



HAL
open science

Spectroscopie RMN in vivo éditée, couplée à de l'IRM multiparamétrique pour localiser la zone épileptogène dans un modèle animal d'épilepsie focale

Alicia Plaindoux

► **To cite this version:**

Alicia Plaindoux. Spectroscopie RMN in vivo éditée, couplée à de l'IRM multiparamétrique pour localiser la zone épileptogène dans un modèle animal d'épilepsie focale. Autre. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2024. Français. NNT : 2024GRALS012 . tel-04790608

HAL Id: tel-04790608

<https://theses.hal.science/tel-04790608v1>

Submitted on 19 Nov 2024

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

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : ISCE - Ingénierie pour la Santé la Cognition et l'Environnement

Spécialité : BIS - Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement

Unité de recherche : Grenoble Institut des Neurosciences

Spectroscopie RMN in vivo éditée, couplée à de l'IRM multiparamétrique pour localiser la zone épileptogène dans un modèle animal d'épilepsie focale.

Edited in vivo NMR spectroscopy, coupled with multiparametric MRI to locate the epileptogenic zone in an animal model of focal epilepsy.

Présentée par :

Alicia PLAINDOUX

Direction de thèse :

Benjamin LEMASSON

CHARGE DE RECHERCHE HDR, INSERM DELEGATION AUVERGNE-RHONE-ALPES

Directeur de thèse

Florence FAUVELLE

INGENIEURE DE RECHERCHE HDR, INSERM DELEGATION AUVERGNE-RHONE-ALPES

Co-directrice de thèse

Vasile STUPAR

INGENIEUR DE RECHERCHE, INSERM DELEGATION AUVERGNE-RHONE-ALPES

Co-encadrant de thèse

Rapporteurs :

HELENE RATINEY

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS DELEGATION RHONE AUVERGNE

YANNICK CREMILLIEUX

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION AQUITAINE

Thèse soutenue publiquement le **30 mai 2024**, devant le jury composé de :

PHILIPPE KAHANE,

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Président

BENJAMIN LEMASSON,

CHARGE DE RECHERCHE HDR, INSERM DELEGATION AUVERGNE-RHONE-ALPES

Directeur de thèse

FLORENCE FAUVELLE,

INGENIEURE DE RECHERCHE HDR, INSERM DELEGATION AUVERGNE-RHONE-ALPES

Co-directrice de thèse

HELENE RATINEY,

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS DELEGATION RHONE AUVERGNE

Rapporteuse

YANNICK CREMILLIEUX,

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION AQUITAINE

Rapporteur

ANGELE VIOLA,

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION PROVENCE ET CORSE

Examinatrice

Invités :

JULIEN VALETTE

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CEA CENTRE DE PARIS-SACLAY

VASILE STUPAR

INGENIEUR DE RECHERCHE, INSERM DELEGATION AUVERGNE-RHONE-ALPES



Remerciements

Ce manuscrit marque la fin de quatre ans de travail au sein de cette équipe du GIN, mais également la conclusion de mes années d'études, de Marseille à Grenoble en passant par Brighton. Avant de tourner la page, je voudrais remercier les personnes qui ont joué un rôle important dans ce parcours.

Tout d'abord, je tiens à remercier sincèrement mes encadrants de thèse. Vasile, merci pour ta patience, notamment durant les longues journées passées sur l'IRM, ta gentillesse et ton écoute. Je suis très reconnaissante de tout ce que j'ai appris en travaillant avec toi. Florence, j'ai beaucoup apprécié ta franchise et ta disponibilité, particulièrement les nombreuses heures à discuter en détail de ce travail. Ton investissement dans ce projet m'a gardée motivée durant ces quatre années. Benjamin, je te remercie pour tes conseils, ton soutien et ta bienveillance.

Je souhaite également adresser mes remerciements à Yann Le Fur pour son aide avec le logiciel CSIApy évidemment, mais aussi d'avoir toujours été disponible pour répondre à mes nombreuses questions. J'ai vraiment apprécié travailler avec toi, notamment lors de ces trois jours à Marseille.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes de l'équipe. Je souhaite remercier Lucile Mazière pour la gestion des souris et l'aide qu'elle m'a apportée lors de mes premiers mois en tant que stagiaire puis au début de ma thèse. Merci à Clothilde d'avoir ensuite pris le relais avec les souris et pour l'aide en immunohistologie, mais également pour sa bonne humeur toujours présente. Comment parler de Clothilde sans penser à la petite boule d'énergie prénommée Loan ? J'ai adoré partager le bureau avec vous, Chiara la camarade de voyage idéale, et Romane et Camille ces derniers mois. Vous avez fait de ce bureau un lieu de travail dynamique et stimulant rempli d'entraide et de discussions intéressantes, mais aussi de papotages, grignotages et rires, rendant ces derniers mois bien plus agréables. Une pensée également à mes anciens co-bureaux : Argheesh, (les) Clément, Chloé et Mous. Je voudrais également faire une mention spéciale à mon petit frère de l'équipe Thomas, ainsi qu'à Sébastien, Jean-Côme, Diego, Marc, Lucrezia, Benjamin, et tous les autres membres des précaires de l'ESR pour les pauses indispensables dans la salle de pause. Merci aussi à Vaëa, notre petit soleil venu de l'autre bout du monde, pour nos conversations toujours enrichissantes, Aurélien pour son écoute et sa bienveillance, et Angélique pour sa gentillesse, sa générosité et nos longues discussions au labo.

Because they had an important role in my motivation to work in the field of MRI and do a PhD, I have to make a small paragraph in English. Mara, thank you for giving me the opportunity to be an intern in your lab in Brighton and for sharing your work and passion for MRI with me. You were the Italian sunshine I needed to survive that English summer, and I will forever be grateful for those three months. Iris, my scientific mother as you like to call yourself, thank you for everything you taught me, your advice and your kindness. I will never forget all the hours we spent together working and laughing, even on the floor of your apartment with Cristina.

Je tiens aussi à remercier mes amies qui incarnent le raffinement le plus ultime, d'être là depuis bientôt 7 ans et pour des années encore, je l'espère. Floriane, l'une des premières personnes que j'ai connues à Grenoble, je suis très reconnaissante de t'avoir rencontré en ce dimanche de randonnée BDS et de te compter parmi mes amies encore aujourd'hui. Marie, nos pauses goûter brownies/glaces pendant la rédaction et toutes nos discussions de thésardes m'ont été indispensables ces dernières années. Merci à Solène, pour sa gentillesse en toutes circonstances, et à Mathilde qui même à distance nous transmet sa bonne humeur.

Je ne peux également pas oublier les Trampotes : Nico et Lucie, Charles et Flo (encore une fois), et Monge. Merci pour toutes ces soirées et tous ces weekends de rigolades, jeux, crêpes, cache-cache, fritures et autres. Merci aussi à Maëlle, notre petite squatteuse préférée, pour nos nombreuses conversations entre thésardes.

Enfin, je souhaite remercier infiniment ma famille. Merci à mes parents, mon petit frère et notre petite Irys, pour leur amour et leur soutien depuis toujours.

Et pour finir, merci Yann pour ton soutien pendant cette thèse évidemment, mais surtout depuis 10 ans maintenant, et pour notre boule d'amour infatigable Solar.

Plan de thèse

PLAN DE THESE	1
NOMENCLATURE	5
1. INTRODUCTION	9
2. ÉTAT DE L'ART	13
2.1 L'ÉPILEPSIE DU LOBE MESIO-TEMPORAL	14
2.1.1 Généralités sur l'épilepsie	14
2.1.2 Les spécificités de l'épilepsie du lobe méso-temporal	16
2.1.3 Le modèle de souris KA-MTLE.....	21
2.2 RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE.....	23
2.2.1 Principes de base	23
2.2.1.1 Aimantation.....	23
2.2.1.2 Équations de Bloch.....	24
2.2.1.3 Signal RMN.....	25
2.2.2 Imagerie par résonance magnétique	26
2.2.2.1 Principe.....	26
2.2.2.2 IRM dans l'étude de l'épilepsie	29
2.2.3 Spectroscopie RMN.....	33
2.2.3.1 Théorie.....	33
2.2.3.2 Spécificités de la spectroscopie RMN in vivo	36
2.2.3.3 Métabolisme dans l'épilepsie.....	39
2.2.3.4 Principe de l'édition du GABA par la méthode MEGA.....	42
2.2.3.5 Méthodes de localisation	49
2.2.3.6 Imagerie spectroscopique : MRSI.....	55
2.2.3.7 Traitement et visualisation des données	58
2.3 CONCLUSION	67
3. DEVELOPPEMENT ET EVALUATION DES METHODES DE SPECTROSCOPIE IN VIVO	69
3.1 INTRODUCTION	69
3.1.1 Programmation des séquences.....	69
3.1.2 Fabrication des fantômes.....	72
3.2 MEGA-LASER SIMPLE-VOXEL.....	73
3.2.1 Développement de la méthode	73
3.2.1.1 Impulsions MEGA.....	75
3.2.1.2 Gradients/Spoilers	76
3.2.1.3 Calcul du Temps d'Écho.....	77
3.2.1.4 ON et OFF entrelacées	79
3.2.1.5 Affichage sur l'interface de ParaVision	79
3.2.1.6 Schéma récapitulatif.....	80
3.2.2 Tests sur fantômes	82
3.2.3 Tests sur souris	86
3.3 CSI MEGA-LASER	88

3.3.1	Développement de la méthode	88
3.3.1.1	<i>De la CSI PRESS à la CSI LASER</i>	90
3.3.1.2	<i>De la CSI LASER à la CSI MEGA-LASER</i>	91
3.3.2	Tests sur fantômes	92
3.3.2.1	<i>Localisation</i>	92
3.3.2.2	<i>Efficacité de l'édition</i>	94
3.3.2.3	<i>Conclusion</i>	103
3.3.3	Tests sur souris	104
3.3.3.1	<i>Optimisation des spoilers</i>	104
3.3.3.2	<i>Optimisation du protocole d'acquisition et problématiques rencontrées</i>	105
4.	DEVELOPPEMENT ET EVALUATION DES OUTILS DE TRAITEMENT DES DONNEES	109
4.1	INTRODUCTION	109
4.2	RECONSTRUCTION ET VISUALISATION DES DONNEES CSI MEGA-LASER ENTRELACEES AVEC CSIAPY	110
4.3	EXPORTATION DES DONNEES BRUTES POUR LE PRETRAITEMENT	116
4.4	PRETRAITEMENT DES DONNEES D'EDITION MEGA AVEC JET	118
4.5	QUANTIFICATION ET OBTENTION DES CARTES METABOLIQUES.....	121
4.6	CONCLUSION ET DISCUSSION.....	126
5.	APPLICATION AU MODELE MURIN KA-MTLE	129
5.1	INTRODUCTION	129
5.2	MATERIEL ET METHODES	130
5.2.1	Modèle KA-MTLE.....	130
5.2.2	Acquisitions IRM	130
5.2.2.1	<i>CSI MEGA-LASER</i>	131
5.2.2.2	<i>IRM Multiparamétrique</i>	132
5.2.3	Traitement des données	133
5.2.3.1	<i>CSI MEGA-LASER</i>	133
5.2.3.2	<i>IRM multiparamétrique</i>	136
5.2.4	Autres études	137
5.2.4.1	<i>EEG</i>	137
5.2.4.2	<i>RMN ¹H HRMAS</i>	137
5.2.4.3	<i>Immunohistologie</i>	138
5.2.4.4	<i>Western Blot</i>	139
5.2.5	Récapitulatif du protocole expérimental.....	142
5.3	RESULTATS.....	143
5.3.1	Modification morphologique de l'hippocampe après injection de kaïnate.....	143
5.3.2	Identification de la zone épileptogène	144
5.3.2.1	<i>Variation de GABA+/GLX chez les souris KA-MTLE</i>	144
5.3.2.2	<i>Variation de GABA+/GLX au cours de la période d'épileptogénèse</i>	149
5.3.2.3	<i>Analyse multiparamétrique</i>	150
5.3.2.4	<i>EEG : validation de l'épilepsie</i>	151
5.3.2.5	<i>Immunohistologie</i>	151
5.3.2.6	<i>Western blot</i>	157
5.4	DISCUSSION	158

6.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	163
7.	REFERENCES	167
8.	ANNEXES	181
8.1	CURRICULUM VITAE	181
8.2	COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	182
8.3	ANNEXE 3 : DONNEES SUPPLEMENTAIRES DU CHAPITRE 5.....	183
8.3.1	Illustrations supplémentaires	183
8.3.2	Variation du GABA+/GLX dans l'hippocampe ipsilatéral	189

Nomenclature

ACME	Automated phase Correction based on Minimization of Entropy
ADC	Apparent Diffusion Coefficient
AFP	Adiabatic Full Passage
BBBp	Blood-Brain Barrier permeability
BHE	Barrière Hémato-encéphalique
BVf	Blood Volume fraction
CHO	Choline = phosphocholine + glycerophosphocholine + choline libre
CR	Créatine + phosphocréatine
CSDE	Chemical Shift Displacement Error
CSI	Chemical Shift Imaging
DTI	Diffusion Tensor Imaging
EEG	Électroencéphalogramme
FID	Free Induction Decay
FOV	Field Of View
FT	Fourier Transform
GABA	Acide Gamma-aminobutyrique
GABA+	GABA + Macromolécules
GAD	Glutamate Décarboxylase
GLN	Glutamine
GLU	Glutamate
GLX	Glutamate + Glutamine
HRMAS	High Resolution Magic Angle Spinning
HS	Hyperbolic Secant
Icoshift	Interval Correlation Optimized SHIFTing
iEEG	Électroencéphalogramme intracranial
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
JSON	JavaScript Object Notation
KA	Kainate ou acide kainique
LASER	Localization by Adiabatic SElective Refocusing
MRSI	Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging
MTLE	Mesial-Temporal Lobe Epilepsy
NAA	N-acetyl aspartic acid

Nifti-MRS	Magnetic Resonance Spectroscopy in Neuroimaging Informatics Technology Initiative
PRESS	Point RESolved Spectroscopy
RF	Radio-Frequency
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROI	Region Of Interest / Région d'intérêt
sLASER	semi-LASER
SNR	Signal/Noise Ratio
SPECIAL	SPin ECho full Intensity Acquired Localized spectroscopy
SRM	Spectroscopie par Résonance Magnétique
TE	Temps d'Echo
TLE	Temporal Lobe Epilepsy
TMS	Tétraméthylsilane
TR	Temps de Répétition
TSP	Acide triméthylsilylpropanoïque
VAPOR	Variable Pulse powers and Optimized Relaxation delays
ZE	Zone Epileptogène

1. Introduction

Dans l'esprit du public, l'épilepsie est associée aux crises convulsives, aux absences ou encore à la rigidité musculaire. Cependant, il existe plusieurs types d'épilepsies, qui peuvent se manifester par une grande variété de symptômes et s'accompagner de troubles de l'humeur et du comportement. L'ensemble de ces syndromes est donc complexe et diversifié, et représente la troisième maladie neurologique la plus fréquente dans le monde [1]. Chaque syndrome est également associé à sa propre évolution spécifique. On estime qu'environ 500 000 personnes souffrent d'épilepsie en France. Près de la moitié d'entre elles ont moins de 20 ans. À l'échelle internationale, la maladie affecte plus de 50 millions de personnes, avec une estimation de 10 à 200 cas pour 100 000 personnes selon le niveau de revenu et le système de santé du pays [1].

Les traitements de l'épilepsie sont principalement médicamenteux et leur objectif est de limiter la propagation des crises. Grâce à ces traitements, la maladie peut être contrôlée, dans 60 à 70 % des cas [2]. Lorsque le patient développe une résistance aux traitements et qu'une région cérébrale est clairement identifiée comme étant la zone d'initiation des crises, appelée la zone épileptogène (ZE), la chirurgie peut être envisagée tant que cette zone est unique et suffisamment éloignée des régions hautement fonctionnelles (par exemple, impliquées dans le langage, les compétences motrices, etc.). Dans ce cas, des examens approfondis sont réalisés pour évaluer le rapport bénéfice-risque d'une telle chirurgie. L'opération consiste à enlever ou déconnecter la ZE. En pratique, cela n'est possible que pour une minorité de patients souffrant d'épilepsie partielle résistante aux médicaments.

La localisation spatiale de la ZE la plus précise possible est indispensable pour réaliser une chirurgie qui soit efficace, en termes de taux de suppression des crises, et non invalidante. Ainsi, le développement de nouvelles méthodes non invasives constitue une partie importante de la recherche sur l'épilepsie. Un autre enjeu fondamental est de comprendre comment les crises récurrentes (l'épilepsie chronique) émergent. Il est suggéré qu'au moins 10 % de la population fait l'expérience d'au moins une crise au cours de sa vie [3]. Des facteurs tels qu'une lésion cérébrale (traumatisme, AVC, etc.), l'usage de drogues et de substances toxiques (certains antidépresseurs ou analgésiques), ou une anomalie métabolique, peuvent expliquer l'occurrence d'une crise épileptique unique et isolée [4]. Cependant, cela ne mène pas nécessairement à une épilepsie chronique. La prise en charge de l'épilepsie représente donc un défi majeur, en raison de la complexité des mécanismes impliqués, de la diversité des syndromes épileptiques et de la résistance d'une partie des patients aux traitements pharmacologiques conventionnels.

Au cœur de cet enjeu se trouve l'épilepsie du lobe mésio-temporal (MTLE), une forme courante et particulièrement étudiée d'épilepsie focale, caractérisée par sa pharmacorésistance et la sclérose unilatérale de l'hippocampe. Le diagnostic et le traitement de la MTLE nécessitent une identification précise de cette ZE. Cependant, pour effectuer cela, les méthodes actuelles de localisation, bien qu'avancées, reposent parfois sur des techniques en partie invasives, comme l'EEG intracrânienne, et manquent de précision spatiale.

