout d'abord, celles d'ordre méthodologique, avant d'énoncer quelques perspectives quant à d'autres applications pouvant être envisagées.

Aspects méthodologiques

Tout d'abord, différentes pistes, dont certaines ont déjà été évoquées dans les chapitres précédents, sont à explorer afin d'étendre la capacité des micro-antennes RMN implantables développées dans ces travaux à améliorer la sensibilité de détection et ainsi le RSB résultant.

Au cours de ce projet de thèse, nous avons choisi de nous focaliser principalement sur l'utilisation préclinique cérébrale *in vivo* des micro-antennes RMN implantables et sur les différentes applications pouvant en découler.

De nombreuses améliorations portant sur le circuit électronique des micro-antennes RMN implantables pourraient permettre d'augmenter leurs performances électromagnétiques. En particulier, la mise au point d'un circuit de découplage actif réalisé par l'utilisation d'une diode PIN ajoutée au circuit électronique de la micro-antenne RMN implantable [Johansen *et al.* (2019)] et l'insertion d'un préamplificateur faible-bruit aux bornes de cette dernière [Gruber *et al.* (2018)] constituent les deux principales pistes de perfectionnement électronique. De plus, une autre piste d'amélioration, moins répandue que les deux précédentes, consisterait à symétriser le circuit électronique en répartissant le condensateur de pré-adaptation ou le condensateur d'adaptation de part et d'autre de la boucle résonante afin de réduire les pertes diélectriques ayant lieu lors de l'implantation de la micro-antenne RMN dans un échantillon biologique [Koretsky *et al.* (1984)].

Ensuite, le protocole d'implantation des micro-antennes RMN chez des rats sains et chez des rats pathologiques proposé pourrait être contrôlé et raffiné par des études histologiques. Cela permettrait, d'une part, de vérifier la localisation précise de la micro-antenne RMN, actuellement réalisée par des images IRM acquises avec des antennes conventionnelles externes et, d'autre part, d'analyser la réaction tissulaire induite par la présence de la micro-antenne RMN.

De plus, à la suite des expériences RMN *in vivo* réalisées sur des cerveaux d'animaux porteurs d'un gliome C6, la réalisation et l'exploitation d'analyses histopathologiques seraient aussi un moyen sûr de vérifier les observations effectuées sur les spectres RMN et sur les images IRM acquises avec les micro-antennes RMN implantables en évaluant le type histologique et donc le caractère malin et agressif du gliome C6 [Al-Hussaini (2013)]. Mais encore, lors d'études portant sur l'efficacité thérapeutique de médicaments, l'histopathologie reste une des méthodes les plus fiables pour évaluer précisément la réponse à un traitement et l'effet thérapeutique histologique est souvent lié au pronostic. Des ana-

lyses histopathologiques, réalisées suite à la perfusion intratumorale des deux molécules inhibitrices de la choline kinase α , pourraient alors permettre de confirmer la concordance des résultats spectroscopiques, indicateurs du succès thérapeutique, par la diminution du nombre de cellules tumorales et par la présence de cellules apoptotiques et nécrotiques, par exemple.

Aspects applicatifs

L'amélioration de la sensibilité de détection des micro-antennes RMN implantables peut être exploitée pour d'autres applications.

Tout d'abord, en plus du cerveau, d'autres organes et notamment de petite taille, en conditions saines et pathologiques, pourraient être potentiellement analysés par l'implantation de ces dernières.

La réalisation d'études longitudinales pourrait aussi être envisagée par l'implantation chronique de la micro-antenne RMN dans le tissu d'intérêt à analyser. Pour cela, quelques ajustements seraient alors nécessaires comme, par exemple, la réduction du circuit électronique et des connexions filaires ou par le raccord, à posteriori, du circuit électronique à la boucle résonante implantée. Diverses études, par IRM et par histologie, devront également être menées pour évaluer la réaction du tissu cérébral à l'implantation chronique de la micro-antenne RMN et sa biocompatibilité sur le long terme. Dans le cas des modèles animaux de tumeurs cérébrales, l'implantation chronique d'une micro-antenne RMN directement après l'injection des cellules tumorales pourrait, par exemple, permettre d'identifier précisément l'ordre des cibles métaboliques jouant un rôle clé dans la croissance et la survie des cellules tumorales.

Motivé par un arsenal thérapeutique en pleine expansion, le dispositif combinant une micro-antenne RMN et un capillaire d'injection pourrait être utilisé pour évaluer de nouvelles molécules antitumorales administrées directement au sein de la tumeur en analysant, en temps réel, l'effet de ces dernières sur le profil métabolique tumoral et sur les modifications morphologiques du micro-environnement tumoral. Cela permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'action de différentes thérapies antitumorales mais aussi le phénomène d'échappement de certaines tumeurs aux traitements chimiothérapeutiques et immunothérapeutiques. A noter que, comme pour les micro-antennes RMN implantables, ce dispositif pourrait éventuellement être implanté dans d'autres organes afin d'étudier l'efficacité thérapeutique de molécules antitumorales sur des types de tumeurs propres à ces derniers.

A plus long terme, il serait tout à fait possible d'envisager l'utilisation clinique de ces micro-antennes RMN implantables.

En raison de leur caractère invasif, leur utilisation chez l'homme devra évidemment reposer sur une indication clinique justifiée. Cela est notamment déjà le cas pour différents

dispositifs intracérébraux implantables tels que les sondes de microdialyse ou encore les électrodes utilisées pour la technique de la stimulation cérébrale profonde dont le diamètre est généralement supérieur au millimètre [Pycroft *et al.* (2018)].

De même, le dispositif combinant une micro-antenne RMN et un capillaire d'injection pourrait être très utile, en clinique, et principalement dans le cas de la médecine de précision intratumorale aussi appelée médecine personnalisée intratumorale [Hoeben *et al.* (2021)]. Cette dernière représente, en effet, une des voies les plus prometteuses en cancérologie et elle consiste à traiter chaque patient de façon individualisée en se basant sur des caractéristiques précises de sa tumeur. Par le suivi, en temps réel, de l'effet d'une molécule chimiothérapeutique ou immunothérapeutique administrée localement, l'optimisation des stratégies de traitement pourrait être facilitée par l'observation ou non d'une réponse thérapeutique positive. L'utilisation du dispositif implantable, lors de thérapies intratumorales et personnalisées, pourrait ainsi apporter de nombreux bénéfices tels qu'une meilleure évaluation précoce de la réponse thérapeutique du médicament administré et une meilleure qualité de vie comparée à celle des patients sous traitements conventionnels par la réduction d'effets secondaires.

Bibliographie

- Al-Hussaini, M. 2013. Histology of primary brain tumors. *Clinical management and evolving novel therapeutic strategies for patients with brain tumors*, 04.
- Al-Saffar, N., Troy, H., Ramírez de Molina, A., Jackson, L., Madhu, B., Griffiths, J., Leach, M., Workman, P., Lacal, J., Judson, I., & Chung, Y.L. 2006. Noninvasive magnetic resonance spectroscopic pharmacodynamic markers of the choline kinase inhibitor MN58b in human carcinoma models. *Cancer Research*, **66**(01), 427–34.
- Andleeb, F., Katta, N., Gruslova, A., Muralidharan, B., Estrada, A., McElroy, A., Janjua, H.U., Brenner, A., & Milner, T. 2021. Differentiation of brain tumor microvasculature from normal vessels using optical coherence angiography. *Lasers in Surgery and Medicine*, **53**(05), 1386–1394.
- Aoyama, C., Liao, H., & Ishidate, K. 2004. Structure and function of choline kinase isoforms in mammalian cells. *Progress in Lipid Research*, **43**(06), 266–81.
- Authier, N., Dupuis, E., Kwasiborski, A., Eschalier, A., & Coudore, F. 2002. Behavioural assessment of dimethylsulfoxide neurotoxicity in rats. *Toxicology Letters*, **132**(07), 117–21.
- Barker, P. 2001. N-Acetylaspartate? A neuronal marker? *Annals of Neurology*, **49**(04), 423–4.
- Barth, R., & Kaur, B. 2009. Rat brain tumour models in experimental neuro-oncology : the C6, 9 L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CSN-1 gliomas. *Journal of Neuro-oncology*, **94**(05), 299–312.
- Bartha, R., Drost, D.J., & Williamson, P.C. 1999. Factors affecting the quantification of short echo *in vivo* ^1H MR spectra : prior knowledge, peak elimination, and filtering. *NMR in Biomedicine*, **12**.
- Baxan, N., Rengle, A., Pasquet, G., Châteaux, J.F., Briguet, A., Morin, P., & Fakri-Bouchet, L. 2007. Investigation of NMR limits of detection for implantable microcoil. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 02, 4194–7.
- Baxan, N., Rabeson, H., Pasquet, G., Chateaux, J.F., Briguet, A., Graveron-Demilly, D.J., & Fakri-Bouchet, L. 2008. Limit of detection of cerebral metabolites by localized NMR spectroscopy using microcoils. *Comptes Rendus Chimie*, **11**(04), 448–456.