Dans ce contexte, la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) apparaît comme une technique non invasive et non destructive, capable de fournir des informations sur les changements métaboliques au sein du cerveau. Plus particulièrement, l'imagerie spectroscopique RMN *in vivo* malgré sa faible résolution, pourrait permettre de détecter ces modifications pour localiser la ZE. D'autres part, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) a une excellente résolution spatiale et est déjà utilisée lors du diagnostic pré-chirurgical pour obtenir des informations structurelles. Mais elle peut aussi être utilisée pour acquérir des données quantitatives (par exemple vasculaires ou de perfusion).

L'approche expérimentale, utilisant un modèle MTLE induit chez les souris, nommé KA-MTLE, reproduit plusieurs aspects du syndrome MTLE humain. Cette similitude permet une exploration des mécanismes sous-jacents à ce syndrome. Récemment, la spectroscopie RMN, réalisée dans la ZE, a révélé une augmentation significative du neurotransmetteur inhibiteur GABA chez ce modèle animal [5], suggérant son rôle potentiel dans la modulation de l'excitabilité neuronale dans ces régions ainsi que sa possible utilisation comme biomarqueur de la ZE. Ainsi, l'imagerie spectroscopique du GABA pourrait être une solution pour étendre spatialement la détection du GABA à une partie du cerveau et donc permettre la localisation de la ZE. L'utilisation de l'IRM quantitative, chez ce même modèle, a également montré un potentiel pour l'identification et la localisation spatiale de la ZE [6].

Dans ce contexte, l'objectif premier de ce travail était le développement d'une méthode d'imagerie spectroscopique d'édition du GABA pour le modèle de souris KA-MTLE, puis l'évaluation de sa capacité à localiser spatialement la ZE, seule ou en combinaison avec l'IRM multiparamétrique. Une étude biologique préliminaire a aussi été conduite afin de fournir quelques pistes de compréhension des mécanismes biologiques conduisant à l'augmentation du GABA observée en spectroscopie RMN.

2. État de l'art

Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord présenter une synthèse des connaissances sur l'épilepsie, en se concentrant sur l'épilepsie du lobe mésio-temporal (MTLE pour Mesial-Temporal Lobe Epilepsy en anglais), une des formes les plus fréquentes d'épilepsie focale. Le modèle murin associé à ce syndrome, que nous avons utilisé pour la partie expérimentale, sera également présenté.

Ensuite, la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), technique centrale de ce travail, sera brièvement décrite à travers ses applications en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et en spectroscopie RMN, dans le cadre de l'épilepsie. En particulier, la spectroscopie RMN *in vivo* sera présentée, afin d'en montrer le potentiel pour l'identification de la ZE, et nous détaillerons le choix de la méthode développée lors de cette thèse.

2.1 L'épilepsie du lobe méso-temporal

2.1.1 Généralités sur l'épilepsie

Aujourd'hui, l'épilepsie touche environ 50 millions de personnes dans le monde [1]. C'est une maladie neurologique chronique caractérisée par une activité électrique cérébrale anormale survenant de façon paroxystique : la crise d'épilepsie. Une crise se définit par l'hyperexcitation et l'hypersynchronisation d'une population plus ou moins étendue de neurones. Sur le plan clinique, les crises se manifestent par l'apparition soudaine et transitoire de symptômes neurologiques (cliniques et électrophysiologiques) : convulsions, absences, troubles du langage, signes végétatifs, etc. L'épilepsie a donc des conséquences neurologiques, cognitives, psychologiques et sociales, lourdes pour les patients.

Il a été identifié environ 50 syndromes d'épilepsie différents [7], dont certains ont une cause génétique connue, mais la plupart sont multifactoriels, c'est-à-dire liés à des facteurs héréditaires, lésionnels et environnementaux. Tous ces syndromes ont en commun une excitation synchronisée et anormale d'un groupe de neurones dans une zone spécifique du cerveau, qui peut se propager à d'autres régions cérébrales. Les crises généralisées et focales sont les deux principaux types de crises épileptiques. Les crises généralisées résultent de l'excitation et de la synchronisation des neurones provenant des deux hémisphères cérébraux, de façon bilatérale et synchrone, tandis que les crises focales sont initiées dans une zone spécifique du cerveau appelée zone épileptogène (ZE). Les crises focales sont accompagnées d'une variété de symptômes, souvent moins éloquents que les crises généralisées, tels que des troubles du langage, des signes émotionnels et des gestes automatiques.

L'activité particulière des neurones pendant une crise produit une activité électrique qui peut être enregistrée par électroencéphalogramme (EEG), c'est-à-dire par un ensemble d'électrodes qui recueillent le signal au niveau du cuir chevelu ou des structures profondes lorsque des électrodes ont été implantées par neurochirurgie. L'EEG est ainsi l'examen clé de l'épilepsie, tant pour le diagnostic que pour le suivi de la maladie. La description, la fréquence et la localisation des anomalies enregistrées en dehors des crises permettent de déterminer les caractéristiques du syndrome épileptique et/ou d'identifier la zone spécifique du cerveau impliquée [8]. Pendant les crises, la synchronisation des neurones se traduit par un signal périodique caractérisé par des bandes de fréquences spécifiques (Figure 2-1).

Il existe différents traitements de l'épilepsie, avec en première ligne les traitements pharmacologiques. Les médicaments antiépileptiques (plus de 30 disponibles) sont des molécules qui réduisent le risque de récurrence des crises ou empêchent la généralisation des crises, mais qui n'agissent pas sur la cause de l'épilepsie [9]. En outre, chez un tiers des patients ces médicaments restent inefficaces [10]. Pour ceux-là, la chirurgie résectrice de la ZE peut être proposée mais reste extrêmement limitée puisqu'elle ne doit pas conduire à l'atteinte d'une zone du cerveau majeure pour la vie du patient. La solution chirurgicale concerne environ 10% des patients pharmaco-résistants à une épilepsie focale.

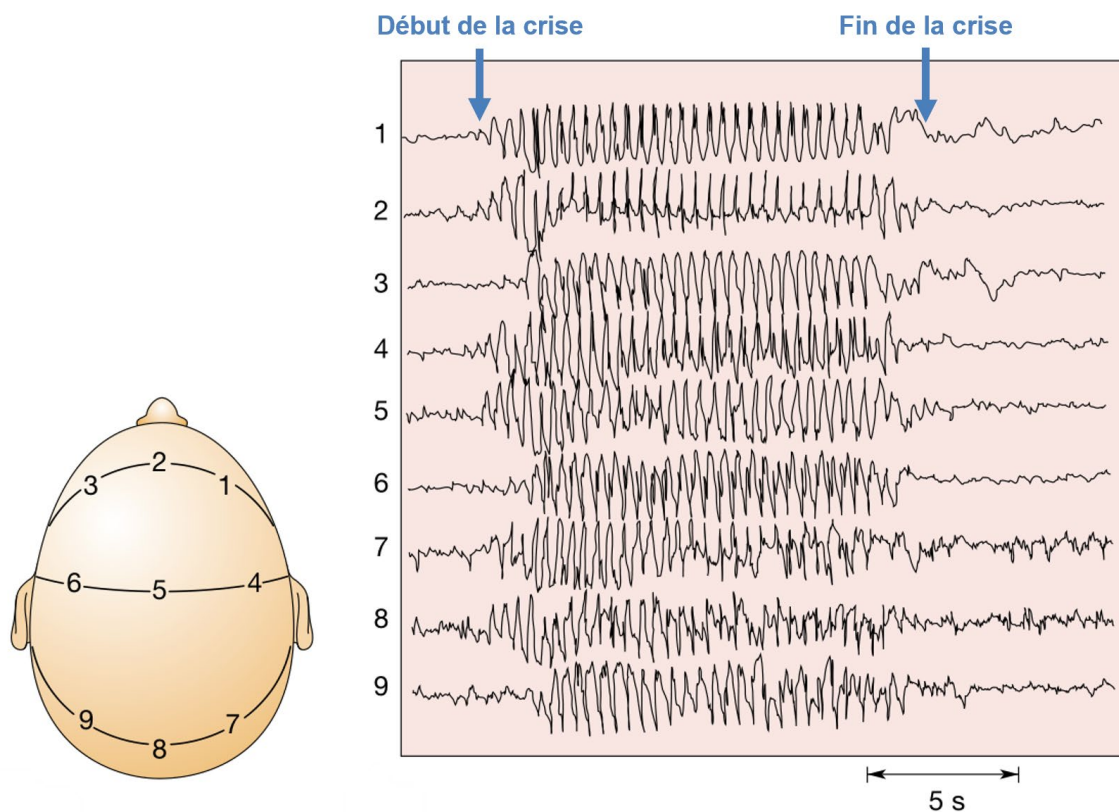


Figure 2-1. Enregistrement EEG caractéristique d'une crise d'épilepsie généralisée. (a) Les électrodes d'EEG sont placées à des endroits bien déterminés du scalp. (b) Ces électrodes détectent une crise d'épilepsie qui débute brutalement et qui est synchronisée sur l'ensemble de la tête (adapté de [11]).

2.1.2 Les spécificités de l'épilepsie du lobe méso-temporal

Les épilepsies du lobe temporal sont une des formes les plus fréquentes d'épilepsie focale. Dans le syndrome d'épilepsie temporale, les crises sont initiées dans les structures temporales du cerveau et en particulier l'hippocampe antérieur, le gyrus parahippocampique et l'amygdale (Figure 2-2). Lorsque l'hippocampe présente une lésion caractéristique, on parle d'épilepsie du lobe méso-temporal (MTLE). Cette lésion peut être plus ou moins prononcée et les patients ont une anamnèse bien caractérisée [12].

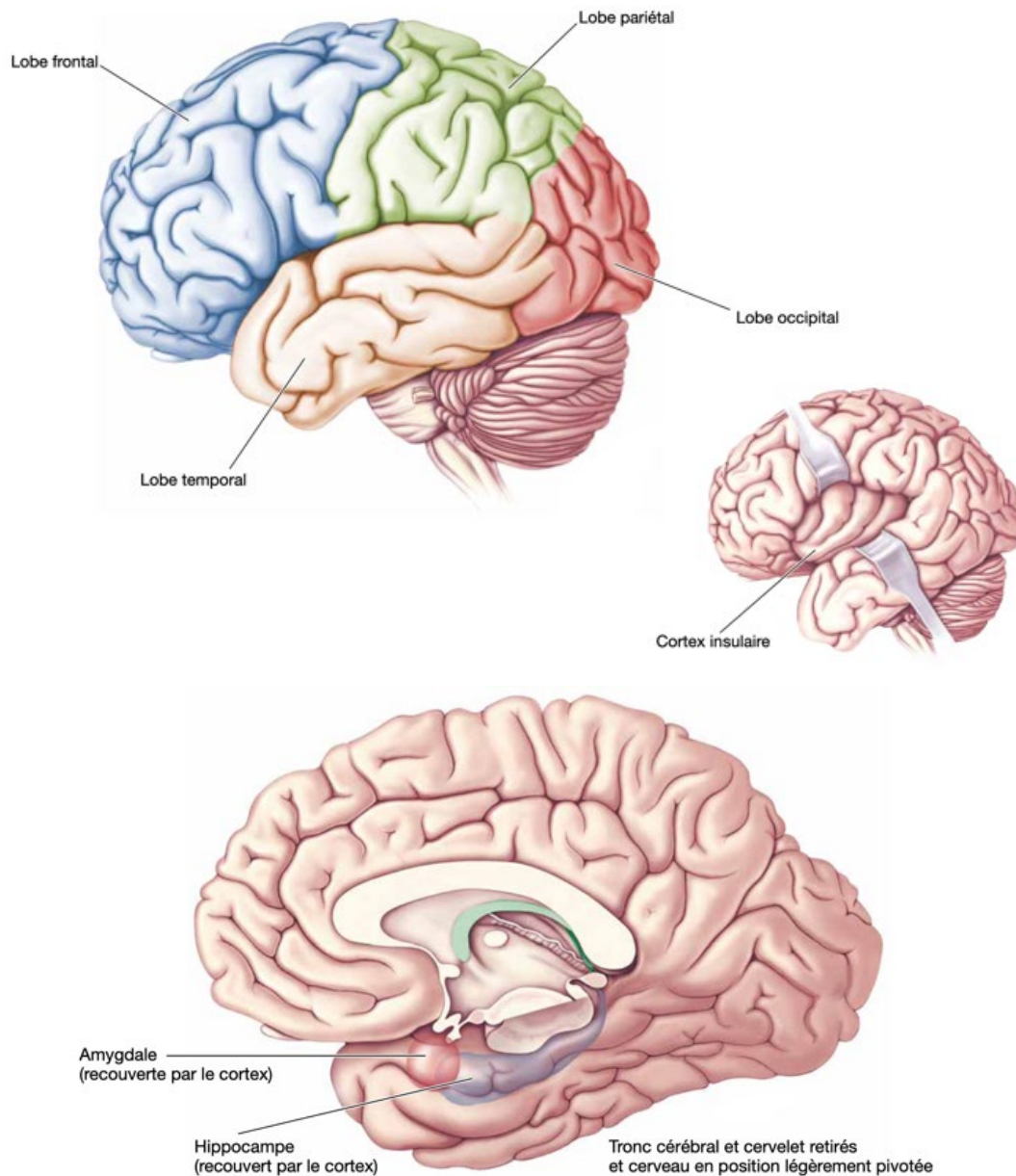


Figure 2-2. Vues latérale et médiale du cerveau.
Haut : le lobe temporal gauche en orange / Bas: l'hippocampe droit en bleu [11].

En effet, environ 70 à 80 % des patients atteints de MTLE présentent une histoire clinique similaire, qui commence généralement dans la petite enfance, mais parfois plus tardivement (80 % des cas avant l'âge de 4 ans, 20 % des cas après 4 ans), avec l'apparition d'un épisode aigu initial, souvent un état de mal fébrile, qui semble jouer un rôle déclencheur. Ces épisodes peuvent également être des traumatismes crâniens, des épisodes infectieux sans crise convulsive, mais une crise fébrile complexe au cours de la première année reste l'évènement le plus fréquemment rapporté [13]. Après cet évènement déclencheur, une période de latence, dite « silencieuse », peut durer plusieurs années avant qu'une manifestation clinique ne survienne, indiquant le début de la phase d'épilepsie chronique. Les premières crises typiques se manifestent en effet plutôt vers le début de la puberté. Les données sur les modèles animaux suggèrent que pendant cette période de latence, le processus d'épileptogénèse se met en place (expliqué plus en détail dans la section suivante). Initialement, les crises peuvent être contrôlées par des médicaments antiépileptiques classiques, mais le plus souvent après quelques années, à l'adolescence ou parfois au début de l'âge adulte, une résistance aux traitements pharmacologiques se développe [14]. La MTLE est ainsi une épilepsie pharmacorésistante. La résection chirurgicale de la ZE peut être proposée aux patients : la MTLE est considérée comme le prototype de l'épilepsie chirurgicale. Lors de l'évaluation pré-chirurgicale, la zone à réséquer doit être délimitée le plus précisément possible. Pour cela, une évaluation multimodale est réalisée, combinant un électroencéphalogramme (EEG) (Figure 2-3) avec une IRM anatomique et fonctionnelle ou une imagerie métabolique (ex : PET-Scan) [15].

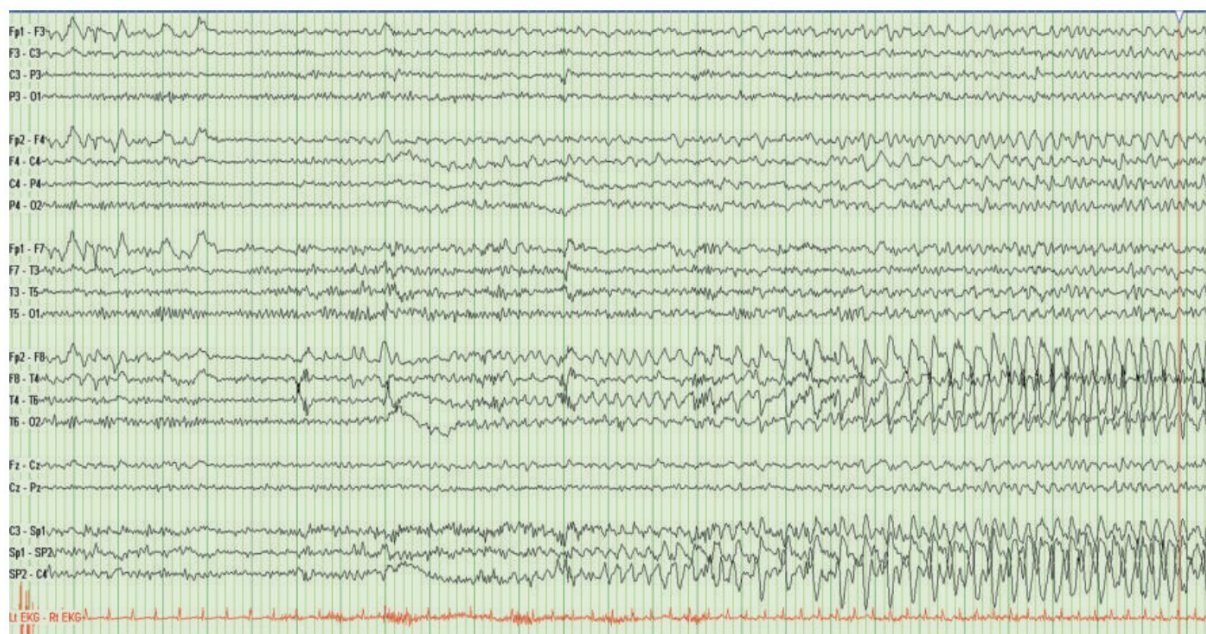


Figure 2-3. EEG d'un homme de 32 ans souffrant d'une épilepsie du lobe temporal mésial droit. L'EEG montre un électrodecrement généralisé et prédominant du côté droit (tracé du bas), suivi d'une augmentation de l'activité rythmique dans la région temporale droite [16].

Ces explorations non invasives sont souvent complétées par des enregistrements d'EEG intracrâniens (iEEG) à l'aide d'électrodes cérébrales profondes (une dizaine environ, comprenant 10-12 contacts) qui permettent une meilleure qualité de définition temporelle mais un échantillonnage spatial limité [17], [18]. Le patient doit être hospitalisé jusqu'à une quinzaine de jours, au cours desquels il est sous surveillance vidéo et son tracé EEG est enregistré en continu. Le positionnement de chaque électrode permet de localiser la ZE et de déterminer si la résection est possible. Pour cela, les explorations non invasives permettant de délimiter la ZE avant la chirurgie doivent être très précises pour éviter une interruption de la chirurgie ou une réimplantation des électrodes [19]. La localisation précise de la ZE est donc un défi.

Malheureusement, malgré ce protocole pré-chirurgical approfondi, la chirurgie ne parvient pas toujours à éliminer complètement les crises, car 20 à 50 % des patients continuent à avoir des crises après l'opération [20]. Les explications les plus probables sont l'existence de plusieurs foyers épileptogènes ou la délimitation incomplète de la zone à réséquer.

Le syndrome de MTLE se caractérise également par des anomalies tissulaires observées par histologie sur les pièces de résection. Ces anomalies sont appelées sclérose de l'hippocampe ou de la corne d'Ammon (CA). Cette sclérose se caractérise par une perte neuronale et une dispersion des cellules (Figure 2-4). La sclérose est aussi observée *in vivo* par IRM anatomique haute résolution chez la plupart des patients (Figure 2-5), mais ne correspond pas exactement à la zone épileptogène.

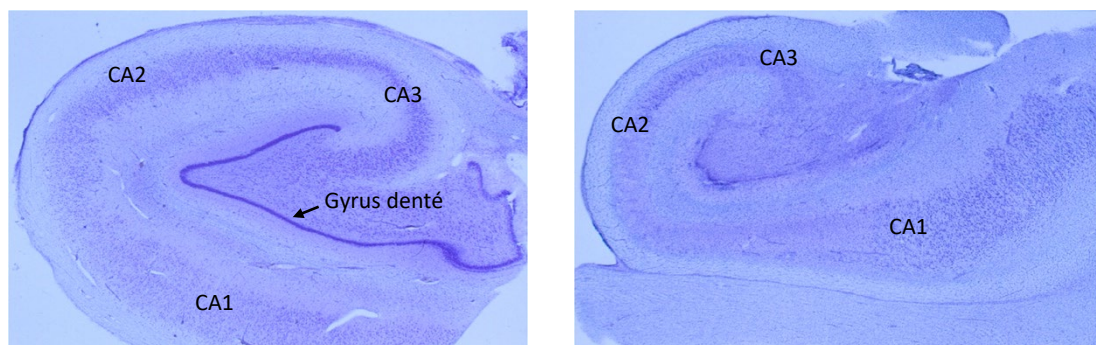


Figure 2-4. Coupes post-mortem marquées au crésyl violet de l'hippocampe d'un patient sain sur le plan neurologique (gauche) et d'un patient MTLE (droite). La corne d'Ammon est divisée en trois régions : CA1, CA2 et CA3. Images fournies par Sophie Hamelin.

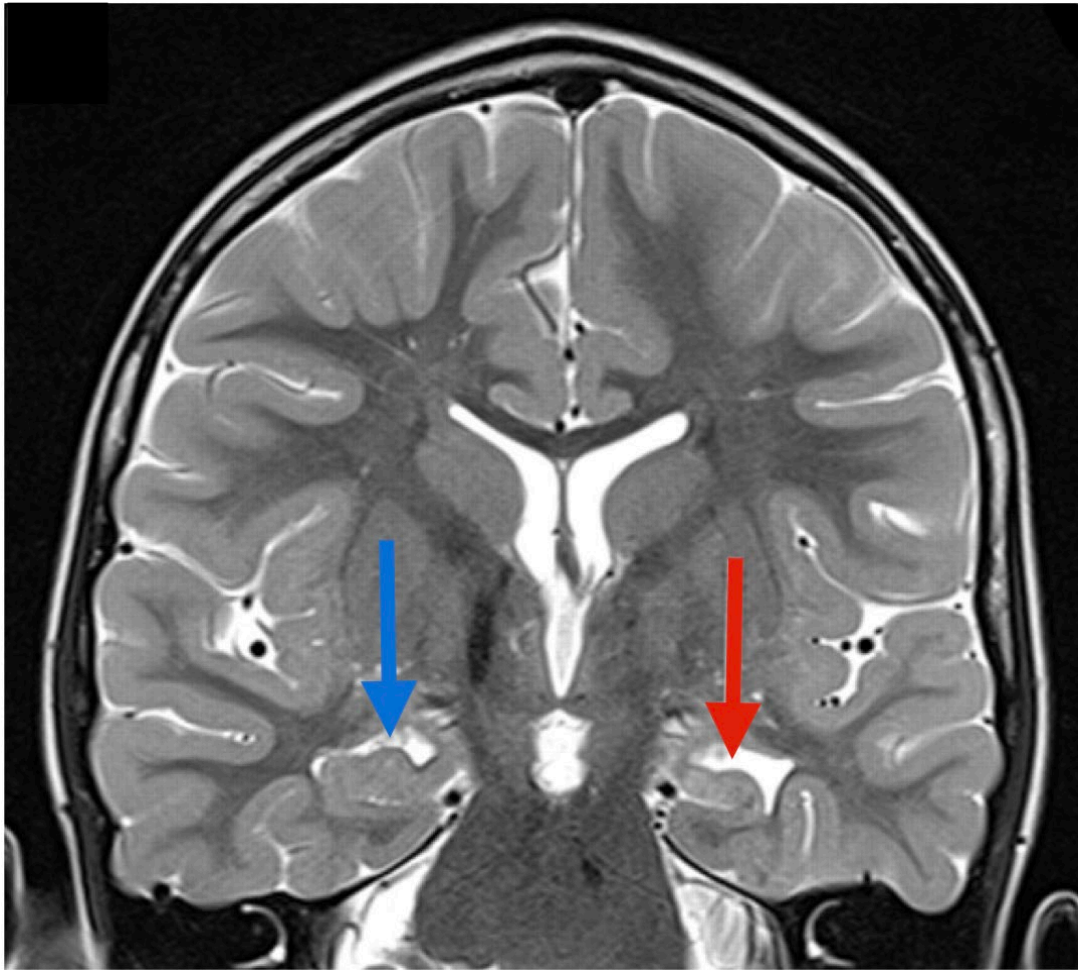


Figure 2-5. Adapté de [21] : IRM coronale pondérée en T2, d'un patient de 38 mois ayant eu une crise spontanée à 2 mois. L'image montre la sclérose de l'hippocampe gauche (flèche rouge).

Les analyses histologiques ont montré que cette dégénérescence des neurones est située au niveau du hile du gyrus denté (appelé aussi hilus), ainsi que des cellules pyramidales présentes dans les régions CA1 et CA3 de la corne d'Ammon [22], [23], [24]. Une perte des interneurons GABAergiques de ces régions est également observée [25]. Dans plus de la moitié des cas, la sclérose de l'hippocampe est associée à une dispersion des cellules granulaires du gyrus denté [26]. Cette dispersion est associée à une augmentation de la taille de ces cellules granulaires (hypertrophie) et de l'espace qui les sépare. Cette migration de cellules adultes est également associée à une gliose importante avec une altération du réseau glial, les astrocytes présentant une structure semblable à celle de la glie radiaire observée lors de la migration neuronale pendant le développement du cortex [27], [28]. Cette dispersion des cellules granulaires serait associée à un événement déclencheur survenu dans la petite enfance, le plus souvent une crise fébrile avant l'âge de 4 ans [29]. Cependant, l'atrophie ne serait pas liée au nombre de crises, ni à leur fréquence ou à la durée de l'évolution de l'épilepsie [13], [30]. Cette dispersion s'accompagne d'un phénomène de bourgeonnement des dendrites des cellules granulaires (fibres moussues) qui augmentent leurs connexions synaptiques au niveau de CA3, mais aussi au niveau du gyrus denté, formant ainsi des boucles récurrentes.

On voit donc que la « sclérose hippocampique » correspond à un remaniement important de l'hippocampe, avec une neuroplasticité qui s'accompagne également de modifications structurelles et fonctionnelles de la vascularisation, d'une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et une angiogenèse entraînant l'apparition de vaisseaux sanguins fins et radiaires dans le gyrus denté dispersé [31]. Cette augmentation de la vascularisation est corrélée à la fréquence des crises, mais n'est pas liée à l'histoire clinique des patients ni à l'étendue de la perte neuronale.

En résumé, la résection de la ZE est la solution pour les patients épileptiques pharmaco-résistants qui y sont éligibles, mais l'efficacité de cette intervention chirurgicale dépend de la délimitation précise de la ZE, qui reste imprécise aujourd'hui. Par conséquent, le développement de nouvelles méthodes de localisation de cette zone est essentiel. La MTLE, étant une forme prototypique d'épilepsie focale pharmacorésistante pour laquelle la chirurgie de résection présente une solution thérapeutique, semble être la cible la plus pertinente pour évaluer ces nouvelles méthodes.

Un aspect crucial pour l'application clinique est que des modèles prédictifs pour la MTLE sont disponibles chez les rongeurs dont certains ont été bien caractérisés [32]. Parmi eux, le modèle de souris KA-MTLE, obtenu par une injection intra hippocampique unilatérale de kaïnate reproduit les changements histologiques observés dans l'hippocampe ipsilatéral, mais aussi la période de latence et la survenue de crises focales avec une certaine résistance aux médicaments antiépileptiques. Ainsi, ce modèle réunit beaucoup de caractéristiques du syndrome MTLE et est recommandé par la plateforme de dépistage de l'épilepsie du NINDS (<https://panache.ninds.nih.gov/Home/CurrentModels>). La section suivante détaille les caractéristiques de ce modèle que nous avons utilisé dans notre étude.

2.1.3 Le modèle de souris KA-MTLE

L'acide kaïnique, ou kaïnate, est un analogue cyclique du L-glutamate et un puissant agoniste sélectif de certains récepteurs glutamatergiques [33]. Les premières études portant sur l'injection de kaïnate dans l'hippocampe chez le rat et la souris remontent à environ 40 ans [34], [35], [36]. Cependant, le kaïnate est devenu plus largement utilisé depuis que Suzuki et al. (1995) ont montré que son injection dans l'hippocampe dorsal induisait une perte cellulaire limitée à CA1 et CA3, et une dispersion du gyrus denté, puis que Bouilleret et al. (1999) [37] et surtout Riban et al (2002) [38] ont montré que cette injection provoquait des crises récurrentes et spontanées similaires à celles observées chez l'homme [37], [38], [39], [40], [41] (Figure 2-6).

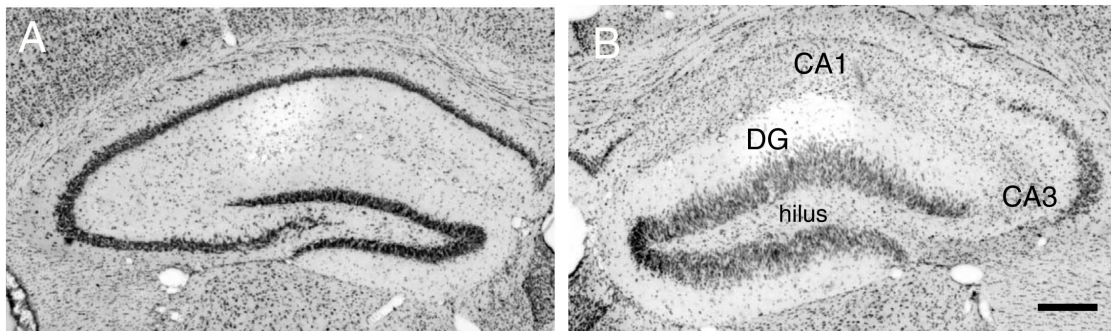


Figure 2-6. Coupes transversales des hippocampes dorsaux colorées au violet de crésyl 3 semaines après injection de kaïnate : (A) Hippocampe controlatéral, non injecté, montrant l'histologie normale de l'hippocampe. (B) Côté ipsilatéral injecté, montrant la perte neuronale et la dispersion des cellules dans le hile du gyrus denté (DG), ainsi que dans CA1 et dans certaines parties de CA3. Barre d'échelle = 200 µm. [38]

Quelques minutes après l'injection de kaïnate, les souris présentent un état de mal nommé « status epilepticus », caractérisé par une immobilité, une déviation clonique de la tête du côté controlatéral au site d'injection, des épisodes de mâchonnement et de rares crises généralisées. C'est la phase aigüe qui peut persister jusqu'à 24 heures après l'injection [5]. Ensuite, après une période appelée silencieuse d'environ 4 semaines, où se met en place l'épileptogénèse, des crises spontanées et récurrentes apparaissent (Figure 2-7) et persistent, c'est la phase d'épilepsie chronique.

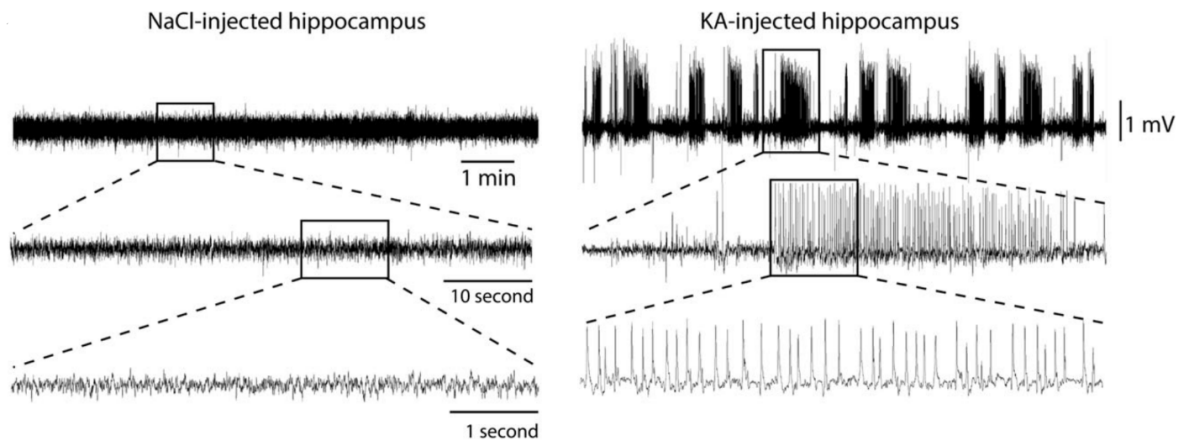


Figure 2-7. Enregistrements électroencéphalographiques d'hippocampes de souris C57Bl6/j, 28 jours après une injection soit de NaCl (à gauche) soit de kainate (KA, à droite). [42]

Le modèle de souris KA-MTLE présente donc de nombreuses similitudes avec le syndrome MTLE humain. Il possède une temporalité similaire, avec une période d'épileptogénèse caractéristique, suivie de crises d'épilepsie focales et récurrentes ainsi que d'une sclérose de l'hippocampe unilatérale observable en IRM. De plus, le syndrome MTLE étant considéré comme le prototype pour la chirurgie de résection, il est particulièrement intéressant de développer une nouvelle méthode de localisation de la ZE en utilisant le modèle souris KA-MTLE. Cette méthode pourrait ensuite être transférée chez les patients, permettant ainsi d'améliorer les résultats post chirurgie, ou appliquée à d'autres types d'épilepsies focales plus complexes, comme les dysplasies par exemple où il est encore plus difficile de localiser la ZE.

2.2 Résonance Magnétique Nucléaire

2.2.1 Principes de base

Une expérience pionnière réalisée par Isidor Isaac Rabi en 1938 a mené à la découverte de la résonance magnétique nucléaire (RMN) dans les années 1940. Ce phénomène est maintenant utilisé pour réaliser de l'imagerie (Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)) et de la Spectroscopie RMN (SRM), fournissant de manière non invasive des informations sur la structure et la dynamique, allant des molécules simples aux tissus.

2.2.1.1 Aimantation

Un noyau est caractérisé par son rapport gyromagnétique γ , c'est-à-dire le rapport entre son moment magnétique et son moment angulaire (spin). Ainsi, pour un système constitué de N noyaux d'un même isotope, l'aimantation macroscopique M est définie comme le moment magnétique nucléaire total des N noyaux divisé par le volume du système. Sans champ magnétique externe, cette aimantation est nulle. Lorsqu'ils sont exposés à un champ magnétique externe statique B_0 , certains noyaux se comportent comme des aimants et s'orientent dans le champ, et l'aimantation macroscopique, résultant de l'aimantation collective de ces noyaux dans le champ magnétique, devient non nulle. C'est l'effet Zeeman nucléaire. L'aimantation adopte alors un mouvement de précession autour de l'axe principal du champ magnétique B_0 , caractérisé par une fréquence de précession appelée fréquence de Larmor, notée $\omega_0 = \gamma B_0$. On est à l'état d'équilibre.

Le principe de la RMN consiste à perturber cet équilibre en appliquant une impulsion radiofréquence (RF), appelée impulsion excitatrice, perpendiculaire à B_0 , de champ magnétique B_1 et de fréquence angulaire ω_e (Figure 2-8). Ce champ magnétique transversal est beaucoup plus faible que B_0 , il n'a donc aucun effet sauf si sa fréquence angulaire ω_e correspond à la fréquence de précession des spins nucléaires, c'est le phénomène de résonance.

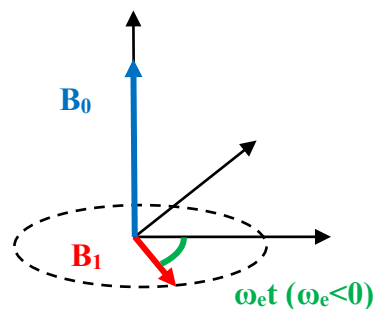


Figure 2-8. Champ statique B_0 et champ transversal B_1 avec sa fréquence angulaire ω_e

Après la fin de l'excitation, le système revient à sa position d'équilibre avec des temps caractéristiques, de l'ordre de quelques millisecondes à quelques secondes, que l'on appelle temps de relaxation. Ce retour à l'équilibre produit un courant dans une bobine, que l'on va mesurer : cela constitue le signal RMN, aussi appelé décroissance de l'induction libre (FID, pour Free Induction Decay en anglais) (2.2.1.3).