- Behar, K.L., & Ogino, T. 1993. Characterization of macromolecule resonances in the ^1H NMR spectrum of rat brain. *Magnetic Resonance in Medicine*, **30**.
- Bell, L., Ainsworth, N., Lee, S.H., & Griffiths, J. 2011. MRI and MRS assessment of the role of the tumour microenvironment in response to therapy. *NMR in Biomedicine*, **24**(05), 612–35.
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G.H., Levine, L., & Sweet, W. 1968. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, **161**, 370 – 371.
- Bergenheim, T., Roslin, M., Ungerstedt, U., Waldenström, A., Henriksson, R., & Ronquist, G. 2007. Metabolic manipulation of glioblastoma *in vivo* by retrograde microdialysis of L-2, 4 diaminobutyric acid (DAB). *Journal of Neuro-oncology*, **80**(01), 285–93.
- Berry, L., Renaud, L., Kleimann, P., Morin, P., Armenean, M., & Saint-Jalmes, H. 2001. Development of implantable detection microcoils for minimally invasive NMR spectroscopy. *Sensors and Actuators A : physical*, **93**, 214–218.
- Bilgen, M. 2004. Simple, low-cost multipurpose RF coil for MR microscopy at 9.4 T. *Magnetic Resonance in Medicine*, **52**.
- Bilgen, M., Elshafiey, I., & Ponnada, A.N. 2001. *In vivo* magnetic resonance microscopy of rat spinal cord at 7 T using implantable RF coils. *Magnetic Resonance in Medicine*, **46**.
- Biran, R., Martin, D., & Tresco, P. 2005. Neuronal cell loss accompanies the brain tissue response to chronically implanted silicon microelectrode arrays. *Experimental Neurology*, **195**(10), 115–26.
- Birken, D.L., & Oldendorf, W.H. 1989. N-acetyl-L-aspartic acid : a literature review of a compound prominent in ^1H NMR spectroscopic studies of brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **13**, 23–31.
- Blevins, J., Stanley, B., & Reidelberger, R. 2002. DMSO as a vehicle for central injections : rests with feeding elicited by norepinephrine injected into the paraventricular nucleus. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, **71**(01), 277–82.
- Bloch, F., Hansen, W. W., & Packard, M. 1946. The nuclear induction experiment. *Physical Review*, **70**, 474–485.
- Bottomley, P. A. 1987. Spatial localization in NMR spectroscopy *in vivo*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **508**(1), 333–348.

- Brand, A., Richter-Landsberg, C., & Leibfritz, D. 1993. Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of glial and neuronal cells. *Developmental Neuroscience*, **15** 3-5, 289–98.
- Bruhn, H, Frahm, J, Gyngell, ML, Merboldt, KD, Hänicke, W, Sauter, R, & Hamburger, C. 1989a. Noninvasive differentiation of tumors with use of localized ^1H MR spectroscopy *in vivo* : initial experience in patients with cerebral tumors. *Radiology*, **172**(2), 541—548.
- Bruhn, H., Frahm, J., Gyngell, M.L., Merboldt, K.D., Hänicke, W., Sauter, R., & Hamburger, C. 1989b. Noninvasive differentiation of tumors with use of localized ^1H spectroscopy *in vivo* : initial experience in patients with cerebral tumors. *Radiology*, **172** 2, 541–8.
- Bulik, M., Jancalek, R., Vaníček, J., Skoch, A., & Mechl, M. 2012. Potential of MR spectroscopy for assessment of glioma grading. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, **115**.
- Cannon, J. 1994. Structure-activity aspects of hemicholinium-3 (HC-3) and its analogs and congeners. *Medicinal Research Reviews*, **14**(09), 505–31.
- Cao, Y., Maly Sundgren, P., Tsien, C., Chenevert, T., & Junck, L. 2006. Physiologic and metabolic magnetic resonance imaging in gliomas. *Journal of Clinical Oncology*, **24**(04), 1228–35.
- Castillo, M., Smith, J., & Kwock, L. 2000. Correlation of myo-inositol levels and grading of cerebral astrocytomas. *American Journal of Neuroradiology*, **21**(11), 1645–9.
- Cavassila, S., Deval, S., Huegen, C., Van, D., & Graveron-Demilly, D.J. 2000. Cramér-Rao bound expressions for parametric estimation of overlapping peaks : influence of prior knowledge. *Journal of Magnetic Resonance*, **143**(05), 311–20.
- Cavassila, S., Deval, S., Huegen, C., Ormond, D., & Graveron-Demilly, D.J. 2001. Cramér-Rao bounds : an evaluation tool for quantitation. *NMR in Biomedicine*, **14**(06), 278–283.
- Champiat, S., Tselikas, L., Farhane, S., Raoult, T., Texier, M., Lanoy, E., Massard, C., Robert, C., Ammari, S., Baere, T., & Marabelle, A. 2020. Intratumoral immunotherapy : from trial design to clinical practice. *Clinical Cancer Research*, **27**(09).
- Chen, C.N., & Hoult, D.I. 1989. *Biomedical magnetic resonance technology*. Arrowsmith Limited Bristol.

- Chen, L., Weng, Z., Goh, L., & Garland, M. 2002. An efficient algorithm for automatic phase correction of NMR spectra based on entropy minimization. *Journal of Magnetic Resonance*, **158**(09), 164–168.
- Chun, K., Siti Kartini, E.A.R., Zainal, A., & Norazharuddin, A. 2017. A Review on microdialysis calibration methods : the theory and current related efforts. *Molecular Neurobiology*, **54**(07).
- Ciobanu, L., Seeber, D., & Pennington, C. 2002. 3D MR Microscopy with resolution 3.7 μm by 3.3 μm by 3.3 μm . *Journal of Magnetic Resonance*, **158**(09), 178–82.
- ClinicalTrials. 2011. *Study of intravenous TCD-717 in patients with advanced solid tumor*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01215864>.
- Coquery, N., Stupar, V., Farion, R., Maunoir-Regimbal, S., Barbier, E., Remy, C., & Fauvelle, F. 2015. The three glioma rat models C6, F98 and RG2 exhibit different metabolic profiles : *in vivo* ^1H MRS and *ex vivo* ^1H HRMAS combined with multivariate statistics. *Metabolomics*, 08.
- Coyle, J.T. 1997. The nagging question of the function of N-acetylaspartylglutamate. *Neurobiology of Disease*, **4**(3-4), 231–238.
- Crémillieux, Y., Salvati, R., Dumont, U., Pinaud, N., Bouchaud, V., Sanchez, S., Glögler, S., & Wong, A. 2018. Online ^1H -MRS measurements of time-varying lactate production in an animal model of glioma during administration of an anti-tumoral drug. *NMR in Biomedicine*, **31**(2), e3861.
- Crémillieux, Y., Dumont, U., Mazuel, L., Salvati, R., Zhendre, V., Rizzitelli, S., Blanc, J., Roumes, H., Pinaud, N., & Bouzier-Sore, A.K. 2019. Online quantification of lactate concentration in microdialysate during cerebral activation using ^1H MRS and sensitive NMR microcoil. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **13**.
- Croteau, D., Scarpace, L., Hearshen, D., Gutierrez, J., Fisher, J., Rock, J., & Mikkelsen, T. 2001. Correlation between magnetic resonance spectroscopy imaging and omage-guided biopsies : semiquantitative and aualitative histopathological analyses of patients with untreated glioma. *Neurosurgery*, **49**, 823–9.
- Cubillos, S., Obregón, F., Vargas, M., Salazar, L., & Lima P., Lucimey, L. 2006. Taurine concentration in human gliomas and meningiomas : tumoral, peritumoral and extratumoral tissue. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **583**(02), 419–22.
- Currie, L. 1999. Detection and quantification limits : origins and historical overview. *Analytica Chimica Acta*, **391**(05), 127–134.