La fréquence de Larmor étant dépendante du champ statique B_0 et du rapport gyromagnétique, chaque noyau a donc une fréquence angulaire de résonance, pour un champ B_0 donné, et une sensibilité qui lui sont propres. Pour la plupart des éléments chimiques, il existe au moins un isotope ayant un moment magnétique non nul. Les noyaux les plus étudiés en RMN sont, par ordre de sensibilité décroissante, ^1H , ^{31}P , ^{13}C , le proton étant le plus abondant et le plus sensible de tous.

2.2.1.2 Équations de Bloch

Les équations de Bloch sont des équations différentielles qui décrivent l'évolution vectorielle de l'aimantation dans un échantillon soumis à un champ magnétique externe et à des impulsions radiofréquences. Elles ont été formulées par Felix Bloch en 1946 et sont fondamentales pour comprendre le comportement des noyaux atomiques dans un spectromètre RMN. Il est important de souligner qu'Edward Mills Purcell a également observé et décrit indépendamment ce phénomène de résonance et de relaxation. Leurs contributions respectives leur ont valu le prix Nobel de physique en 1952.

Les équations de Bloch décrivent le changement de l'aimantation dans les trois directions de l'espace : x, y et z. Elles sont généralement exprimées sous la forme suivante, ce qui correspond au mouvement de l'aimantation suite à une impulsion à 90° :

$$\begin{aligned}\frac{dM_x}{dt} &= \gamma(M_y B_z - M_z B_y) - \frac{M_x}{T_2} \\ \frac{dM_y}{dt} &= \gamma(M_z B_x - M_x B_z) - \frac{M_y}{T_2} \\ \frac{dM_z}{dt} &= \gamma(M_x B_y - M_y B_x) - \frac{M_z - M_0}{T_1}\end{aligned}$$

où M_x , M_y et M_z représentent les composantes de l'aimantation dans les directions x, y et z respectivement, B_x , B_y et B_z sont les composantes du champ magnétique appliqué, γ est le rapport gyromagnétique du noyau, et M_0 est l'aimantation à l'équilibre. Quant aux paramètres T_1 et T_2 , ce sont respectivement le temps de relaxation longitudinal ou spin-réseau, et le temps de relaxation transversal ou spin-spin, et ils reflètent les interactions entre les spins des noyaux atomiques et leur environnement.

La première partie de chaque équation exprime l'effet de la précession des spins autour du champ magnétique. La seconde partie exprime la relaxation. T_1 et T_2 sont les constantes de temps qui caractérisent le retour à l'équilibre thermodynamique des spins, soit pour s'aligner selon l'axe z le long de B_0 .

Les équations de Bloch mettent en évidence l'interaction complexe entre les spins des noyaux atomiques, les champs magnétiques appliqués et les temps de relaxation. Elles permettent de prédire l'évolution temporelle de l'aimantation dans un système RMN et sont utilisées pour optimiser les paramètres d'acquisition du signal RMN.

Elles s'appliquent à l'aimantation macroscopique et permettent de décrire les principaux phénomènes de la RMN et de comprendre les principales séquences d'impulsions utilisées en RMN. Cependant, il convient de rappeler que la description rigoureuse de la RMN, au niveau microscopique, relève du formalisme de la mécanique quantique, avec notamment la notion de niveaux d'énergie. Ce formalisme est lourd et nécessite l'utilisation d'outils mathématiques complexes tels les opérateurs Hamiltoniens, c'est pourquoi les équations de Bloch sont souvent utilisées lorsque c'est possible.

2.2.1.3 Signal RMN

Le signal RMN, soit la FID (Figure 2-9) contient des informations sur les propriétés des noyaux atomiques et leur environnement chimique, et est détecté par une bobine (la même que pour l'émission du champ B_1 , ou une autre bobine en IRM par exemple).

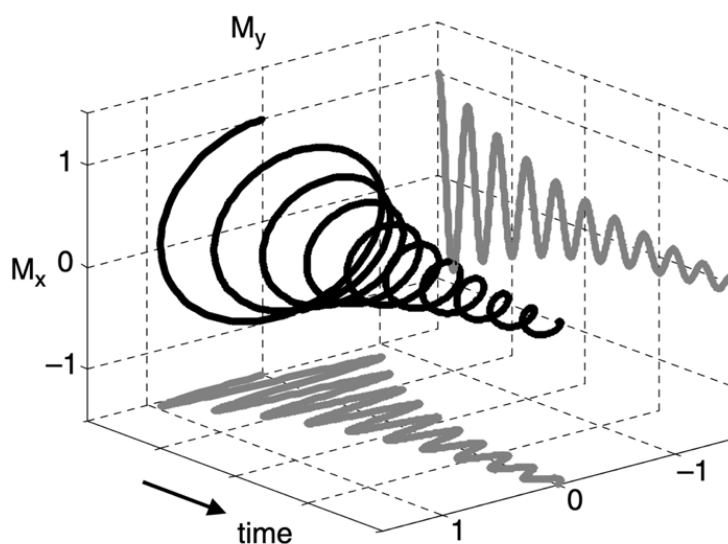


Figure 2-9. FID de l'aimantation nucléaire à la suite d'une impulsion d'excitation. L'aimantation transversale a un mouvement de précession à la fréquence de Larmor et décroît avec une constante de temps caractéristique T_2^* au fur et à mesure que le temps s'écoule. La FID tridimensionnelle complexe peut être complètement décrite par deux projections sur les plans (M_x, t) et (M_y, t) , correspondant respectivement aux composantes réelle et imaginaire de la FID. [43]

2.2.2 Imagerie par résonance magnétique

2.2.2.1 Principe

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet l'étude non invasive des tissus mous chez l'humain, et elle s'est imposée comme la modalité de choix pour évaluer l'intégrité du système nerveux central dans un large éventail de pathologies. Malgré son prix élevé, l'IRM présente plusieurs avantages par rapport à d'autres techniques d'imagerie telles que la tomodensitométrie : nature non invasive et non irradiante, possibilités d'imagerie multiplanaire, bon contraste des tissus mous.

Plusieurs techniques d'imagerie basées sur la RMN ont été développées à ce jour, notamment l'IRM anatomique, fonctionnelle, de diffusion, de perfusion, etc. Ces techniques sont basées sur des séquences d'impulsions RF, divisées en deux grandes familles : les séquences d'écho de spin et les séquences d'écho de gradient. Elles sont composées d'impulsions RF, permettant de basculer l'aimantation, et de gradients de champs, permettant d'encoder spatialement le signal (Figure 2-10). Deux paramètres sont essentiels dans une séquence :

- Le temps d'écho (TE) : délai entre l'impulsion d'excitation et le centre de l'écho créé ;
- Le temps de répétition (TR) : délai entre deux impulsions d'excitation.

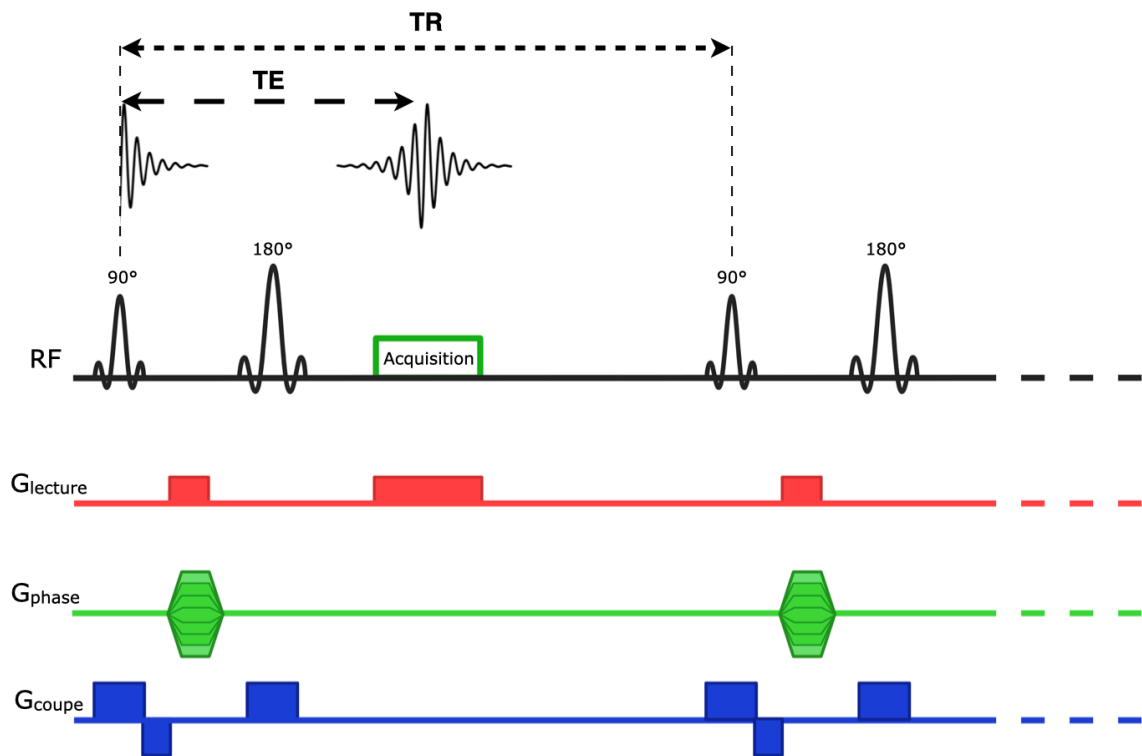


Figure 2-10. Chronogramme simplifié d'une séquence Spin Echo (impulsions RF, acquisition du signal, gradients de coupe, phase et lecture). L'écho est représenté, ainsi que le temps d'écho et le temps de répétition.

La fréquence utilisée pour l'imagerie est principalement la fréquence de l'hydrogène (^1H ou proton) des protons de l'eau, car c'est le composé largement le plus abondant dans les tissus biologiques (par exemple 80% du cerveau). La densité des protons de l'eau, ainsi que les temps de relaxation T1 et T2 de l'eau varient d'un tissu à l'autre. Cela permet d'obtenir des contrastes.

La pertinence de l'IRM pour les applications cliniques dépend des caractéristiques d'imagerie suivantes :

- La résolution de l'image : la taille des voxels doit être au moins de l'ordre des structures anatomiques observées.
- La qualité des données acquises : le bruit et les artefacts doivent être suffisamment faibles pour ne pas affecter l'estimation des paramètres effectuée sur les signaux, c'est-à-dire inférieurs aux variations dues aux changements physiologiques.
- Le temps d'acquisition : l'acquisition doit être suffisamment courte pour être utilisée *in vivo*.

La plupart des paramètres peuvent être ajustés lors de l'acquisition : le champ de vue ou Field-of-View (FOV), l'épaisseur de coupe, la taille de la matrice d'acquisition, le nombre de moyennages, etc. Ces paramètres affectent plusieurs ou toutes ces caractéristiques. L'amélioration d'une propriété entraîne généralement la détérioration d'une autre et vice versa. Par exemple, si on augmente la taille de la matrice d'acquisition, cela permet d'augmenter la résolution de l'image. Cependant, cela induit une diminution de la taille des voxels et donc une diminution du signal acquis. Pour conserver un bon rapport signal/bruit (SNR) il faut alors par exemple augmenter le nombre de moyennages, ce qui augmente le temps d'acquisition. Ainsi, lors d'une acquisition IRM, il faut trouver le bon compromis entre ces paramètres.

Lors de l'acquisition des données, le signal est recueilli à partir de tous les voxels présents dans le volume. Pour obtenir une image fiable, il est donc nécessaire de connaître précisément la localisation spatiale de ce signal. Pour cela, on utilise des gradients de champ, générés par trois bobines électromagnétiques, appelées bobines de gradient, qui produisent un champ magnétique variant linéairement dans les trois directions de l'espace. Trois étapes sont nécessaires pour cette localisation :

- Sélection du plan de coupe : cette étape consiste à appliquer un gradient de sélection de coupe dans une direction perpendiculaire à celle de la coupe souhaitée. Ce gradient s'ajoute au champ magnétique B_0 , ce qui entraîne une modification de la fréquence de précession des spins en fonction de leur position le long de l'axe du gradient. Une impulsion RF est également appliquée simultanément. La position de la coupe est déterminée par la fréquence centrale de cette impulsion RF, tandis que l'épaisseur de la coupe dépend de la largeur de bande spectrale de l'impulsion et de l'amplitude du gradient de sélection de coupe.
- Encodage de phase : un gradient est appliqué de manière perpendiculaire au gradient de sélection de coupe. Ce gradient altère la fréquence de précession des spins dans la direction perpendiculaire du gradient, entraînant des déphasages. Ces déphasages persistent même après l'arrêt du gradient et jusqu'à l'acquisition du signal. Par conséquent, les protons alignés sur une même ligne perpendiculaire à la direction du gradient précessent à la même fréquence, mais avec des phases différentes.
- Encodage fréquentiel : La dernière étape implique l'application d'un gradient dans la dernière direction, en même temps que l'enregistrement du signal, afin de localiser l'aimantation le long de cette direction. Ce gradient altère les fréquences de précession selon cette direction pendant toute sa durée d'application, créant ainsi des "colonnes" de protons qui précessent à la même vitesse. Ce gradient est également connu sous le nom de gradient de lecture.

Après avoir codé spatialement les voxels, le signal est enregistré dans une matrice appelée espace de k ou plan de Fourier. Le gradient de codage de phase permet de sélectionner la ligne correspondante dans l'espace de k , tandis que le gradient de codage par la fréquence permet de sélectionner la colonne appropriée. Ensuite, la transformée de Fourier (FT pour Fourier Transform en anglais) est appliquée pour reconstruire l'image 2D. Ainsi, l'espace des k contient les données brutes avant la reconstruction de l'image.

Les méthodes les plus couramment utilisées pour remplir l'espace des k sont les trajectoires cartésiennes (ligne par ligne), radiales et en spirale. L'avantage principal de l'échantillonnage radial est sa sensibilité réduite aux artefacts de mouvement et permet de réduire le temps d'acquisition [44]. En revanche, l'échantillonnage cartésien est avantageux car les données sont régulièrement espacées donc les images peuvent être reconstruites facilement.

2.2.2.2 IRM dans l'étude de l'épilepsie

a. IRM anatomique

L'IRM anatomique permet d'obtenir des images hautement résolues du cerveau, avec de nombreux contrastes. En effet, en faisant varier différents paramètres, comme le temps d'écho (TE) et le temps de répétition (TR), il est possible d'obtenir différentes pondérations des signaux, révélant ainsi les différences de contraste entre les tissus. Les séquences pondérées en T1 et T2 désignent différentes mesures des relaxations des protons après l'application d'impulsions de radiofréquence. La séquence pondérée T1 donne lieu à une différence de contraste élevée entre la matière blanche et la matière grise. La séquence pondérée T2 est plus sensible à la teneur en eau des tissus et génère donc une excellente différence de contraste entre le liquide cérébro-spinal et la matière blanche. La relaxation T2*, dérivée de la décroissance T2, considérée comme une décroissance T2 "observée" ou "effective", cumule l'effet de la relaxation T2 avec la relaxation due aux inhomogénéités du champ magnétique et la diffusion. L'imagerie pondérée T2* génère une différence de contraste élevée entre le liquide cérébro-spinal, la matière blanche et la matière grise.

Ainsi, comme expliqué plus tôt (section 2.1.2), une IRM anatomique haute résolution (0,45 mm³ par exemple [45]) pondérée en T2 est acquise lors du bilan pré-chirurgical des patients MTLE. Elle permet de visualiser la sclérose hippocampique. De plus, des études ont montré que l'imagerie IRM haute résolution peut également révéler les lésions hippocampiques induites par le kainate au fil du temps, chez le rat et la souris [39], [46] (Figure 2-11).

L'IRM anatomique, utilisée en routine clinique, permet donc de détecter, à travers l'intensité du signal de l'eau, les anomalies structurales dans le cerveau des patients. Cependant, l'intensité de ce signal est influencée par de multiples facteurs (physiques, biologiques et instrumentaux), et peut varier pour un même individu et au même point d'un organe entre deux acquisitions. En pratique, ces biais peuvent être négligés pour les images anatomiques puisque ce sont des images non quantitatives : même si les signaux varient, les contrastes, c'est-à-dire les différences relatives de signal entre deux tissus de nature différentes, permettent quand même une interprétation des images. Une approche, pour distinguer les variations d'origine biologique et réduire les variations physiques et instrumentales, consiste en l'acquisition d'images quantitatives, ce qui permet par la suite de faire de l'IRM multiparamétrique.