- Dagdeviren, C., Ramadi, K., Joe, P., Spencer, K., Schwerdt, H., Shimazu, H., Delcasso, S., Amemori, K., Nunez-Lopez, C., Graybiel, A., Cima, M., & Langer, R. 2018. Miniaturized neural system for chronic, local intracerebral drug delivery. *Science Translational Medicine*, **10**(01), eaan2742.
- Damadian, R., Goldsmith, M., & Minkoff, L. 1977. NMR in cancer : XVI. FONAR image of the live human body. *Physiological Chemistry and Physics*, **9** **1**, 97–100, 108.
- Darrasse, L., & Ginefri, J.C. 2003. Perspectives with cryogenic RF probes in biomedical MRI. *Biochimie*, **85**(9), 915–937.
- De Graaf, R.A. 1998. *In vivo NMR spectroscopy : principles and techniques*. Wiley.
- Dechow, J., Forchel, A., Lanz, T., & Haase, A. 2000. Fabrication of NMR — microsensors for nanoliter sample volumes. *Microelectronic Engineering*, **53**(1-4), 517–519.
- Decorps, M., Blondet, P., Reutenauer, H., Albrand, J.P., & Remy, C. 1985. An inductively coupled, series-tuned NMR probe. *Journal of Magnetic Resonance*, **65**(1), 100–109.
- Degen, J., Walbridge, S., Vortmeyer, A., Oldfield, E., & Lonser, R. 2003. Safety and efficacy of convection-enhanced delivery of gemcitabine or carboplatin in a malignant glioma model in rats. *Journal of Neurosurgery*, **99**(11), 893–8.
- Delgado, J., DeFeudis, F., Roth, R., Ryugo, D., & Mitruka, B. 1972. Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, **198**(02), 9–21.
- Delikatny, E., Chawla, S., Leung, D.J., & Poptani, H. 2011. MR-visible lipids and the tumor microenvironment. *NMR in biomedicine*, **24**(07), 592–611.
- Dimeco, F., Li, K., Tyler, B., Wolf, A., Brem, H., & Olivi, A. 2002. Local delivery of mitoxantrone for the treatment of malignant brain tumors in rats. *Journal of neurosurgery*, **97**(12), 1173–8.
- Doblas, S., He, T., Saunders, D., Hoyle, J., Smith, N., Pye, Q., Lerner, M., Jensen, R., & Towner, R. 2012. *In vivo* characterization of several rodent glioma models by ¹H MRS. *NMR in Biomedicine*, **25**(04), 685–94.
- Dohi, T., Matsumoto, K., & Shimoyama, I. 2005. The flexible micro resonator for the magnetic resonance catheter. *International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems*, **2**, 2143–2146 Vol. 2.
- Dohi, T., Kuwana, K., Matsumoto, K., & Shimoyama, I. 2007 (07). A standing microcoil for a high resolution MRI.

- Drevelegas, A. 2011. *Imaging of brain tumors with histological correlations*.
- Duvillard, C., Polycarpe, E., Romanet, P., & Chauffert, B. 2007. Intratumoral chemotherapy : experimental data and applications to head and neck tumors. *Annales d'Otolaryngologie et de Chirurgie Cervico-faciale*, **124**(07), 53–60.
- Duyn, J., & Schenck, J. 2016. Contributions to magnetic susceptibility of brain tissue. *NMR in Biomedicine*, **30**(05).
- Ebert, M., Grossmann, T., Heil, W., Otten, E.W., Surkau, R., Thelen, M., Leduc, M., Bachert, P., Knopp, M.V., & Schad, L.R. 1996. Nuclear magnetic resonance imaging with hyperpolarised ^3He . *The Lancet*, **347**, 1297–1299.
- Edden, R., & Harris, A. 2016. N-acetylaspartate. *eMagRes*, **5**(2), 1131–1138.
- Ehrmann, K., Saillen, N., Vincent, F., Stettler, M., Jordan, M., Wurm, F.M., Besse, P.A., & Popovic, R. 2007. Microfabricated solenoids and Helmholtz coils for NMR spectroscopy of mammalian cells. *Lab on a Chip*, **7**, 373–380.
- Ellersiek, D., Fassbender, H., Bruners, P., Pfeffer, J.G., Penzkofer, T., Mahnken, A.H., Schmitz-Rode, T., Mokwa, W., & Schnakenberg, U. 2010. A monolithically fabricated flexible resonant circuit for catheter tracking in magnetic resonance imaging. *Sensors and Actuators B : chemical*, **144**, 432–436.
- Erecinska, M. 1990. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Progress in Neurobiology*, **35**(4), 245–296.
- Fan, G., Sun, B., Wu, Z., Guo, Q., & Guo, Y. 2004. *In vivo* single-voxel proton MR spectroscopy in the differentiation of high-grade gliomas and solitary metastases. *Clinical Radiology*, **59**, 77–85.
- Frahm, J., Merboldt, K.D., & Hänicke, W. 1987. Localized proton spectroscopy using stimulated echoes. *Journal of Magnetic Resonance*, **72**(3), 502–508.
- Frahm, J., Bruhn, H., Hänicke, W., Merboldt, K.D., Mursch, K., & Markakis, E. 1991. Localized proton NMR spectroscopy of brain tumors using short-echo time STEAM sequences. *Journal of Computer Assisted Tomography*, **15** 6, 915–22.
- Fuhrman, S.L., Palkovits, M., Cassidy, M.G., & Neale, J.H. 1994. The regional distribution of N-acetylaspartylglutamate (NAAG) and peptidase activity against NAAG in the rat nervous system. *Journal of Neurochemistry*, **62**.
- Gallego-Ortega, D., Ramírez de Molina, A., Ramos, M., Valdes-Mora, F., Barderas, M., Sarmentero, J., & Lacal, J. 2009. Differential role of human CHK α and β enzymes in lipid metabolism : implications in cancer onset and treatment. *Plos One*, **4**(11), e7819.

- García-Castillo, V., López-Urrutia, E., Villanueva-Sánchez, O., Ávila-Rodríguez, M., Zentella-Dehesa, A., Cortés-González, C., López-Camarillo, C., Jacobo-Herrera, N., & Pérez-Plasencia, C. 2017. Targeting metabolic remodeling in triple negative breast cancer in a murine model. *Journal of Cancer*, **8**(2), 178–189. Publisher Copyright : © Ivyspring International Publisher.
- Geeraerts, T., Duranteau, J., & Vigué, B. 2008. Microdialyse cérébrale : méthodologie et applications cliniques. *Réanimation*, **17**(10).
- Gibbs, J. 2000. Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science*, **287**(04), 1969–73.
- Gibellini, F., & Smith, T. 2010. The Kennedy pathway-de novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB life*, **62**(06), 414–28.
- Gideon, P., Henriksen, O., Sperling, B., Christiansen, P., Olsen, T.S., Jørgensen, H.S., & Arlien-Søborg, P. 1992. Early time course of N-acetylaspartate, creatine and phosphocreatine, and compounds containing choline in the brain after acute stroke : a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Stroke*, **23**, 1566–1572.
- Gierzyng, A., Pszczolkowska, D., Bocian, K., Dabrowski, M., Rajan, W., Kloss, M., Mieczkowski, J., & Kaminska, B. 2017. Immune microenvironment of experimental rat C6 gliomas resembles human glioblastomas. *Scientific Reports*, **7**(12).
- Gillies, R.J., & Morse, D.L. 2005. *In vivo* magnetic resonance spectroscopy in cancer. *Annual Review of Biomedical Engineering*, **7**(1), 287–326. PMID : 16004573.
- Ginefri, J.C., Rubin, A., Tatouljian, M., Woytasik, M., Boumezbeur, F., Djemaï, B., Poirier-Quinot, M., Lethimonnier, F., Darrasse, L., & Dufour-Gergam, E. 2012. Implanted, inductively-coupled, radiofrequency coils fabricated on flexible polymeric material : application to in vivo rat brain MRI at 7T. *Journal of Magnetic Resonance*, **224**, 61–70.
- Giovannetti, G., Flori, A., Marchi, D., Matarazzo, G., Frijia, F., Burchielli, S., Montanaro, D., Aquaro, G.D., & Menichetti, L. 2018. Simulation, design, and test of an elliptical surface coil for magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Concepts in Magnetic Resonance : Magnetic Resonance Engineering*, **47B**(02).
- Glunde, K., Bhujwalla, Z., & Ronen, S. 2011. Choline metabolism in malignant transformation. *Nature Reviews Cancer*, **11**(11), 835–48.
- Govindaraju, V., Young, K., & Maudsley, A.A. 2000. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR in Biomedicine*, **13**(3), 129–153.