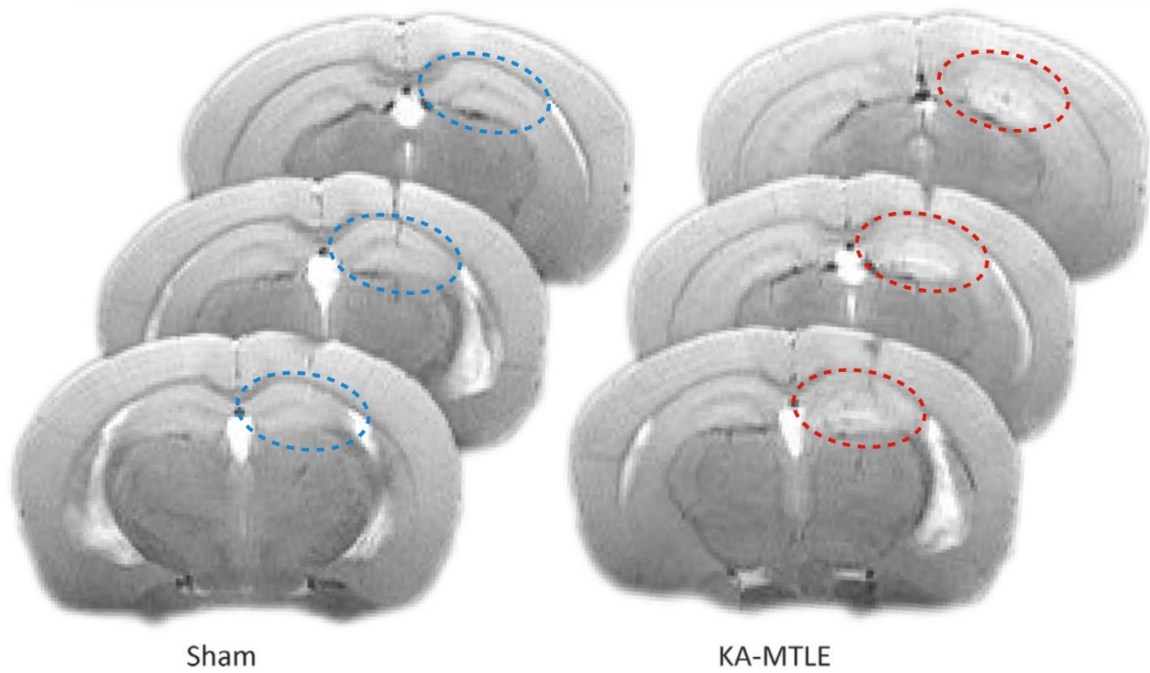


Figure 2-11. Images IRM anatomiques (3 coupes coronales adjacentes) d'une souris SHAM et d'une souris KA-MTLE. On peut visualiser la sclérose de l'hippocampe dorsal droit de la souris KA-MTLE (entouré en rouge). [5]

b. IRM multiparamétrique

L'IRM multiparamétrique est une technique avancée qui combine différentes méthodes quantitatives pour obtenir des cartes paramétriques. Dans une carte paramétrique, pour chaque voxel une valeur quantitative est calculée avec une unité de mesure associée. Cette valeur représente une propriété physique ou chimique spécifique [47]. Contrairement aux images pondérées qui sont influencées par plusieurs paramètres physiques et instrumentaux dont le signal est exprimé en unités arbitraires rendant impossible la comparaison numérique entre les individus, les cartes quantitatives offrent donc des données plus robustes, facilitant la comparaison inter-individus [48].

Plusieurs méthodes quantitatives sont disponibles. Tout d'abord, en faisant l'acquisition d'images anatomiques non quantitatives pour plusieurs valeurs d'un paramètre d'acquisition, il est possible d'en extraire des cartes paramétriques. Dans le cas des images anatomiques obtenues par écho de spin, une carte paramétrique T2 peut être calculée en effectuant plusieurs acquisitions avec un temps d'écho variable, permettant ainsi de calculer des temps de relaxation pour chaque voxel. D'une manière similaire, il est possible de générer une carte paramétrique T1. Par ailleurs, d'autres méthodes quantitatives ont été développées pour mesurer d'autres phénomènes, tel que la diffusion de l'eau (ADC pour Apparent Diffusion Coefficient ; mesure de la vitesse de déplacement de l'eau en $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$), la fraction du volume sanguin (BVf pour Blood Volume fraction en anglais ; pourcentage de sang par voxel) ou la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (BBBp pour Blood-Brain Barrier permeability ; mesuré en pourcentage de rehaussement de signal après l'injection d'un agent de contraste).

Dans l'étude de l'épilepsie, de nouvelles approches en IRM se sont développées en se basant sur l'analyse des dynamiques cellulaires et vasculaires observées dans la ZE, comme des modifications de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique [49], [50], l'angiogenèse [31] ou encore l'inflammation des cellules gliales [51]. Les changements cellulaires peuvent se traduire par des modifications de T1, T2 ou de diffusion [52], [53], [54], tandis que les lésions cérébro-vasculaires peuvent être imagées après injection d'agents de contraste à base de complexes de gadolinium [49], [55]. Un travail mené dans l'équipe (Boux et al. [56]) sur le modèle souris KA-MTLE a montré un potentiel de l'IRM multiparamétrique pour l'identification de la ZE (Figure 2-12). Cependant, chez ce modèle, cette méthode à haute résolution (de l'ordre du μm) présente une faible sensibilité, de l'ordre de 10-20%, comparée à la spectroscopie RMN simple-voxel du GABA, méthode à faible résolution (de l'ordre du mm) mais très sensible avec une variation d'environ 100% entre les SHAM et KA-MTLE [5]. La combinaison des deux méthodes fait l'objet d'un nouveau projet de recherche mené dans l'équipe (ANR EPI-CATCHER).

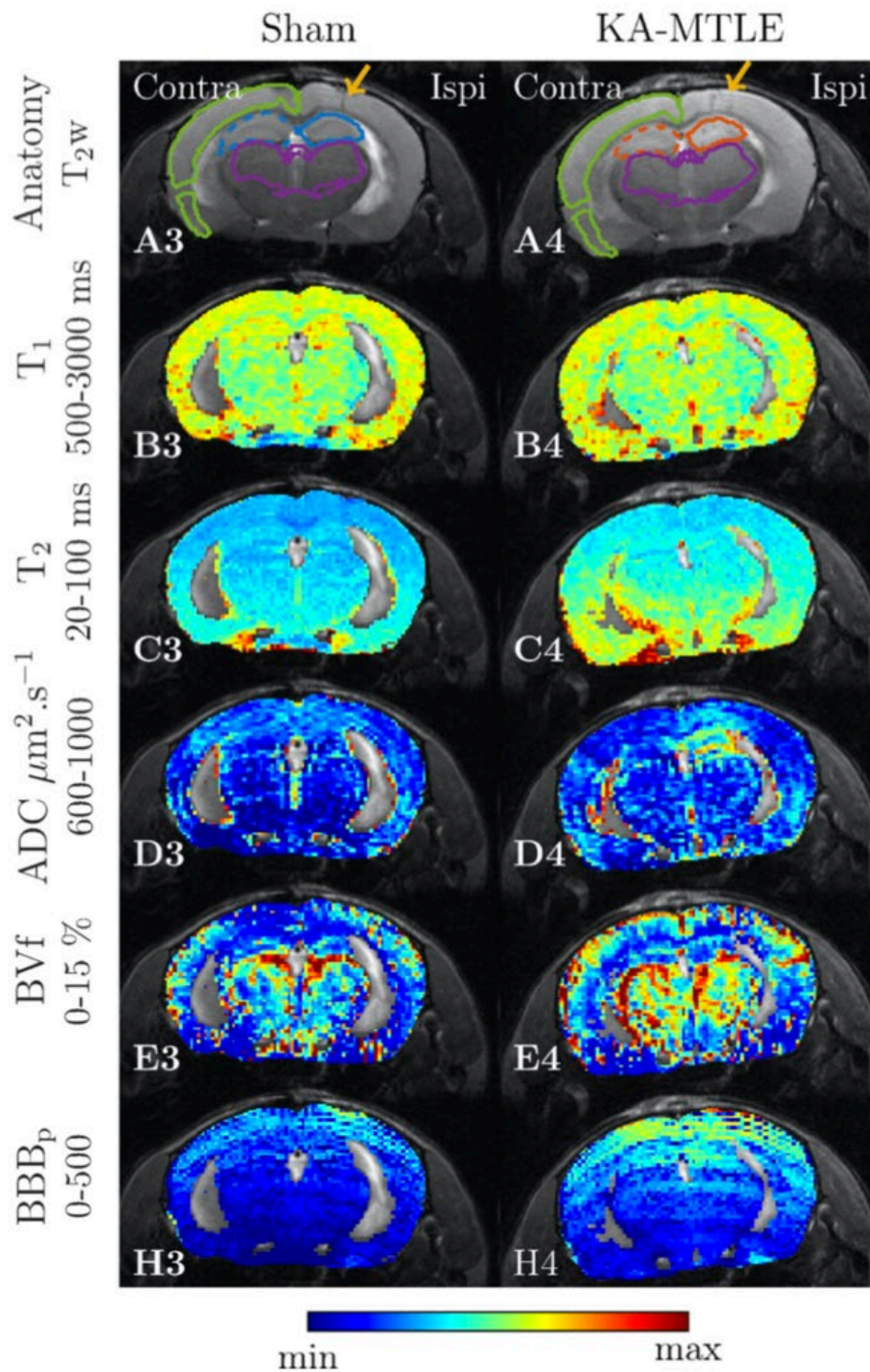


Figure 2-12. Adapté de Boux et al. [56]. Exemples d'acquisitions IRM : Images anatomiques (pondérée en T2) avec superposition des ROI (A3-A4) et les 5 cartes paramétriques pour une souris SHAM et une KA-MTLE, 4 à 6 semaines après l'injection. Sur les images pondérées en T2, le néocortex est délimité en vert. Les hippocampes sont délimités en bleu pour les souris SHAM et en orange pour les souris épileptiques (lignes pointillées pour l'hippocampe controlatéral et lignes pleines pour l'hippocampe ipsilatéral). Le thalamus, utilisé pour la normalisation des données, est délimité en magenta. Les flèches jaunes indiquent les lésions causées par l'injection intra hippocampique de KA. Les valeurs minimales (min) et maximales (max) sont indiquées à gauche de chaque ligne, à l'exception de la première ligne, qui ne présente pas d'image quantitative.

2.2.3 Spectroscopie RMN

2.2.3.1 Théorie

En spectroscopie RMN, la FID est transformée en signal fréquentiel par l'application de la transformée de Fourier. Un spectre est ainsi obtenu, avec des pics caractérisés par leur intensité (sur l'axe des y) et leur fréquence (sur l'axe des x) (Figure 2-13). Si seul l'effet Zeeman était présent, une seule fréquence de résonance serait détectée pour un noyau donné dans un champ donné, soit à $\omega_0 = \gamma B_0$, ce qui serait très peu informatif. Or, d'autres interactions conduisent à un enrichissement des spectres RMN, rendant ainsi possible l'identification précise des structures chimiques des molécules (primaire et secondaire), mais aussi leur arrangement spatial (structure ternaire). Ces interactions sont principalement le déplacement chimique et les couplages de spin. La majorité des études de spectroscopie RMN *in vivo* utilisent la RMN ^1H , bien que la RMN du ^{31}P et du ^{13}C soient aussi utilisées mais plus minoritairement, et nous allons uniquement parler de ce noyau pour la suite.

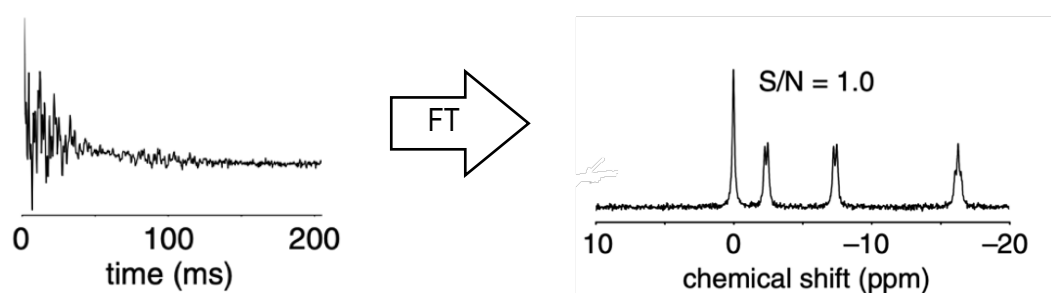


Figure 2-13. Exemple d'une FID (gauche) puis du signal obtenu après application de la Transformée de Fourier (droite) [43]

Le déplacement chimique résulte de l'influence des champs magnétiques locaux induits par le mouvement des électrons dans les orbitales moléculaires. Ces champs locaux s'ajoutent au champ statique externe B_0 et varient en fonction de la distribution des électrons, du remplissage des orbitales moléculaires et des atomes voisins. Par conséquent, pour un noyau donné, le champ magnétique total B_0 "ressenti" par les noyaux sera différent selon leurs positions dans la molécule, ce qui se traduit par l'apparition de fréquences de résonance différentes. Cette interaction est très importante pour déterminer la structure unidimensionnelle des molécules étudiées. Cependant, les fréquences de résonance étant proportionnelles au champ statique B_0 , il est impossible de comparer les spectres acquis à différents champs statiques. Afin de résoudre ce problème, le déplacement chimique, nommé δ , est utilisé : les fréquences de résonance sont rapportées à la fréquence d'un composé de référence fixé par convention à zéro ppm (généralement le TMS ou le TSP), et divisé par la fréquence de résonance du noyau étudié, donnant ainsi des valeurs en parties par million (ppm), sans unité et indépendantes du champ. La gamme des déplacements chimiques est d'environ 12 ppm pour le ^1H et de 220 ppm pour le ^{13}C .

Le couplage spin-spin, également appelé couplage scalaire, couplage indirect ou couplage J , est une constante exprimée en Hz, indépendante de B_0 . C'est une interaction qui passe par les électrons de la liaison chimique entre les atomes d'une même molécule. Il ajoute à l'effet Zeeman des interactions magnétiques et disperse ainsi les niveaux d'énergie des noyaux en interaction. En effet, ce couplage se manifeste par la division de chaque pic en plusieurs pics (doublet, triplet ou multiplet) sur le spectre RMN, selon le nombre de voisins. L'effet est additif pour un groupement ayant plusieurs voisins, et se modélise facilement en utilisant un arbre descendant tel que représenté Figure 2-14 pour des couplages entre des protons ou de noyaux de spins $1/2$. Dans ce dernier cas, l'intensité des pics des multiplets suit le triangle de Pascal, comme on le voit, avec un doublet d'intensité 1 : 1, un triplet d'intensité 1 : 2 : 1, et un quadruplet d'intensité 1 : 3 : 3 : 1. Dans ce cas simple, l'écart entre 2 pics est la constante de couplage J . On parle ici d'une situation simple où les couplages sont faibles, c'est-à-dire que le couplage entre les 2 noyaux A et X, $J_{AX} \ll (\delta_X - \delta_A)$, donc les couplages et les déplacements chimiques δ sont directement mesurables sur les spectres sans ambiguïté. Notons qu'un couplage faible à un champ magnétique de 9,4 T peut devenir fort à un champ magnétique de 1,5 T. Le couplage J décroît fortement avec le nombre de liaison entre les noyaux couplés, mais il peut être observé à plusieurs liaisons dans certaines configurations moléculaires.

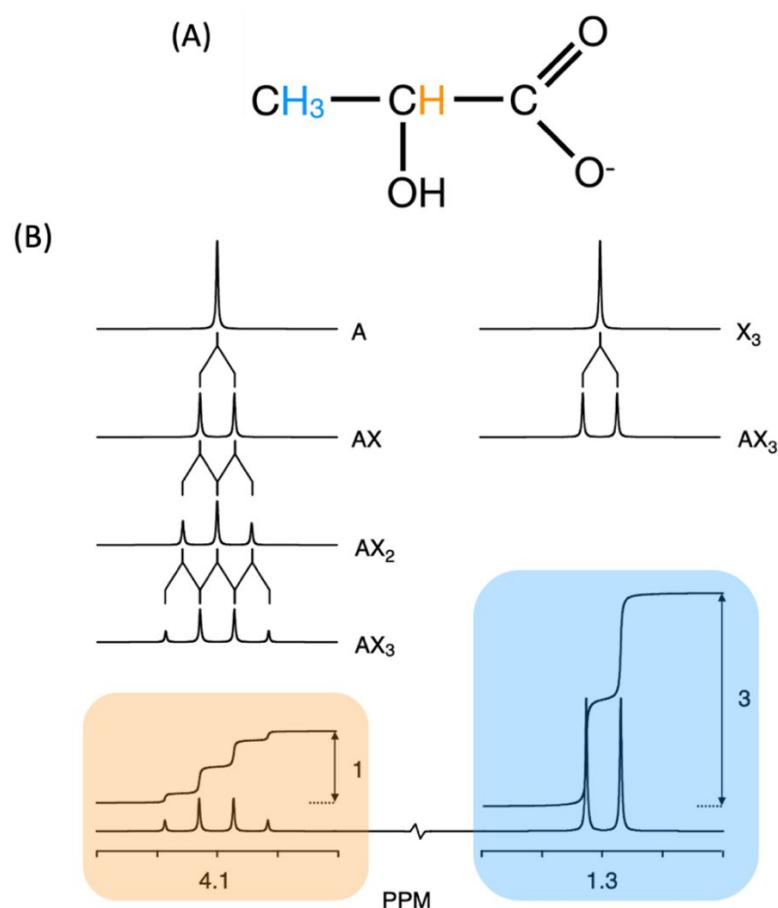


Figure 2-14. Exemple de la méthode de dédoublement successif pour un système de spin AX₃ avec l'exemple du lactate (A), avec un groupe méthyle (bleu) résonnant à 1,31 ppm et un proton méthine (orange) résonnant à 4,10 ppm. (B) : La résonance A se divise successivement en un doublet, un triplet et un quadruplet, tandis que la résonance X se divise en un doublet [43].

La RMN étant intrinsèquement quantitative, une troisième information peut être extraite du spectre : l'aire sous les pics, proportionnelle au nombre de noyaux qui constituent le pic. Ainsi, en combinant l'analyse du déplacement chimique, de la structure des pics, et de leur aire, il est possible d'attribuer le spectre à un composé sans ambiguïté.

La quantité d'information contenue dans le signal RMN dépend de plusieurs paramètres expérimentaux, tels que l'intensité du champ magnétique ou la puissance des impulsions radiofréquences. Ces paramètres peuvent être ajustés pour optimiser la sensibilité et la résolution du spectre RMN.

En plus de fournir des informations sur la structure moléculaire, le signal RMN peut également être utilisé pour mesurer des paramètres physiques tels que les temps de relaxation T1 et T2, offrant ainsi des informations sur la dynamique moléculaire et les interactions moléculaires. Beaucoup d'autres d'interactions peuvent être exploitées en spectroscopie RMN, comme les interactions dipolaires et les effets Overhauser, permettant d'accéder à la structure tridimensionnelle d'une macromolécule comme un oligonucléotide par exemple, ou les constantes d'échanges, etc.

En résumé, le signal RMN est la réponse obtenue lorsqu'un échantillon placé dans un champ magnétique statique est soumis à des impulsions radiofréquences. Ce signal contient des informations sur les propriétés des noyaux atomiques qui entrent en résonance avec cette fréquence excitatrice, leur environnement chimique et les interactions moléculaires.