- Grobben, B., Paul, D., & Slegers, H. 2003. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell and Tissue Research*, **310**(01), 257–70.
- Gruber, B., Froeling, M., Leiner, T., & Klomp, D. 2018. RF coils : a practical guide for nonphysicists. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, **48**(3), 590–604.
- Gupta, R., Cloughesy, T., Sinha, U., Garakian, J., Lazareff, J., Rubino, G., Rubino, L., Becker, D., Vinters, H., & Alger, J. 2001. Relationships between choline magnetic resonance spectroscopy, apparent diffusion coefficient and quantitative histopathology in human glioma. *Journal of Neuro-oncology*, **50**, 215–26.
- Haase, A., Frahm, J., Hanicke, W., & Matthaei, D. 1985. ^1H NMR chemical shift selective (CHESS) imaging. *Physics in Medicine and Biology*, **30**(4), 341–344.
- Hahn, E. L. 1950. Spin echoes. *Physical Review*, **80**(Nov), 580–594.
- Hakumäki, J., Poptani, H., Sandmair, A.M., Ylä-Herttuala, S., & Kauppinen, R. 1999. ^1H MRS detects polyunsaturated fatty acid accumulation during gene therapy of glioma : Implications for the *in vivo* detection of apoptosis. *Nature Medicine*, **5**(12), 1323–7.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. 2011. Hallmarks of cancer : the next generation. *Cell*, **144**(03), 646–74.
- Handwerker, J., Perez Rodas, M., Beyerlein, M., Vincent, F., Beck, A., Freytag, N., Yu, X., Pohmann, R., Anders, J., & Scheffler, K. 2020. A CMOS NMR needle for probing brain physiology with high spatial and temporal resolution. *Nature Methods*, **17**(01).
- Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S., & Simjee, S. 2017. Glioblastoma multiforme : a review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **18**(01), 3–9.
- Hanslick, J., Lau, K., Noguchi, K., Olney, J., Zorumski, C., Mennerick, S., & Farber, N. 2009. Dimethylsulfoxide produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiology of Disease*, **34**(04), 1–10.
- Harms, A., Bauer, T., Fischbach, L., David, B., Ernst, L., Witt, J.U., Diers, K., Baumgartner, T., Weber, B., Radbruch, A., Becker, A.J., Helmstaedter, C., Reuter, M., Elger, C.E., Surges, R., & Rüber, T. 2022. Shape description and volumetry of hippocampus and amygdala in temporal lobe epilepsy – A beneficial combination with a clinical perspective. *Epilepsy and Behavior*, **128**, 108560.

- Hascup, E., af Bjerken, S., Hascup, K., Pomerleau, F., Huettl, P., Strömberg, I., & Gerhardt, G. 2009. Histological studies of the effects of chronic implantation of ceramic-based microelectrode arrays and microdialysis probes in rat prefrontal cortex. *Brain Research*, **1291**(08), 12–20.
- Haziza, N., Bittoun, J., & Kan, S.K. 1997. Multiturn split-conductor transmission-line resonator. *Review of Scientific Instruments*, **68**, 1995–1997.
- Hemminki, O., Immonen, R., Närväinen, J., Kipar, A., Paasonen, J., Jokivarsi, K., Yli-Ollila, H., Soininen, P., Partanen, K., Joensuu, T., Parvianen, S., Pesonen, S., Koski-Palkén, A., Vähä-Koskela, M., Cerullo, V., Pesonen, S., Gröhn, O., & Hemminki, A. 2014. *In vivo* magnetic resonance imaging and spectroscopy identifies oncolytic adenovirus responders. *International Journal of Cancer*, **134**(06).
- Hernandez-Alcoceba, R., Saniger, L., Campos, J., Núñez, M., Khaless, F., Gallo, M., Espinosa, A., & Lacal, J. 1997. Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design. *Oncogene*, **15**(12), 2289–301.
- Higuchi, T., Graham, S.H., Fernandez, E.J., Rooney, W.D., Gasparly, H.L., Weiner, M.W., & Maudsley, A.A. 1997. Effects of severe global ischemia on N-acetylaspartate and other metabolites in the rat brain. *Magnetic Resonance in Medicine*, **37**.
- Hillenbrand, C.M., Elgort, D.R., Wong, E.Y., Reykowski, A., Wacker, F.K., Lewin, J.S., & Duerk, J.L. 2004. Active device tracking and high-resolution intravascular MRI using a novel catheter-based, opposed-solenoid phased array coil. *Magnetic Resonance in Medicine*, **51**.
- Hoeben, A., Joosten, E., & Van den Beuken, M.H.J. 2021. Personalized medicine : recent progress in cancer therapy. *Cancers*, **13**(01), 242.
- Hofmann, L., Slotboom, J., Boesch, C., & Kreis, R. 2001. Characterization of the macromolecule baseline in localized ^1H -MR spectra of human brain. *Magnetic Resonance in Medicine*, **46**(5), 855–863.
- Hong, W., Haebe, S., Lee, A., Westphalen, B., Norton, J., Jiang, W., & Levy, R. 2020. Intratumoral immunotherapy for early-stage solid tumors. *Clinical Cancer Research*, **26**(02), clincanres.3642.2019.
- Hoult, D.I., & Richards, R.E. 1976. The signal-to-noise ratio of the nuclear magnetic resonance experiment. *Journal of Magnetic Resonance*, **24**(1), 71–85.
- Hoult, D.I., & Tomanek, B. 2002. Use of mutually inductive coupling in probe design. *Concepts in Magnetic Resonance*, **15**(12), 262 – 285.

- Howe, F., Barton, S.J., Cudlip, S., Stubbs, M., Saunders, D.E., Murphy, M., Wilkins, P., Opstad, K., Doyle, V.L., Mclean, M., Bell, B., & Griffiths, J. 2003. Metabolic profiles of human brain tumors using quantitative *in vivo* ^1H magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, **49**(02), 223–32.
- Howe, F., Syms, R., Ahmad, M., Rodrigues, L., Griffiths, J., & Young, I. 2009. *In vivo* ^{31}P magnetic resonance spectroscopy using a needle microcoil. *Magnetic Resonance in Medicine*, **61**(05), 1238–41.
- Höcht, C., Opezzo, J., & Taira, C. 2007. Applicability of reverse microdialysis in pharmacological and toxicological studies. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **55**(02), 3–15.
- Jackson, J. 1998. Classical Electrodynamics, 3rd Edition.
- Jiru, F. 2008. Introduction to post-processing techniques. *European journal of radiology*, **67**(09), 202–17.
- Johansen, D., Albannay, MM., Petersen, JR., Zhurbenko, V., & Ardenkjaer-Larsen, J. 2019. PIN diode driver for NMR and MRI. *Journal of Magnetic Resonance*, **300**(03).
- Johnson, C., Ivanisevic, J., & Siuzdak, G. 2016. Metabolomics : beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **17**(03).
- Johnson, J.B. 1928. Thermal agitation of electricity in conductors. *Physical Review*, **32**(Jul), 97–109.
- Kajfez, D., & Hwan, E. 1984. Q-factor measurements with network analyzer. *Microwave Theory and Techniques*, **32**(08), 666 – 670.
- Kalant, H. 1958. A microdialysis procedure for extraction and isolation of corticosteroids from peripheral blood plasma. *The Biochemical journal*, **69**(06), 99–103.
- Kasten, B., Udayakumar, N., Leavenworth, J., Wu, A., Lapi, S., McConathy, J., Sorace, A., Bag, A., Markert, J., & Warram, J. 2019. Current and future imaging methods for evaluating response to immunotherapy in neuro-oncology. *Theranostics*, **9**(07), 5085–5104.
- Kastler, B. 2018a. Chapitre 3 - Les phénomènes de relaxation. *Pages 21–29 of : Comprendre L'IRM*, huitième Édition edn. Paris : Elsevier Masson.
- Kastler, B. 2018b. Chapitre 4 - La séquence de base : séquence d'écho de spin et d'écho de gradient. *Pages 31–38 of : Comprendre L'IRM*, huitième Édition edn. Paris : Elsevier Masson.

- Kastler, B., & Vetter, D. 2018. Chapitre 6 - Codage spatial du signal et mise en place des événements d'une séquence IRM. *Pages 65–90 of : Comprendre L'IRM*, huitième Édition edn. Paris : Elsevier Masson.
- Kettunen, M., & Brindle, K. 2005. Apoptosis detection using magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **47**(12), 175–185.
- Kjell, J., & Olson, L. 2016. Rat models of spinal cord injury : from pathology to potential therapies. *Disease Models and Mechanisms*, **9**(10), 1125–1137.
- Knight-Scott, J. 1999. Application of multiple inversion recovery for suppression of macromolecule resonances in short echo time ^1H NMR spectroscopy of human brain. *Journal of Magnetic Resonance*, **140**(10), 228–34.
- Koretsky, A., Wang, S., Murphy-Boesch, J., Klein, M., James, T., & Weiner, M. 1984. ^{31}P NMR spectroscopy of rat organs, *in situ*, using chronically implanted radiofrequency coils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **80**(01), 7491–5.
- Kreis, R., Ernst, T., & Ross, B.D. 1993. Absolute quantitation of water and metabolites in the human brain. *Journal of Magnetic Resonance*, **102**, 9–19.
- Kumar, M., Arlauckas, S., Saksena, S., Verma, G., Ittyerah, R., Pickup, S., Popov, A., Delikatny, E., & Poptani, H. 2015. Magnetic resonance spectroscopy for detection of choline kinase inhibition in the treatment of brain tumors. *Molecular cancer therapeutics*, **14**(02), 899–908.
- Lacal, J. 2001. Choline kinase : a novel target for antitumor drugs. *Investigational Drugs Journal*, **4**(05), 419–26.
- Lacal, J., & Campos, J. 2014. Preclinical characterization of RSM-932A, a novel anticancer drug targeting the human choline kinase α , an enzyme involved in increased lipid metabolism of cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, **14**(12).
- Lacey, M., Subramanian, R., Olson, D., Webb, A., & Sweedler, J. 1999. High-resolution NMR spectroscopy of sample volumes from 1 nL to 10 μL . *Chemical Reviews*, **99**, 3133–3152.
- Laudadio, T., Mastronardi, N., Vanhamme, L., Hecke, P., & Huffel, S. 2002. Improved Lanczos algorithms for blackbox MRS data quantitation. *Journal of Magnetic Resonance*, **157**(09), 292–7.
- Lauterbur, P. C. 1973. Image formation by induced local interactions : examples employing nuclear magnetic resonance. **242**(5394), 190–191.