2.2.3.2 Spécificités de la spectroscopie RMN *in vivo*

Pour réaliser les acquisitions de spectroscopie RMN *in vivo*, il est nécessaire de sélectionner spatialement la région d'intérêt dans laquelle les spectres seront acquis. Cela est réalisé en s'appuyant sur une image IRM acquise au préalable. Cette région est ensuite sélectionnée physiquement par une technique de localisation qui peut être simple-voxel (aussi appelée mono-voxel), ou multi-voxel, c'est-à-dire de l'imagerie spectroscopique. Le principe de ces techniques est expliqué plus en détail dans les sections 2.2.3.5 et 2.2.3.6 respectivement.

Ensuite, une étape essentielle en spectroscopie RMN *in vivo* du proton est la suppression du signal de l'eau, dont le module est placé avant le module de localisation de la séquence d'acquisition. En effet, comme il a été dit précédemment, les tissus biologiques sont composés majoritairement d'eau et donc le signal principal provient des deux protons de la molécule d'eau dont la concentration est plusieurs milliers de fois supérieure aux autres molécules. Cela limite leur dynamique de détection et peut induire des distorsions du signal qui masquent des pics (Figure 2-15). Il existe plusieurs techniques de suppression d'eau basées sur l'excitation et/ou la refocalisation sélective en fréquence, les différences en termes de relaxation, ou les méthodes d'édition spectrale comme le transfert de polarisation ou la MEGA (voir 2.2.3.4). Dans cette thèse, nous avons utilisé une de ces techniques nommée VAPOR (Variable Pulse powers and Optimized Relaxation delays) [57]. Elle combine une suppression de l'eau basée sur la relaxation T1 et des perturbations optimisées sélectives en fréquence, pour obtenir une suppression de l'eau performante et avec une grande insensibilité à l'inhomogénéité B_1 et la variabilité du T1. Elle consiste en sept impulsions RF sélectives en fréquence de puissance variable, pour inverser sélectivement les spins de l'eau, entrecoupées de délais optimisés. Cela permet de réduire l'aimantation induite par le signal des protons de l'eau à quasiment zéro.

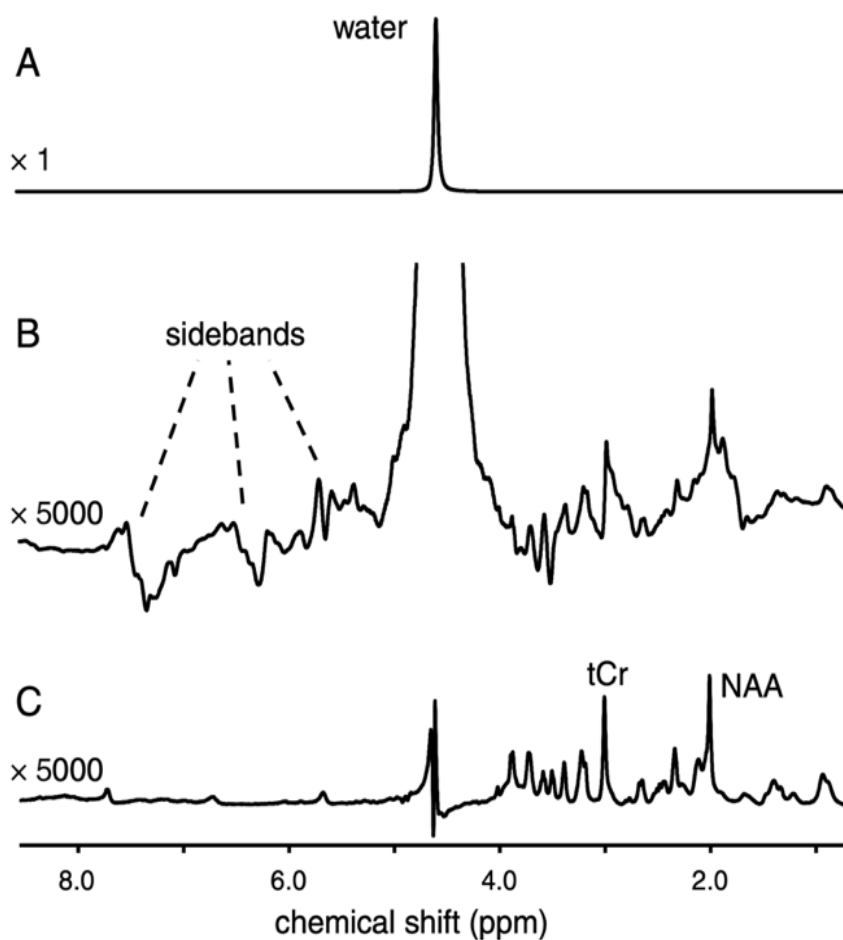


Figure 2-15. Démonstration de la nécessité de la suppression de l'eau in vivo : (A) Un spectre RMN ^1H acquis dans un cerveau de rat, est dominé par la résonance de l'eau. (B) Les petits signaux des métabolites sont détectés en présence d'un important signal d'eau, mais des bandes latérales à l'eau déforment la ligne de base ce qui rend la détection des métabolites non fiable. (C) L'élimination de la résonance de l'eau (et par conséquent de toute bande latérale associée) permet d'obtenir un spectre sans artefact qui permet une détection et une quantification fiables des métabolites [43].

Par ailleurs, les spins couplés évoluent en fonction du temps d'écho, indépendamment de B_0 et avec une période multiple de $1/J$. Contrairement au déplacement chimique, cette interaction est indépendante du champ magnétique externe. Ainsi, lorsque les impulsions RF refocalisent les spins dans le volume d'intérêt, cela n'a pas d'influence sur les couplages, qui continuent à évoluer en fonction du TE : c'est ce qu'on appelle la J-modulation. En spectroscopie RMN *ex vivo* ou *in vitro*, l'acquisition du signal peut se faire immédiatement après l'impulsion excitatrice (sans écho) il est donc possible de s'affranchir de ce phénomène, mais ce n'est pas le cas *in vivo*. La Figure 2-16 montre la J-modulation en fonction du TE pour un système à deux spins. *In vivo*, les TE courts sont privilégiés pour avoir une J-modulation faible, ou un TE particulier est utilisé pour observer (ou éditer) un métabolite particulier en fonction d'un couplage spécifique, par exemple le Lactate à TE=144 ms. Dans ce dernier cas, le pic du lactate à 1,32 ppm étant dans une zone spectrale relativement isolée, l'utilisation d'un TE spécifique suffit à l'éditer, c'est-à-dire le mettre en évidence. Cependant, ce cas est rare donc des méthodes plus complexes ont dû être développées. Cela sera expliqué plus en détail pour le GABA dans la section 2.2.3.4.

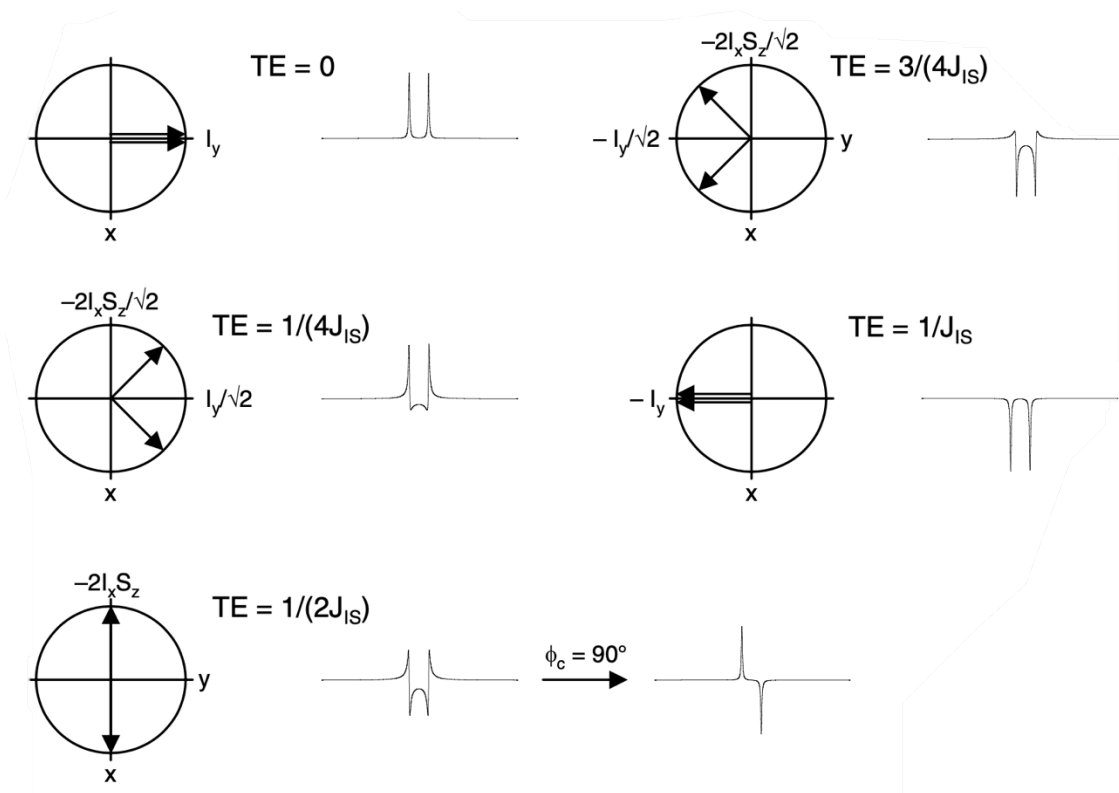


Figure 2-16. Adapté de [43] : Évolution des spins couplés scalairement lors d'une séquence d'écho de spin pour un système à deux spins nommé IS : cohérences transversales et spectres RMN correspondants pour le spin I d'un système à deux spins en fonction du temps d'écho TE.

2.2.3.3 Métabolisme dans l'épilepsie

La spectroscopie RMN est particulièrement bien adaptée à l'analyse des petites molécules, appelées métabolites de poids moléculaire inférieur à 1000 Da. En effet, il existe un lien entre le temps de corrélation de rotation $\omega\tau_c$ des molécules et leur temps de relaxation $T2^*$, pour un champ donné, qui est lui-même inversement proportionnel à la largeur des pics. On pourrait ainsi dire, de façon simplificatrice, que plus les molécules sont « grosses » et/ou immobilisées, plus elles donnent des pics larges inexploitablement en spectroscopie RMN 1H (comme les macromolécules de type protéines ou lipides). De plus, c'est une technique non destructive, donc elle se prête idéalement à l'étude, autant *ex vivo* qu'*in vivo*, du métabolisme de pathologies cérébrales dont l'épilepsie. Il est important de noter que la spectroscopie RMN *in vivo* permet de quantifier les molécules mobiles dans un volume donné, mais ne permet pas de différencier les molécules situées dans l'espace intra ou extracellulaire.

Les métabolites les plus étudiés dans le cerveau par spectroscopie RMN *in vivo* sont le N-acétyl aspartate (NAA, $\delta = 2,04$ ppm), la créatine et la phosphocréatine (CR, car la somme de ces 2 métabolites est souvent détectée en *in vivo*, $\delta = 3,02$ ppm) et les métabolites de la choline (CHO, $\delta = 3,22$ ppm), incluant la phosphocholine, la glycerophosphocholine et la choline libre, car leurs pics sont des singulets intenses qui les rendent plus faciles à détecter et à quantifier, même aux faibles champs magnétiques utilisés en clinique (par exemple, 1,5 ou 3 T). Dans la recherche sur l'épilepsie, il a été rapporté que le NAA, considéré comme un marqueur de la densité et de la viabilité neuronales, diminuait dans l'hippocampe sclérosé [58], [59]. En particulier, la diminution du NAA, rapportée dans les épilepsies du lobe temporal et néocorticales humaines, a été proposée comme biomarqueur de la ZE, mais seulement dans certains cas [60], [61]. Par ailleurs, la CR et la CHO ont été suspectées d'augmenter dans la ZE [58], [59], mais il a également été rapporté que ces deux métabolites n'étaient pas statistiquement modifiés dans la ZE par rapport à l'hippocampe controlatéral [60]. Cela montre qu'il n'y a pas de consensus clair sur la dérégulation de ces métabolites dans la ZE, en partie parce qu'il existe plusieurs types différents d'épilepsies, et que ces 3 métabolites ne sont pas spécifiques. Par exemple, le NAA diminue dans la plupart des pathologies neuronales. A cela s'ajoute la diversité des méthodes de traitement des signaux RMN, ainsi que de quantification, qui sont relatives ou absolues, par rapport à l'eau ou à la CR, ou qui produisent des ratios de métabolites, sans qu'un consensus n'existe.

En 1995, Petroff et al. [62] ont montré l'intérêt de la spectroscopie RMN *ex vivo* haute résolution pour décrire le métabolisme du cerveau de patients épileptiques. En effet, ils ont mesuré une diminution du NAA, et une augmentation du GABA et du glutamate (GLU) dans les pièces de résection, par rapport aux valeurs reportées chez des sujets sains (mesurés par spectroscopie RMN *in vivo* ou *ex vivo* lors d'autopsies).

Des études de patients MTLE ont également révélé des niveaux plus élevés de GABA, neurotransmetteur inhibiteur majeur, *in vivo* [63] mais également *ex vivo* [64]. Des travaux réalisés dans l'équipe ont montré *ex vivo* dans le modèle KA-MTLE, en utilisant la méthode de spectroscopie *ex vivo* HRMAS (High Resolution Magic Angle Spinning), une augmentation importante du GABA (100 %) et une diminution du NAA, du glutamate et de la glutamine, dans l'hippocampe sclérosé, c'est-à-dire la ZE [5] par rapport aux animaux SHAM. De plus, en utilisant des statistiques avancées pour classer les métabolites selon leur importance dans la discrimination de la ZE, le GABA s'est avéré être le métabolite le plus discriminant de la ZE comparé aux SHAM, mais également aux régions cérébrales adjacentes. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* grâce à une méthode de spectroscopie RMN *in vivo* simple-voxel. Cela a conduit à l'hypothèse du GABA biomarqueur spatial de la ZE, qui est la base de mon projet de thèse. Il n'est toutefois pas possible de différencier le GABA neurotransmetteur du GABA participant au métabolisme.

Le GABA est impliqué dans diverses fonctions biologiques et des altérations de la signalisation GABAergique peuvent contribuer à des pathologies telles que la maladie de Parkinson, l'épilepsie, ou des maladies psychiatriques [65], [66], [67]. La régulation de la signalisation GABAergique passe notamment par la modulation de la synthèse du GABA par la Glutamate Décarboxylase (GAD, EC 4.1.1.15). Il existe deux isoformes de la GAD, la 65 et 67, diffèrent par leur poids moléculaire, leur distribution subcellulaire [68], [69], et leur interaction avec les membranes cellulaires [70], [71], [72], [73]. La GAD65 est associée aux membranes et aux terminaisons nerveuses et semble préférentiellement impliquée dans la synthèse de GABA destiné à la libération vésiculaire [74], tandis que la GAD67 est plus uniformément distribuée dans les neurones et pourrait être impliquée dans la synthèse de GABA cytoplasmique [75]. La Figure 2-17 illustre la synthèse du GABA par les deux GAD dans les neurones. J'ai réalisé une étude préliminaire de ces deux enzymes (immunohistologie et western blot) pour évaluer leur potentielle implication dans l'augmentation du GABA mesurée par spectroscopie RMN chez ce modèle.

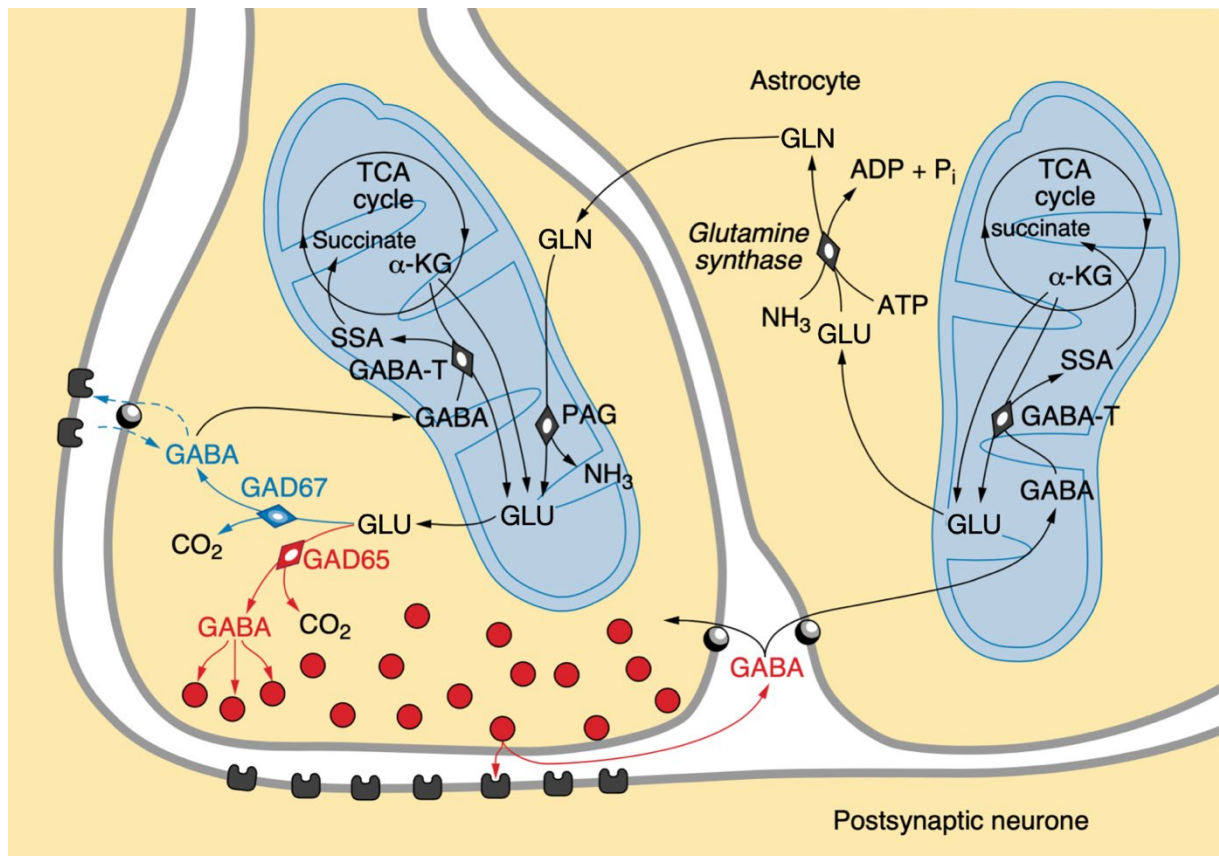


Figure 2-17. Adapté de [76] : Le GABA est synthétisé à partir du glutamate dans le cytosol neuronal par les deux glutamate décarboxylases (GAD). La GAD65 semble être concentrée dans les terminaisons nerveuses et associée à des vésicules ; elle pourrait synthétiser la majeure partie du GABA transmetteur dans des conditions normales. La GAD67 semble être distribuée plus uniformément dans les neurones et pourrait synthétiser la plus grande partie du GABA cytoplasmique. Le GABA cytoplasmique pourrait être libéré par l'inversion du transporteur GABA (lignes pointillées) et activer les récepteurs extrasynaptiques. Le précurseur glutamate (GLU) est synthétisé à partir de la glutamine (GLN) par la glutamine synthase activée par le phosphate (PAG) et à partir de l' α -cétoglutarate (α -KG) par plusieurs enzymes, dont la GABA transaminase (GABA-T). Le GABA est dégradé dans les mitochondries des neurones et des astrocytes par la GABA-T, qui produit du semialdéhyde succinique (SSA) ; le SSA est ensuite converti en succinate, un intermédiaire du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA). La glutamine est produite dans les astrocytes et exportée vers les neurones.