- Law, M., Yang, S., Babb, J., Knopp, E., Golfinos, J., Zagzag, D., & Johnson, G. 2004. Comparison of cerebral blood volume and vascular permeability from dynamic susceptibility contrast-enhanced perfusion MR imaging with glioma grade. *American Journal of Neuroradiology*, **25**(06), 746–55.
- Lidar, Z., Mardor, Y., Jonas Kimchi, T., Pfeffer, R., Faibel, M., Nass, D., Hadani, M., & Ram, Z. 2004. Convection-enhanced delivery of paclitaxel for the treatment of recurrent malignant glioma : a phase I/II clinical study. *Journal of Neurosurgery*, **100**(04), 472–9.
- Lide, D.R. 2007. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 88th Edition*. 88 edn. CRC Press.
- Liimatainen, T., Lyytinen, A., Valonen, P., Vidgren, H., Lakso, M., Wong, G., Gröhn, O., Ylä-Herttuala, S., & Hakumäki, J. 2008. ¹H MR spectroscopic imaging of phospholipase-mediated membrane lipid release in apoptotic rat glioma *in vivo*. *Magnetic Resonance in Medicine*, **59**(06), 1232–8.
- Malisza, K.L., Kozlowski, P., & Peeling, J. 1998. A review of *in vivo* ¹H magnetic resonance spectroscopy of cerebral ischemia in rats. *Biochemistry and Cell Biology*, **76**(2-3), 487–496. PMID : 9923718.
- Marchi, N., Angelov, L., Masaryk, T., Fazio, V., Granata, T., Hernandez, N., Hallene, K., Diglaw, T., Franic, L., Najm, I., & Janigro, D. 2007. Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia*, **48**(05), 732–42.
- Marois, Y., & Guidoin, R. 2001. Biocompatibility of polyurethane. *Biomedical Applications of Polyurethanes*, 01, 77–96.
- Massin, C., Azevedo, C., Beckmann, N., Besse, P.A., & Popovic, R. 2002 (02). Magnetic resonance imaging using microfabricated planar coils.
- Massin, C., Vincent, F., Homsy, A., Ehrmann, K., Boero, G., Besse, P.A., Daridon, A., Verpoorte, E., de Rooij, N.F., & Popovic, R.S. 2003. Planar microcoil-based microfluidic NMR probes. *Journal of Magnetic Resonance*, **164**(2), 242–255.
- Mathon, B., Nassar, M., Simonnet, J., Le Duigou, C., Clemenceau, S., Miles, R., & Fricker, D. 2015. Increasing the effectiveness of intracerebral injections in adult and neonatal mice : a neurosurgical point of view. *Neuroscience Bulletin*, **31**(09).
- McCann, C., Waterman, P., Figueiredo, J.L., Aikawa, E., Weissleder, R., & Chen, J. 2009. Combined magnetic resonance and fluorescence imaging of the living mouse brain reveals glioma response to chemotherapy. *Neuroimage*, **45**(04), 360–9.
- McNaught, A., & Wilkinson, A. 1997. *Compendium of Chemical Terminology - IUPAC*. Vol. 2.

- McNay, E.C., & Sherwin, R.S. 2004. From artificial cerebro-spinal fluid (aCSF) to artificial extracellular fluid (aECF) : microdialysis perfusate composition effects on in vivo brain ECF glucose measurements. *Journal of Neuroscience Methods*, **132**, 35–43.
- Mehta, A., Sonabend, A., & Bruce, J. 2017. Convection-Enhanced Delivery. *Neurotherapeutics*, **14**(03), 1–14.
- Mescher, M., Merkle, H., Kirsch, J., Garwood, M., & Gruetter, R. 1998. Simultaneous *in vivo* spectral editing and water suppression. *NMR in Biomedicine*, **11**(10), 266–272.
- Milkevitch, M., Shim, H., Pilatus, U., Pickup, S., Wehrle, J., Darawsheh, S., Poptani, H., Glickson, J., & Delikatny, E. 2005. Increases in NMR-visible lipid and glycerophosphocholine during phenylbutyrate-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1734**.
- Miller, B.L., Changl, L., Booth, R., Ernst, T., Cornford, M., Nikas, D., McBride, D., & Jenden, D.J. 1996. *In vivo* ^1H MRS choline : correlation with *in vitro* chemistry/histology. *Life Sciences*, **58**(22), 1929–1935.
- Mispelter, J., Lupu, M., & Briguet, A. 2015. *NMR probeheads for biophysical and biomedical experiments*.
- Moonen, C., Kienlin, M., Van Zijl, P., Cohen, J., Gillen, J., Daly, P., & Wolf, G. 1989. Comparison of single-shot localization methods (STEAM and PRESS) for *in vivo* proton NMR spectroscopy. *NMR in Biomedicine*, **2**(5-6), 201–208.
- Moreno-Torres, A., Martínez-Pérez, I., Baquero, M., Campistol, J., Capdevila, A., Arús, C., & Pujol, J. 2004. Taurine detection by proton magnetic resonance spectroscopy in medulloblastoma : contribution to noninvasive differential diagnosis with cerebellar astrocytoma. *Neurosurgery*, **55**(11), 824–9 ; discussion 829.
- Muñoz Maniega, S., Cvorovic, V., Chappell, F.M., Armitage, P.A., Marshall, I., Bastin, M.E., & Wardlaw, J M. 2008. Changes in NAA and lactate following ischemic stroke. *Neurology*, **71**(24), 1993–1999.
- Nelson, S. 2011. Assessment of therapeutic response and treatment planning for brain tumors using metabolic and physiological MRI. *NMR in Biomedicine*, **24**(07), 734–49.
- Oja, S., & Saransaari, P. 1996. Taurine as osmoregulator and neuromodulator in the brain. *Metabolic Brain Disease*, **11**, 153–64.
- Olson, D., Norcross, J., O’Neil-Johnson, M., Molitor, P., Detlefsen, D., Wilson, A.G., & Peck, T. 2004. Microflow NMR : concepts and capabilities. *Analytical Chemistry*, **76**, 2966–74.

- Olson, D.L., Peck, T.L., Webb, A.G., Magin, R.L., & Sweedler, J.V. 1995. High-resolution microcoil ^1H NMR for mass-limited nanoliter-volume samples. *Science*, **270**(5244), 1967–1970.
- Papanagiotou, P., Backens, M., Grunwald, I., Farmakis, G., Politi, M., Roth, C., & Reith, W. 2007. MR Spectroscopy in brain tumors. *Radiology*, **47**(07), 520–9.
- Parrish, K., Sarkaria, J., & Elmquist, W. 2015. Improving drug delivery to primary and metastatic brain tumors : strategies to overcome the blood-brain barrier. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **97**(01).
- Paxinos, G., & Watson, C. 1982. Plates and Figures. *Pages 13–153 of : The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press.
- Peck, T.L., Magin, R.L., Kruse, J., & Feng, M. 1994. NMR microspectroscopy using 100 μm planar RF coils fabricated on gallium arsenide substrates. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **41**, 706–709.
- Peck, T.L., Magin, R.L., & Lauterbur, P.C. 1995. Design and analysis of microcoils for NMR microscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, **108**(2), 114–124.
- Penn, R., Kroin, J., Harris, J., Chiu, K., & Braun, D. 1983. Chronic intratumoral chemotherapy of a rat tumor with cisplatin and fluorouracil. *Applied Neurophysiology*, **46**(02), 240–4.
- Pepper, D., & Heinrich, J. 2017. *The finite element method : basic concepts and applications with MATLAB, MAPLE, and COMSOL*.
- Persson, A., Dahlström, N., Engellau, L., Larsson, E.M., Brismar, T., & Smedby, O. 2004. Volume rendering compared with Maximum Intensity Projection (MIP) for magnetic resonance angiography measurements of the abdominal aorta. *Acta Radiologica*, **45**, 453–9.
- Perus, L., & Walsh, L. 2019. Microenvironmental heterogeneity in brain malignancies. *Frontiers in Immunology*, **10**(10).
- Petroff, O.A. 2002. Book review : GABA and glutamate in the human brain. *The Neuroscientist*, **8**(6), 562–573.
- Pfeuffer, J., Tkáč, I., Provencher, S.W., & R., Gruetter. 1999. Toward an *in vivo* neurochemical profile : quantification of 18 metabolites in short-echo-time ^1H NMR spectra of the rat brain. *Journal of Magnetic Resonance*, **141**(1), 104–120.

- Poptani, H., Gupta, R.K., Jain, V.K., Roy, R., & Pandey, R. 1995. Cystic intracranial mass lesions : Possible role of *in vivo* MR spectroscopy in its differential diagnosis. *Magnetic Resonance Imaging*, **13**(7), 1019–1029.
- Provencher, S. 2001. Automatic quantitation of localized *in vivo* ^1H spectra with LCMo-del. *NMR in Biomedicine*, **14**(06), 260 – 264.
- Purcell, E. M., Torrey, H. C., & Pound, R. V. 1946. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Physical Review*, **69**(Jan), 37–38.
- Pycroft, L., Stein, J., & Aziz, T. 2018. Deep brain stimulation : an overview of history, methods, and future developments. *Brain and Neuroscience Advances*, **2**(12), 239821281881601.
- Rabow, Z., Morningstar, T., Showalter, M., Heil, H., Thongphanh, K., Fan, S., Chan, J., Martinez Cerdeno, V., Berman, R., Zagzag, D., Nudler, E., Fiehn, O., & Lechpammer, M. 2021. Exposure to DMSO during infancy alters neurochemistry, social interactions, and brain morphology in long-evans rats. *Brain and Behavior*, **11**(05).
- Ramírez de Molina, A., Gutierrez, R., Ramos, M., Silva, J., Silva, J., Bonilla, F., Sánchez, J., & Lacal, J. 2002a. Increased choline kinase activity in human breast carcinomas : clinical evidence for a potential novel antitumor strategy. *Oncogene*, **21**(06), 4317–22.
- Ramírez de Molina, A., Rodríguez-González, A., Gutierrez, R., Martínez-Piñeiro, L., Sánchez, J., Bonilla, F., Rosell, R., & Lacal, J. 2002b. Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **296**(09), 580–3.
- Ratiney, H., Sdika, M., Coenradie, Y., Cavassila, S., Ormond, D., & Graveron-Demilly, D.J. 2005a. Time-domain semi-parametric estimation based on a metabolite basis set. *NMR in Biomedicine*, **18**(02), 1–13.
- Ratiney, H., Sdika, M., Coenradie, Y., Cavassila, S., Ormond, D., & Graveron-Demilly, D.J. 2005b. Time-domain semi-parametric estimation based on a metabolite basis set. *NMR in Biomedicine*, **18**, 1–13.
- Redpath, T.W. 1998. Signal-to-noise ratio in MRI. *The British Journal of Radiology*, **71**(847), 704–707. PMID : 9771379.
- Renaud, L., Armenean, M., Chambon, L., Kleimann, P., Morin, P., Pitaval, M., Saint-Jalmes, H., O'brien, J., & Brunet, M. 2002. Implantable planar rf microcoils for NMR microspectroscopy. *Sensors and Actuators A : physical*, **99**(06).

- Richards, D., Manning, J.P., Barnes, D., Rombola, L., Bowery, N., Caccia, S., Leresche, N., & Crunelli, V. 2003. Targeting thalamic nuclei is not sufficient for the full anti-absence action of ethosuximide in a rat model of absence epilepsy. *Epilepsy Research*, **54**(05), 97–107.
- Rivera, D., Nunnally, R., Smith, J., Clark, W., Mills, D., Cohen, M., & Judy, J. 2008. Towards a microcoil for intracranial and intraductal MR microscopy. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Society.*, **2008**(02), 2047–50.
- Rivera, D., Cohen, M., Clark, W., Chu, A., Nunnally, R., Smith, J., Mills, D., & Judy, J. 2011. An implantable RF solenoid for magnetic resonance microscopy and microspectroscopy. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **59**(12), 2118–25.
- Robinson, N.B., Krieger, K., Khan, F.M., Huffman, W., Chang, M., Naik, A., Yongle, R., Hameed, I., Krieger, K., Girardi, L.N., & Gaudino, M. 2019. The current state of animal models in research : a review. *International Journal of Surgery*, **72**, 9–13.
- Rodríguez-González, A., Ramírez de Molina, A., Fernandez, F., & Lacal, J. 2004a. Choline kinase inhibition induces the increase in ceramides resulting in a highly specific and selective cytotoxic antitumoral strategy as a potential mechanism of action. *Oncogene*, **23**(09), 8247–8259.
- Rodríguez-González, A., Ramírez de Molina, A., Fernández, F., Ramos, M., Núñez, M., Campos, J., & Lacal, J. 2004b. Inhibition of choline kinase as a specific cytotoxic strategy in oncogene-transformed cells. *Oncogene*, **22**(01), 8803–12.
- Roemer, P.B., Edelstein, W.A., Hayes, C., Souza, S.P., & Mueller, O.M. 1990. The NMR phased array. *Magnetic Resonance in Medicine*, **16**(11), 192–225.
- Ronquist, G., Hugosson, R., Sjölander, U., & Ungerstedt, U. 1992. Treatment of malignant glioma by a new therapeutic principle. *Acta Neurochirurgica*, **114**(02), 8–11.
- Ross, Brian D. 1991. Biochemical considerations in ^1H spectroscopy. Glutamate and glutamine, myo-inositol and related metabolites. *NMR in Biomedicine*, **4**.
- Saleh, M., Edden, R., Chang, L., & Ernst, T. 2020. Motion correction in magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, **84**(04).
- Sanchez Lopez, E., Zimmerman, T., Gómez del Pulgar, T., Moyer, M.P., Lacal, J., & Arancha, C. 2013. Choline kinase inhibition induces exacerbated endoplasmic reticulum stress and triggers apoptosis via CHOP in cancer cells. *Cell Death and Disease*, **4**(11), e933.

- Santarosa, C., Castellano, A., Conte, G.M., Cadioli, M., Iadanza, A., Terreni, M., Franzin, A., Bello, L., Caulo, M., Falini, A., & Anzalone, N. 2016. Dynamic contrast-enhanced and dynamic susceptibility contrast perfusion MR imaging for glioma grading : preliminary comparison of vessel compartment and permeability parameters using hotspot and histogram analysis. *European Journal of Radiology*, **85**(03).
- Sappey-Marinié, D., Calabrese, G., Fein, G., Hugg, J.W., Biggins, C., & Weiner, M.W. 1992. Effect of photic stimulation on human visual cortex lactate and phosphates using ^1H and ^{31}P magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **12**(4), 584–592. PMID : 1618937.
- See, R., & Berglind, W. 2002. Decreased pallidal GABA following reverse microdialysis with, clozapine, but not haloperidol. *Neuroreport*, **12**(01), 3655–8.
- Sherman, W.R., Packman, P.M., Laird, M.H., & Boshans, R.L. 1977. Measurement of myo-inositol in single cells and defined areas of the nervous system by selected ion monitoring. *Analytical Biochemistry*, **78** 1, 119–31.
- Souza, T., Nucci, M., Mamani, J., Silva, H., Fantacini, D.M., Souza, L., Picanco, V., Covas, D., Vidoto, E., Tannús, A., & Gamarra, L. 2018. Image and motor behavior for monitoring tumor growth in C6 glioma model. *Plos One*, **13**(07), e0201453.
- Starcuk, Z., Strbak, O., Starcukova, J., & Graveron-Demilly, D.J. 2008. Simulation of steady state free precession acquisition mode in coupled spin systems for fast MR spectroscopic imaging. *Pages 302–306 of : 2008 IEEE International Workshop on Imaging Systems and Techniques*.
- Stefan, D., Andrasecu, A., Popa, E., Lazarié, A., Strbak, O., Starcuk, Z., Cabañas, M., Ormond, D., & Graveron-Demilly, D.J. 2009. Quantitation of magnetic resonance signals : the jMRUI software package. 01.
- Steidl, E., Pilatus, U., Hattingen, E., Steinbach, J., Zanella, F., Ronellenfitsch, M., & Bähr, O. 2016. Myo-inositol as a biomarker in recurrent glioblastoma treated with bevacizumab : a ^1H magnetic resonance spectroscopy study. *Plos One*, **11**(12), e0168113.
- Stiller, CO., Bergquist, J., Beck, O., Ekman, R., & Brodin, E. 1996. Local administration of morphine decreases the extracellular level of GABA in the periaqueductal gray matter of freely moving rats. *Neuroscience Letters*, **209**(06), 165–168.
- Stocker, J.E., Peck, T.L., Webb, A.G., Feng, M., & Magin, R.L. 1997. Nanoliter volume, high-resolution NMR microspectroscopy using a 60 μm planar microcoil. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **44**, 1122–1127.