2.2.3.4 Principe de l'édition du GABA par la méthode MEGA

Un des problèmes de la spectroscopie RMN proton est sa faible fenêtre spectrale (autour de 12 ppm), réduite en pratique à 5 ppm *in vivo* à cause de la très faible concentration des composés de déplacement chimique supérieurs à 4,7 ppm (déplacement chimique des protons de l'eau). En conséquence, comme chaque métabolite a un spectre caractéristique, composé d'un ou plusieurs pics, le spectre RMN *in vivo* de cerveau par exemple est la somme de tous les spectres des métabolites présents et de concentration supérieure à la limite de détection. Un des composés d'intérêt pour l'étude des pathologies cérébrale est le GABA, le principal neuromédiateur inhibiteur connu. La concentration de GABA dans le cerveau est faible (environ 1mM), alors que des molécules comme le NAA ou le CR ont une concentration environ dix fois supérieure et chevauchent ou masquent en grande partie les pics du GABA (Figure 2-18), empêchant ainsi sa quantification robuste. Il faut préciser ici que, dans la littérature, lors de l'étape de quantification, il est courant que de nombreux métabolites qui se superposent sur les spectres soient inclus dans la méthode afin de permettre un meilleur ajustement entre le spectre expérimental et le spectre reconstruit. C'est le cas par exemple des différents métabolites de la choline, mais aussi du GABA. Dans le cas des métabolites de la choline, les valeurs individuelles obtenues après quantification sont peu robustes du fait de l'absence de pic isolé de chacun de ces métabolites, ce qui lèverait l'ambiguïté sur l'attribution des résonances (dépendant du champ magnétique utilisé), et seule la somme est pertinente (CHO).

Ainsi, dans le cas du GABA, pour résoudre ce problème, l'édition spectrale a été développée. Cela consiste à « mettre en évidence » un spectre individuel, ou un pic particulier, au sein d'un mélange complexe, par des méthodes d'acquisition et/ou de traitement des données. Elle permet d'obtenir des spectres simplifiés d'un ou de quelques métabolites sélectionnés [77], [78].

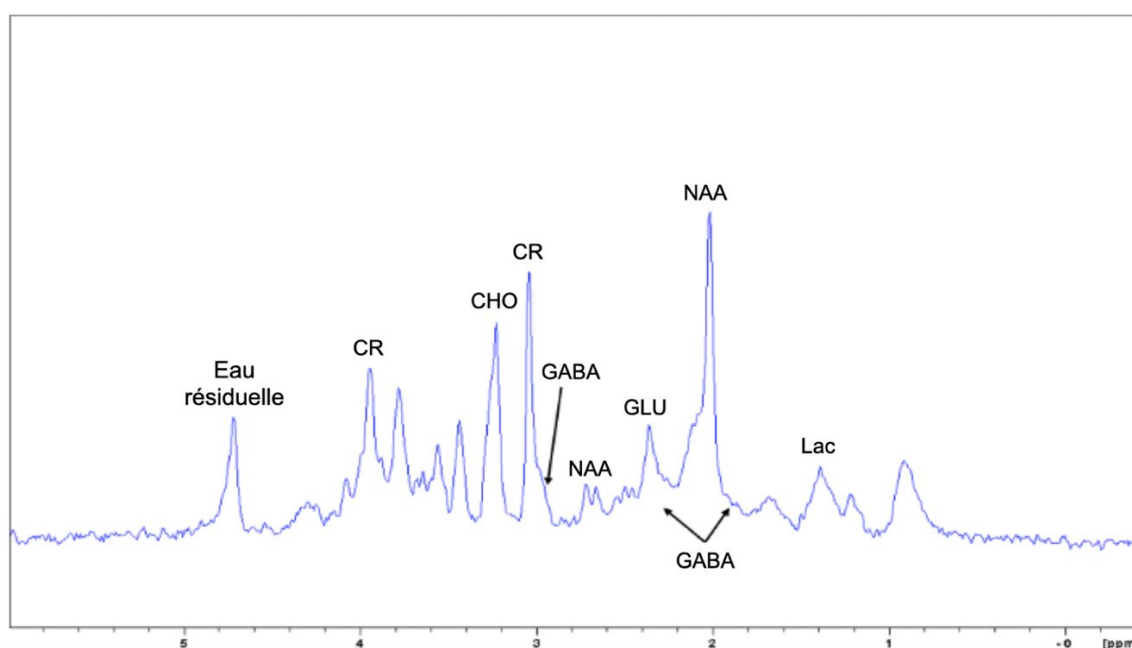


Figure 2-18. Spectre RMN 1H *in vivo* d'un cerveau de souris à 9,4 T (voxel $2 \times 1 \times 2 \text{ mm}^3$).

On trouve différentes méthodes d'édition dans la littérature [79], [80], [81], [82]. MEGA, du nom des auteurs de cette séquence MEsHer et GARwood [83], est rapidement devenue la méthode standard pour l'édition [84]. Elle est associée initialement à la séquence PRESS (expliquée dans la section suivante) et est basée sur le couplage scalaire entre les différents groupements chimiques qui composent le métabolite étudié. C'est cette méthode qui a été utilisée dans l'équipe pour montrer *in vivo* l'augmentation du GABA dans la ZE des souris KA-MTLE [5].

Comme expliqué section 2.2.3.2, il est possible de choisir un temps d'écho spécifique pour éditer un métabolite. Pour l'édition du GABA particulièrement, le TE est choisi tel que $TE = 1/2J = 68\text{ms}$, avec J la constante de couplage scalaire entre les protons H3 (hydrogènes liés au carbone 3, $\delta = 1,89\text{ ppm}$, $J = 7,35\text{ Hz}$) et les protons H4 ($\delta = 3\text{ ppm}$) du GABA [85] (Figure 2-19). A ce TE, les pics du GABA atteignent une inversion complète. L'évolution de la modulation des pics du GABA selon le TE est visible Figure 2-20.

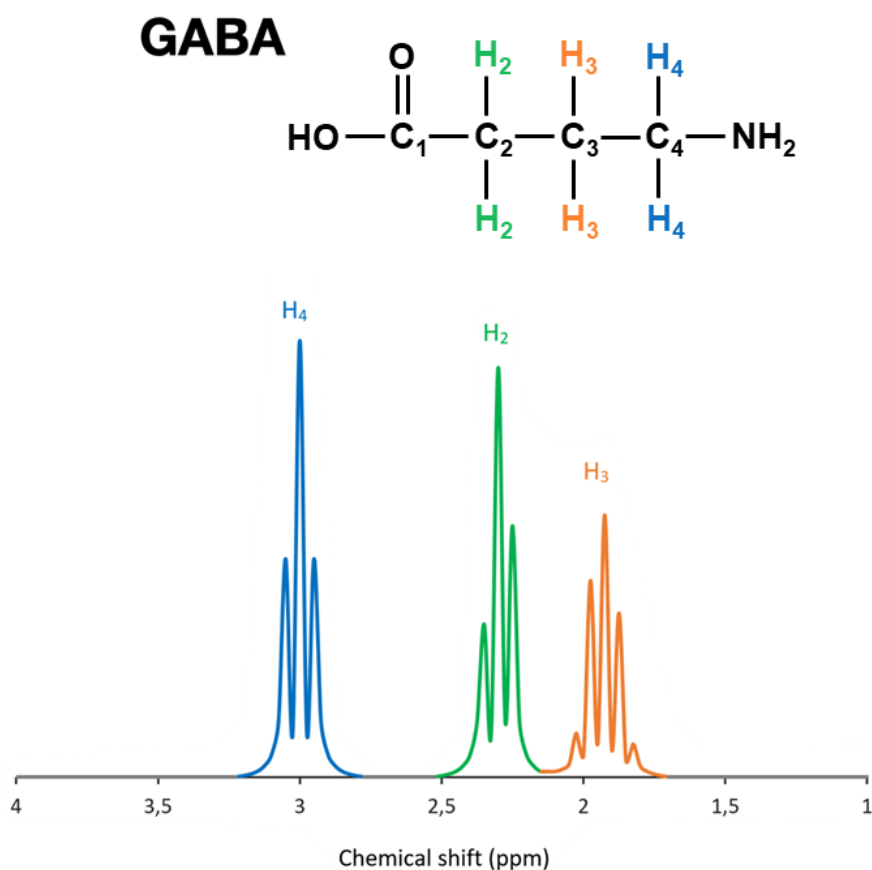


Figure 2-19. Molécule de l'Acide gamma-aminobutyrique (GABA) avec le spectre RMN ¹H associé (simulation à TE = 0 ms).

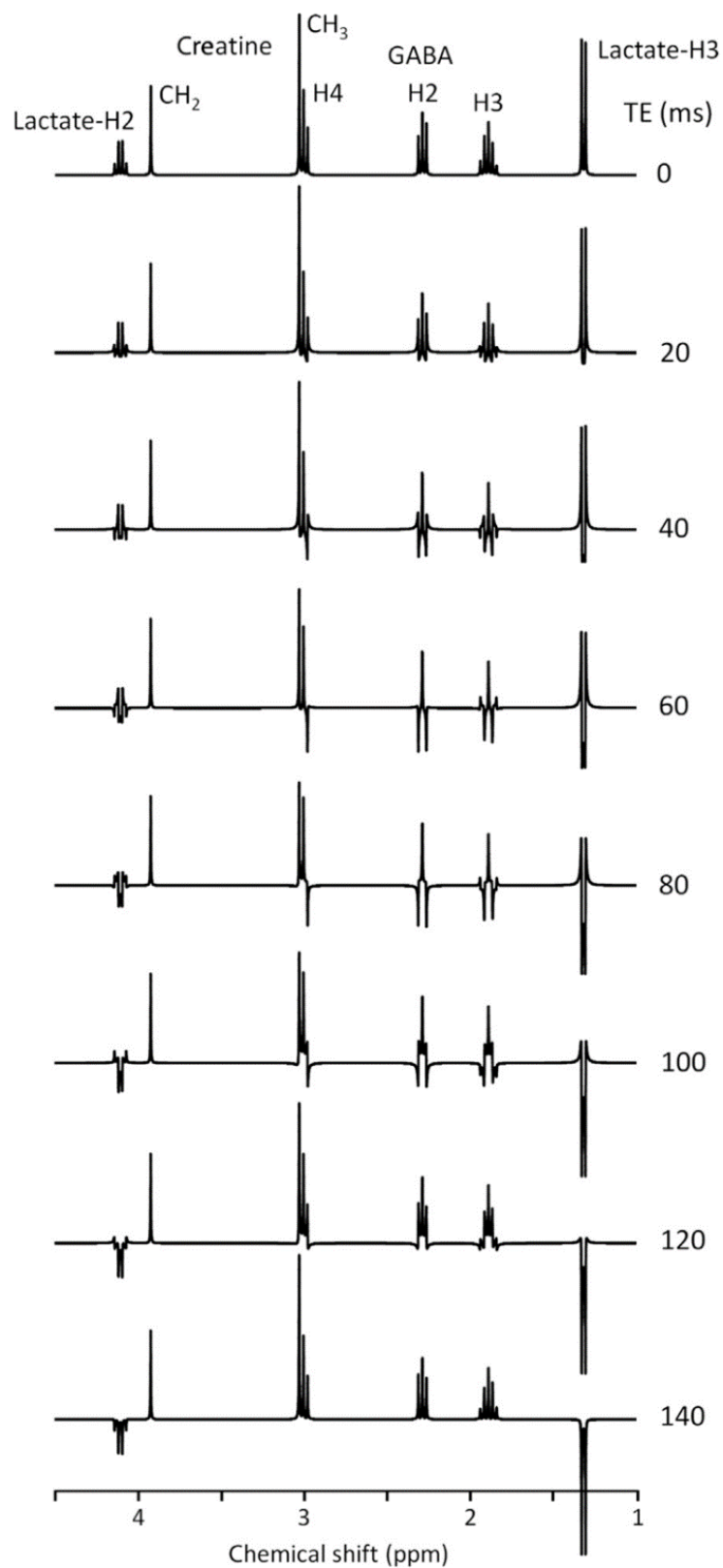


Figure 2-20. Modulation du signal en fonction du temps d'écho pour la Créatine, le GABA et le lactate. [86]

Cependant, contrairement au lactate, la sélection d'un temps d'écho spécifique de 68 ms pour le GABA, ne suffit pas pour éditer et détecter sans ambiguïté H4, car le pic est toujours masqué par les autres pics du spectre, comme dans un spectre non édité.

La méthode d'édition MEGA utilise des impulsions de refocalisation 180° dites d'édition, sélectives en fréquence mais pas spatialement. Elles n'ont donc qu'un seul effet : la refocalisation des spins des protons situés à la fréquence choisie, ce qui conduit à une inversion de l'évolution du couplage scalaire.

Pour s'affranchir des autres pics qui résonnent dans la zone spectrale de H4, la méthode MEGA est basée sur l'acquisition de deux spectres (Figure 2-21) :

- Spectre OFF : consiste en une acquisition avec J modulation, donc sans impulsion d'édition.
- Spectre ON : acquis avec les impulsions d'édition sélectives en fréquence appliquées à $\delta = 1,89$ ppm, qui est la fréquence de résonance des protons H3 du GABA. Ces impulsions d'édition ne refocalisent que le système de spin du GABA, ce qui permet de supprimer la J modulation : les résonances de H2 et H4 du GABA sont positives.

Le résultat final est obtenu par soustraction des spectres OFF et ON. Pendant les acquisitions OFF, les métabolites avec un couplage scalaire vont évoluer pendant le TE (phénomène de modulation J, Figure 2-19) et les résonances des protons H2 et H4 du GABA vont donc s'inverser. Les doublets du GABA à 3 ppm sont obtenus en soustrayant les spectres ON et OFF. Le pic central des multiplets, étant au déplacement chimique, est insensible au TE et donc ne subit pas de modulation J et est donc supprimé lorsque les spectres ON et OFF sont soustraits (Figure 2-21). Ceci est également vrai pour les pics singulets, tels que la Créatine, la choline et le NAA.

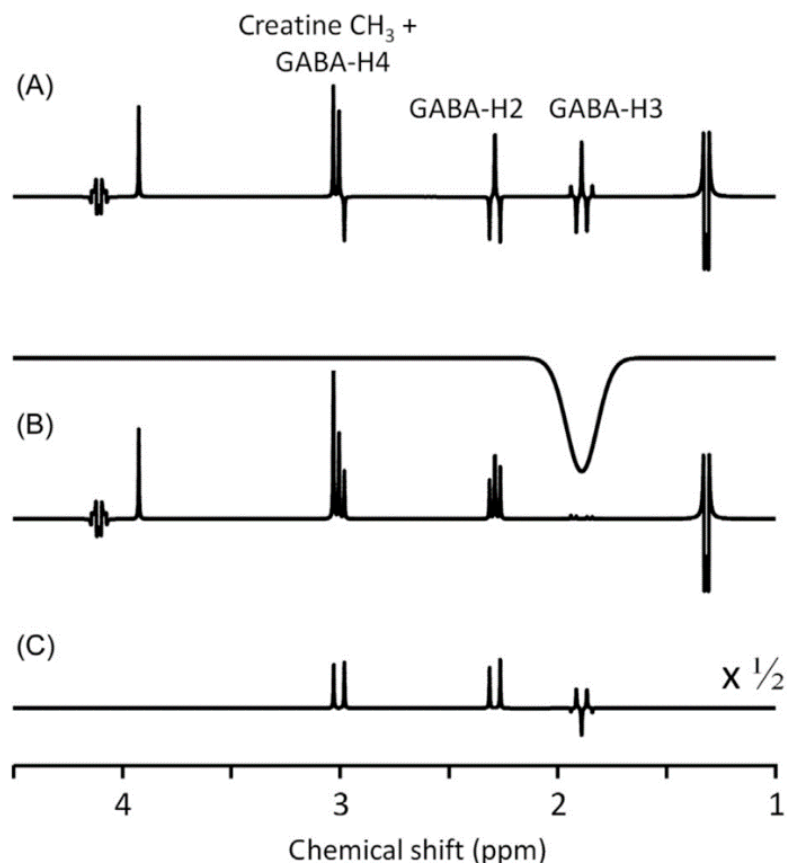


Figure 2-21. Schéma présentant le principe de l'édition par différence pour le GABA : Spectres RMN ¹H acquis à TE = 1/2J_{GABA} = 68ms sans impulsion d'édition (A) et avec impulsion d'édition à 1,89 ppm (B). Spectre différence (C) = (B) – (A). [86]

Cependant, cette méthode d'édition, étant donné qu'il s'agit d'une méthode soustractive, induit potentiellement une accumulation d'erreurs, liées aux différences potentielles de phase et de fréquence entre le ON et le OFF. Cela nécessite un prétraitement précis des spectres ON et OFF qui sera expliqué plus en détail dans la section 2.2.3.7.