- Subramanian, R., & Webb, A.G.. 1998. Design of solenoidal microcoils for high-resolution ^{13}C NMR spectroscopy. *Analytical Chemistry*, **70**(13), 2454–2458. PMID : 9666720.
- Support, COMSOL Technical. 2017. *RF Module - User's guide*. <https://doc.comsol.com/5.3/doc/com.comsol.help.rf/RFModuleUsersGuide.pdf>.
- Syms, R., Ahmad, M., Young, I., Gilderdale, D., & Collins, D. 2006. Microengineered needle micro-coils for magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **16**(12), 2755–2764.
- Syms, R.R.A., Young, I.R., Ahmad, M.M., Rea, M., Wadsworth, C.A., & Taylor-Robinson, S.D. 2010. Thin-Film detector system for internal magnetic resonance imaging. *Sensors and Actuators A : physical*, **163**(09), 15–24.
- Szarowski, D.H., Andersen, M., Retterer, S., Spence, A., Isaacson, M., Craighead, H.G., Turner, J., & Shain, W. 2003. Brain responses to micro-machined silicon devices. *Brain Research*, **983**(09), 23–35.
- Tator, C., & Wassenaar, W. 1977. Intraneoplastic injection of methotrexate for experimental brain tumor chemotherapy. *Journal of Neurosurgery*, **46**(03), 165–74.
- Tkáč, I., Rao, R., Georgieff, M., & Gruetter, R. 2003. Developmental and regional changes in the neurochemical profile of the rat brain determined by *in vivo* ^1H NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, **50**(01).
- Tkáč, I., Starčuk, Z., Choi, I.Y., & Gruetter, R. 1999. *In vivo* ^1H NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. *Magnetic Resonance in Medicine*, **41**(4), 649–656.
- Ungerstedt, U. 1984. Measurement of neurotransmitter release by intracranial dialysis. *Measurement of Neurotransmitter Release In Vivo*, **6**(01), 81–107.
- Ungerstedt, U., Herrera-Marschitz, M., Jungnelius, U., Ståhle, L., Tossman, U., & Zetterström, T. 1982. Dopamine synaptic mechanisms reflected in studies combining behavioural recordings and brain dialysis.
- Valvona, C., Helen, F., Nunn, P., & Pilkington, G. 2015. The regulation and function of lactate dehydrogenase A : therapeutic potential in brain tumor. *Brain Pathology*, **26**(08).
- Van Erum, J., Van Dam, D., & De Deyn, P.P. 2019. Alzheimer's disease : neurotransmitters of the sleep-wake cycle. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **105**, 72–80.
- Vanhamme, L., Boogaart, A., & Huffel, S. 1997. Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *Journal of Magnetic Resonance*, **129**(12), 35–43.

- Vanhamme, L., Fierro, R., Huffel, S., & R, D. 1998. Fast removal of residual water in ^1H spectra. *Journal of Magnetic Resonance*, **132**(07), 197–203.
- Verma, A., Kumar, I., Verma, N., Aggarwal, P., & Ojha, R. 2016. Magnetic resonance spectroscopy - Revisiting the biochemical and molecular milieu of brain tumors. *BBA Clinical*, **5**(04).
- Vetter, D., Kastler, B., & Patay, Z. 2018. Chapitre 15 - La spectrométrie par résonance magnétique. *Pages 337–353 of : Comprendre L'IRM*, huitième Édition edn. Paris : Elsevier Masson.
- Vuori, K., Kankaanranta, L., Häkkinen, A.M., Gaily, E., Valanne, L., Granström, M.L., Joensuu, H., Blomstedt, G., Paetau, A., & Lundbom, N. 2004. Low-grade gliomas and focal cortical developmental malformations : differentiation with proton MR spectroscopy. *Radiology*, **230**(03), 703–8.
- Wada, H., Sekino, M., Ohsaki, H., Hisatsune, T., Ikehira, H., & Kiyoshi, T. 2010. Prospect of high-field MRI. *IEEE Transactions on Applied Superconductivity*, **20**(3), 115–122.
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., & Eppenberger, H. 1992. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands : The 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochemical Journal*, **281** (Pt 1)(12), 21–40.
- Watanabe, H., Okada, M., Kaji, Y., Satouchi, M., Sato, Y., Yamabe, Y., Onaya, H., Endo, M., Sone, M., & Arai, Y. 2009. New response evaluation criteria in solid tumours - Revised RECIST Guideline. *Cancer and Chemotherapy*, **36**(12), 2495–501.
- Wild, J.M., & Marshall, I. 1999. *In vivo* lactate editing in single voxel proton spectroscopy and proton spectroscopic imaging by homonuclear polarisation transfer. *Magnetic Resonance Imaging*, **17**(1), 131–139.
- Winslow, B., & Tresco, P. 2009. Quantitative analysis of the tissue response to chronically implanted microwire electrodes in rat cortex. *Biomaterials*, **31**(12), 1558–67.
- Wirth, E.D., Mareci, T.H., Beck, B.L., Fitzsimmons, J.R., & Reier, P. 1993. A comparison of an inductively coupled implanted coil with optimized surface coils for *in vivo* NMR imaging of the spinal cord. *Magnetic Resonance in Medicine*, **30**.
- Woo, C.W., Lee, B., Kim, S., & Kim, K. 2010. Correlation between lactate and neuronal cell damage in the rat brain after focal ischemia : an *in vivo* ^1H magnetic resonance spectroscopic study. *Acta Radiologica*, **51**(02), 344–50.

- Woytasik, M., Ginefri, J.C., Raynaud, J., Poirier-Quinot, M., Dufour-Gergam, E., Grandchamp, J.P., Darrasse, L., Robert, P., Gilles, J.P., Martincic, E., & Girard, O. 2007. Characterization of flexible RF microcoil dedicated to surface MRI. *CoRR*, 11.
- Wu, N., Peck, T.L., Webb, A.G., Magin, R.L., & Sweedler, J.V. 1994. ^1H NMR spectroscopy on the nanoliter scale for static and on-line measurements. *Analytical Chemistry*, **66**, 3849–3857.
- Yan, G.P., Robinson, L., & Hogg, P. 2007. Magnetic resonance imaging contrast agents : overview and perspectives. *Radiography*, **13**, e5–e19. MRI and Contrast Agents.
- Yang, Y., Su, D., Zhao, L., Zhang, D., Xu, J., Wan, J., Fan, S., & Chen, M. 2014. Different effects of LDH-A inhibition by oxamate in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget*, **5**(23), 11886–11896.
- Zhang, C., Deng, Y., Dai, H., Zhou, W., Tian, J., Bing, G., & Zhao, L. 2016. Effects of dimethylsulfoxide on the morphology and viability of primary cultured neurons and astrocytes. *Brain Research Bulletin*, **128**(11).
- Zhang, X., Schneider, J.E., Portnoy, S., Bhattacharya, S., & Henkelman, R.M. 2010. Comparative SNR for high-throughput mouse embryo MR microscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, **63**.

Annexes

Publications et communications

- **Deborne, J.**, Pinaud, N., Crémillieux, Y. Proton MRS on sub-microliter volume in rat brain using implantable NMR microcoils. *NMR in Biomedicine*. 2021 ; e4578. doi : <https://doi.org/10.1002/nbm.4578>.
- **Deborne, J.**, Pinaud, N., Crémillieux, Y. Implantable NMR microcoils in rats : a new tool for exploring tumor metabolism at sub-microliter scale? *Metabolites*. 2021 ; 11(3) : 176. doi : <https://doi.org/10.3390/metabo11030176>.

Communications scientifiques

- **Deborne, J.**, Pinaud, N., Crémillieux, Y. Implantable NMR microcoil coupled to microdialysis : application to tumor diagnosis and therapy. *17^{èmes} journées annuelles du Cancéropole Grand Sud-Ouest, Carcassonne, 2021* - Poster.
- **Deborne, J.**, Pinaud, N., Ciobanu, L., Boumezbeur, F., Wong, A., Crémillieux, Y. Spectroscopie et imagerie à très haute résolution et micro-antennes RMN implantables. *Société Française de Résonance Magnétique Biologique et Médicale (SFRMBM), Lyon, 2021* - Poster.
- **Deborne, J.**, Pinaud, N., Ciobanu, L., Boumezbeur, F., Wong, A., Crémillieux, Y. Development of implantable NMR microcoils for biomedical applications. *World Molecular Imaging Congress (WMIC), congrès virtuel, 2020* - Poster.
- **Deborne, J.**, Pinaud, N., Ciobanu, L., Wong, A., Crémillieux, Y. Minimally invasive implantable NMR microcoils for *in vivo* metabolic profiling of microliter volumes. *European Molecular Imaging Meeting (EMIM), congrès virtuel, 2020* - Oral.

Brevet

- Crémillieux, Y., Pinaud, N., **Deborne, J.** Dispositif couplant la détection RMN intratissulaire et l'administration de molécules.

Curriculum vitae

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

- 10.2019 – 10.2022** **DOCTORAT**
Institut des Sciences Moléculaires (ISM) **BORDEAUX**
- Micro-antennes RMN implantables pour l'imagerie métabolique et la spectroscopie
 - Constructions, simulations et optimisations géométriques et électroniques de micro-antennes RMN implantables
 - Expérimentations IRM et SRM in vitro et in vivo sur des rats sains et pathologiques (tumeurs cérébrales) sur un aimant préclinique de 7 T
- 02.2019 – 08.2019** **STAGE**
Grenoble Institut des Neurosciences (GIN) **GRENOBLE**
- Développement de l'IRM fonctionnelle optogénétique (ofMRI) chez la souris
 - Conception et mise en œuvre des expériences d'ofMRI
 - Réalisation d'expériences fMRI chez la souris sur un aimant préclinique de 9.4 T
 - Extraction des cartes d'activation fonctionnelle par post-traitements
- 02.2018 – 08.2018** **STAGE**
Centre de Résonance Magnétique Biologique et Médicale (CRMBM) **MARSEILLE**
- Construction et post-traitement automatisé sous XNAT d'une large base de données (BD) longitudinales d'IRM multimodales chez des patients atteints de sclérose en plaques (SEP)
 - Déploiement du questionnaire XNAT et importation d'une BD d'images IRM multimodales, de données cliniques et neuropsychologiques de patients et de volontaires sains
 - Conception de pipelines de post-traitements et analyses statistiques pour faire émerger les paramètres prédicteurs du handicap lié à la SEP
- 05.2017 – 08.2017** **STAGE**
Institut Paoli-Calmettes (Centre de Lutte Contre le Cancer - CLCC) **MARSEILLE**
- Analyse des écarts de positionnement entre l'imagerie CBCT (Cone Beam Computed Tomography) et l'imagerie de positionnement surfacique chez les patientes traitées en radiothérapie pour un cancer du sein
 - Découverte du métier de physicien médical dans un CLCC

FORMATION

Admissible au concours d'accès à la formation du DQPRM (Diplôme de Qualification en Physique Radiologique et Médicale)

2019 Rang: 23ème sur 110 inscrits

Master 2 – Ingénierie de la Santé, Parcours Physique Médicale **GRENOBLE**
2018 – 2019 Mention Très Bien

Polytech Marseille **MARSEILLE**
2015 – 2018 Diplôme d'Ingénieur en Génie Biomédical

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

08.2020 15th European Molecular Imaging Meeting (EMIM) – congrès virtuel

- Minimally invasive implantable NMR microcoils for in vivo metabolic profiling of microliter volumes
Justine Deborne, Noël Pinaud, Luisa Ciobanu, Alan Wong, Yannick Crémillieux

10.2020 World Molecular Imaging Congress (WMIC) – congrès virtuel

- Development of implantable NMR microcoils for biomedical applications
Justine Deborne, Noël Pinaud, Luisa Ciobanu, Fawzi Boumezbou, Alan Wong, Yannick Crémillieux

09.2021 Société Française de Résonance Magnétique Biologique et Médicale (SFRMBM), Lyon

- Spectroscopie et imagerie à très haute résolution et micro-antennes RMN implantables
Justine Deborne, Noël Pinaud, Luisa Ciobanu, Fawzi Boumezbou, Alan Wong, Yannick Crémillieux

11.2021 17^{èmes} journées du Cancéropole Grand Sud-Ouest, Carcassonne

- Implantable NMR microcoil coupled to microdialysis : application to tumor diagnosis and therapy.
Justine Deborne, Noël Pinaud, Yannick Crémillieux

PUBLICATIONS

Deborne J, Pinaud N, Crémillieux Y. Implantable NMR microcoils in rats: a new tool for exploring tumor metabolism at sub-microliter scale? *Metabolites*. 2021; 11(3):176. <https://doi.org/10.3390/metabo11030176>.

Deborne, J, Pinaud, N, Crémillieux, Y. Proton MRS on sub-microliter volume in rat brain using implantable NMR microcoils. *NMR Biomed*. 2021; e4578. <https://doi.org/10.1002/nbm.4578>.

BREVET

Dispositif couplant la détection RMN intratissulaire et l'administration de molécules

Inventeurs : Yannick Crémillieux, Noël Pinaud, Justine Deborne

COMPETENCES

Langues :

Français (langue maternelle)
Anglais (B2 – TOEIC : 800)

Informatique :

Matlab
Python
C/C++
OS: Linux, Windows, Mac
LaTeX

Logiciels :

ParaVision 6.0.1 (+ TopSpin 4.0)
COMSOL Multiphysics
SPM
ImageJ
MRICron
ITK Snap
jMRUI

Autres :

- Expérimentation animale : Applicateur de procédures expérimentales (ex-Niveau II) Rongeurs et Lagomorphes – 2021
- Formation spécifique destinée aux personnes appliquant des procédures expérimentales aux animaux – Spécialisation chirurgicale – 2021

- Instructrice à l'école d'été « Introduction to Experimental Neuroscience » organisé par l'École des Neurosciences dans le cadre de Bordeaux Neurocampus Graduate Program.
Projet: Développement de nouveaux outils et méthodes pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la spectroscopie par résonance magnétique (SRM) en neurosciences.

Résumé / Abstract

Micro-antennes RMN implantables pour la spectroscopie et l'imagerie métabolique

L'IRM et la SRM, deux techniques issues de la RMN, sont de plus en plus utilisées pour étudier le fonctionnement et l'anatomie du cerveau et pour diagnostiquer et évaluer un grand nombre de pathologies cérébrales. Toutefois, la faible sensibilité inhérente de la RMN fait encore obstacle à l'analyse précise de régions cérébrales de très faible volume. Cette thèse a eu pour but d'explorer une solution pour améliorer cette dernière et qui a consisté à miniaturiser et à implanter l'antenne de détection RF au plus près de la région d'intérêt. Les performances électromagnétiques, notamment caractérisées par un important facteur de gain en sensibilité comparé à l'utilisation d'antennes conventionnelles, et le caractère mini-invasif des micro-antennes RMN implantables développées ici ont permis de mettre en avant, avec une bonne reproductibilité et fiabilité, les différences métaboliques et morphologiques entre un tissu cérébral sain et un tissu cérébral tumoral sur des échantillons biologiques de très faible volume (de l'ordre du μL) chez des rats sains et chez des rats porteurs d'un gliome C6. D'autres applications ont pu être, par la suite, envisagées comme l'association d'une micro-antenne RMN et d'un système d'injection d'un composé d'intérêt permettant de suivre, en temps réel, l'effet de ce dernier sur le métabolisme de l'échantillon biologique implanté. Par l'implantation de ce dispositif chez des rats porteurs d'un gliome C6, l'efficacité thérapeutique de deux molécules antitumorales a pu être évaluée, en temps réel, par l'évolution de biomarqueurs spectroscopiques caractéristiques d'une réponse thérapeutique observables sur les spectres RMN ^1H acquis avec la micro-antenne RMN. Ces diverses applications ont ainsi démontré tout le potentiel de ces micro-antennes RMN implantables dans l'analyse d'échantillons de faible volume.

Mots-clés : Micro-antenne RMN, SRM et IRM *in vivo*, métabolisme tumoral, efficacité thérapeutique

Implantable NMR microcoils for spectroscopy and metabolic imaging

MRI and MRS, two techniques derived from NMR, are increasingly used to study brain function and anatomy and to diagnose and evaluate a wide range of brain pathologies. However, the inherent low sensitivity of NMR still hinders the accurate analysis of very small brain regions. The aim of this thesis was to explore a solution to improve the latter and which consisted in miniaturizing and implanting the RF detection coil as close as possible to the region of interest. The electromagnetic performances, notably characterized by an important sensitivity factor of gain compared to the use of conventional coils, and the mini-invasive character of the implantable NMR microcoils developed here allowed to highlight, with a good reproducibility and reliability, the metabolic and morphological differences between healthy and tumoral brain tissue on biological samples of very small volume (of the order of μL) in healthy rats and in C6 glioma-bearing rats. Other applications could be, thereafter, envisaged like the association of a NMR microcoil and a system of injection of a compound of interest allowing to follow, in real time, the effect of this last one on the metabolism of the implanted biological sample. By implanting this device in C6 glioma-bearing rats, the therapeutic efficacy of two antitumor molecules could be evaluated, in real time, by the evolution of spectroscopic biomarkers characteristic of a therapeutic response observable on the ^1H NMR spectra acquired with the NMR microcoil. These various applications have demonstrated the full potential of these implantable NMR microcoils for the analysis of small volume samples.

Keywords : NMR microcoil, *in vivo* MRS and MRI, tumor metabolism, therapeutic efficacy

Unité de recherche

Institut des Sciences Moléculaires, CNRS UMR 5255, Université de Bordeaux, Bordeaux, France.