Par ailleurs, afin de minimiser les différences de conditions expérimentales entre les acquisitions ON et OFF, une impulsion d'édition est appliquée lors de l'acquisition du spectre OFF à une fréquence très éloignée de la région spectrale contenant des pics. Comme les métabolites visibles à TE = 68 ms résonnent entre 1 ppm et 5 ppm, l'impulsion OFF est donc appliquée à 10 ppm, ce qui garantit qu'elle n'affecte aucun autre métabolite.

Aussi, il est important de noter que lors de l'édition d'un métabolite, d'autres peuvent être coédités s'ils ont des protons qui résonnent dans la bande de fréquence de l'impulsion d'édition. En effet, ces impulsions ont une largeur de bande (Hz), inversement proportionnelle à leur durée, et centrée sur une fréquence précise, ici 1,89 ppm pour le GABA. Les protons correspondants au pic du NAA à 2 ppm sont directement affectés par l'impulsion d'édition, ainsi que les protons du glutamate et de la glutamine (GLU + GLN = GLX) à 2,1 ppm. Ces métabolites sont donc coédités avec le GABA (Figure 2-22), et apparaissent donc dans le spectre différence (Figure 2-23), à 2,3 et 3,8 ppm. Cela n'affecte pas le pic du GABA H4 édité à 3 ppm. Cependant, des protons de macromolécules situées à 1,7 ppm sont également éditées, et apparaissent à 3 ppm sur le spectre différence. Jusqu'à 60% du signal à ce déplacement chimique pourrait être lié aux macromolécules [87]. Le pic à 3 ppm est donc noté GABA+, pour GABA + Macromolécule. Il existe des méthodes pour éliminer ce signal de macromolécules et n'obtenir que le GABA, mais nous ne les avons pas implémentées pour notre étude.

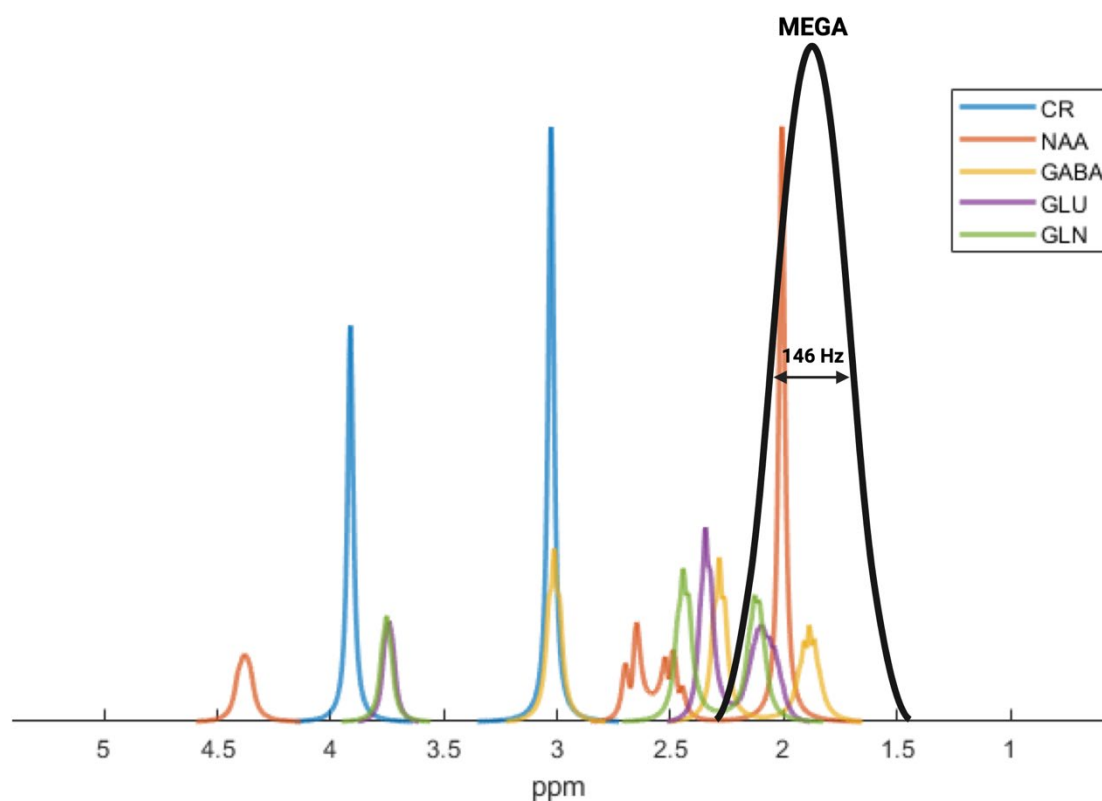


Figure 2-22. Simulation des spectres RMN à TE court (PRESS, TE = 16 ms) pour CR, NAA, GABA, GLU et GLN. L'impulsion d'édition est représentée sur le spectre en noir pour illustrer l'impact sur les métabolites. La largeur à mi-hauteur de l'impulsion est de 146 Hz, utilisée par Hamelin et al. et dans la suite de notre étude. Cependant, la forme de cette impulsion peut varier en fonction de la séquence utilisée.

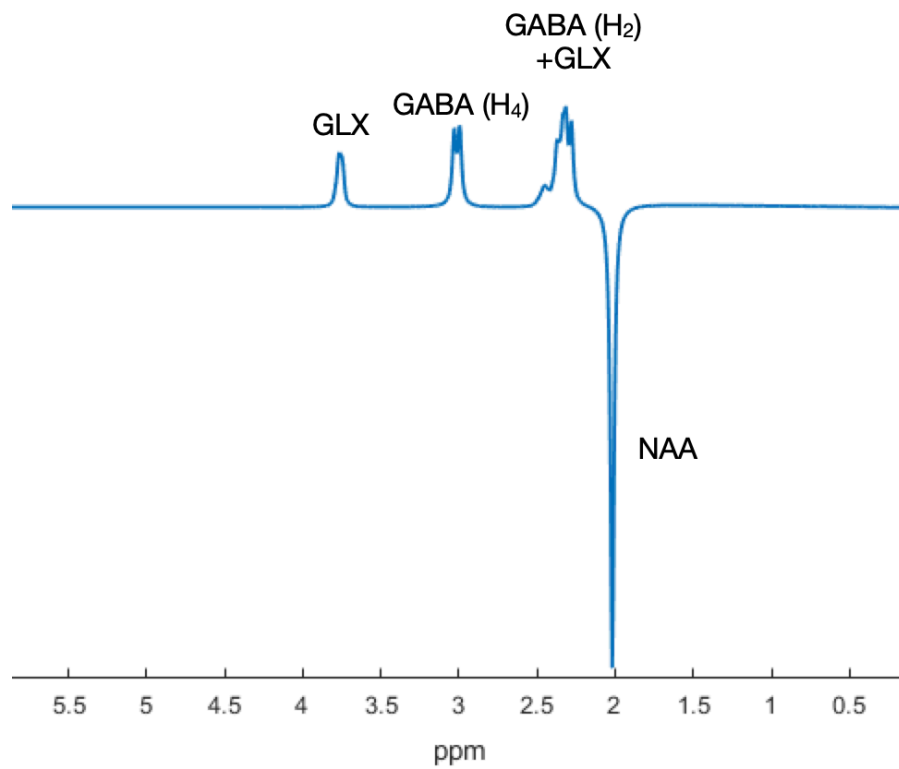


Figure 2-23. Spectre différence simulé du GABA, GLX (Glutamine + Glutamate) et NAA. On observe les deux pics externes du triplet du GABA H₄ à 3 ppm, le pic central étant supprimé lors du calcul de la différence.

2.2.3.5 Méthodes de localisation

La localisation spatiale est nécessaire en spectroscopie RMN *in vivo* afin de sélectionner le volume d'intérêt dans lequel on acquiert le signal spectroscopique (Figure 2-24). Il existe différentes méthodes de localisation, et la même méthode de localisation peut être utilisée pour réaliser de la spectroscopie simple-voxel ou de l'imagerie spectroscopique. Nous allons décrire ici des spécificités de ces différentes méthodes, en considérant uniquement la spectroscopie simple-voxel dans un premier temps puisque c'est la technique la plus utilisée, et celle utilisée dans l'étude de Hamelin et al. [5]. Le cas de l'imagerie spectroscopique est plus complexe, et sera traité dans la section suivante.

Tout d'abord, il faut préciser que lors de la sélection du volume, les signaux aux différents déplacements chimiques subissent en réalité des sélections de coupes différentes car c'est la combinaison des 3 paramètres suivants qui définissent la sélection exacte de la coupe : la bande passante de l'impulsion, l'amplitude du gradient de sélection et le déplacement chimique du pic d'intérêt. Ainsi, en spectroscopie *in vivo*, des erreurs de sélection apparaissent, appelée erreur de dispersion de déplacement chimique ou CSDE (pour Chemical Shift Displacement Error en anglais), et elles augmentent avec le champ magnétique et la taille du volume sélectionné. Elles sont définies par l'équation suivante :

$$CSDE = \frac{\Delta\delta \times B_0}{BW}$$

Avec $\Delta\delta$ la différence (en ppm) entre le déplacement chimique d'un pic d'un métabolite et la fréquence porteuse (généralement la fréquence de l'eau à 4,7 ppm), B_0 le champ magnétique principal (en unités de fréquence) et BW la largeur de bande de l'impulsion RF.

Hamelin et al. ont utilisé la séquence d'impulsion MEGA-PRESS pour l'étude *in vivo* sur les souris KA-MTLE, c'est-à-dire la méthode MEGA pour l'édition du GABA associée à la méthode simple-voxel PRESS (Point RESolved Spectroscopy) [88] (Figure 2-25) pour la localisation dans l'hippocampe sclérosé ou controlatéral des souris. Cette méthode de localisation est la plus utilisée car c'est la plus facile à mettre en œuvre, avec uniquement trois impulsions pour la sélection du volume.

Développée dans l'équipe sous ParaVision 6.0 de Bruker, la méthode MEGA-PRESS a permis de confirmer *in vivo* l'augmentation du GABA et la baisse de GLX (Glutamate + Glutamine), via le ratio GABA+/GLX dans la ZE des souris KA-MTLE, en accord avec les résultats de la spectroscopie RMN HRMAS *ex vivo* [5].

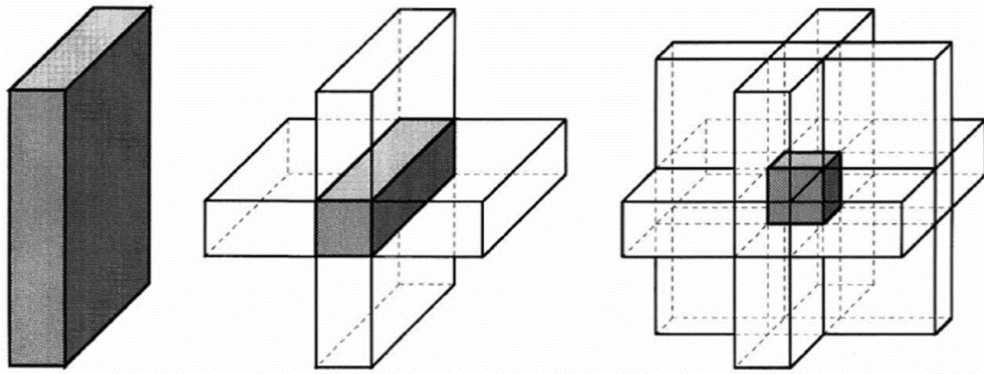


Figure 2-24. Principe de la sélection de volume avec 3 coupes, à l'aide de 3 impulsions sélectives spatialement [89].

Cependant, cette méthode de localisation PRESS présente des inconvénients tels qu'une sensibilité élevée aux inhomogénéités du champ B_1 et des CSDE élevées, car la puissance disponible pour ce type d'impulsions de sélection du volume est limitée et donc la largeur de bande BW qu'il est possible d'utiliser l'est également.

C'est pourquoi d'autres méthodes ont été développées (Figure 2-25) pour pallier ces inconvénients :

- SPECIAL (SPin ECho full Intensity Acquired Localized spectroscopy) [90] : TE minimum court, insensible à la dérive du B_0 dans les études humaines *in vivo*, mais moins facile à mettre en œuvre (notamment pour l'édition spectrale) [91] ;
- LASER (Localization by Adiabatic SElective Refocusing) [92] : moins sensible aux inhomogénéités du champ B_1 , angle de bascule uniforme, faibles CSDE grâce aux impulsions adiabatiques, moins de pic d'eau résiduel et de contamination lipide/MM, mais TE minimum plus long [93] ;
- sLASER (semi-LASER) [94] : TE minimum plus court que la LASER, CSDE plus élevées que le LASER mais toujours plus faible que la PRESS [93].

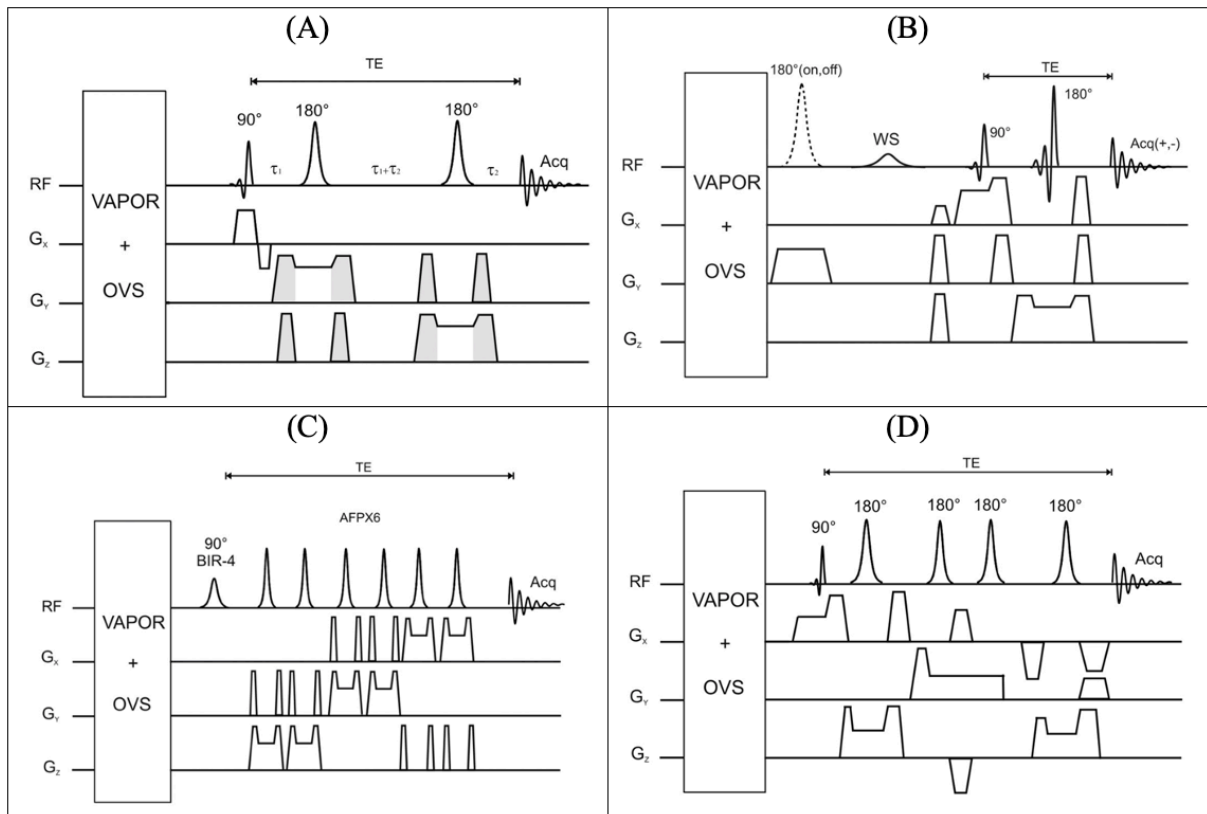


Figure 2-25. (A) Séquence PRESS composée de 3 impulsions. Une impulsion d'excitation de 90° est appliquée avec un gradient dans la direction x (G_x), suivie de deux impulsions de 180° de refocalisation sélectives dans les directions y (G_y) et z (G_z).

(B) Séquence SPECIAL composée de 3 impulsions : basée sur une combinaison de la technique 1D ISIS (Image Selected In vivo Spectroscopy) [95] et d'une séquence d'écho de spin sélectif par tranche. La localisation dans la direction y est réalisée grâce à une impulsion adiabatique de 180° en balayages alternés (pontillés). Pour les deux directions suivantes, une séquence spin-écho est utilisée avec des impulsions 90° et 180° asymétriques. Cependant, une autre impulsion doit également être utilisée pour la suppression de l'eau (WS).

(C) Séquence LASER composée de 7 impulsions. Une impulsion d'excitation semi-adiabatique de 90° non sélective est appliquée en premier. Ensuite, chaque paire d'impulsions adiabatique de 180° permet de sélectionner le volume dans chaque direction. Ici, la première sélection est effectuée dans la direction z , suivie par y et x .

(D) Séquence semi-LASER composée de 5 impulsions. Une impulsion d'excitation de 90° est appliquée avec un gradient dans la direction x (G_x). Deux paires d'impulsions adiabatiques de 180° permettent ensuite de sélectionner le volume dans les deux directions suivantes. La suppression de l'eau (VAPOR) (cf 2.2.3.2) et la suppression du volume extérieur (OVS) sont appliquées avant chaque séquence. [89]

La méthode MEGA-PRESS, utilisée pour éditer le GABA *in vivo*, est obtenue en ajoutant des impulsions RF 180° sélectives en fréquence autour de la seconde impulsion de refocalisation de la PRESS, comme on peut le voir sur la Figure 2-26.

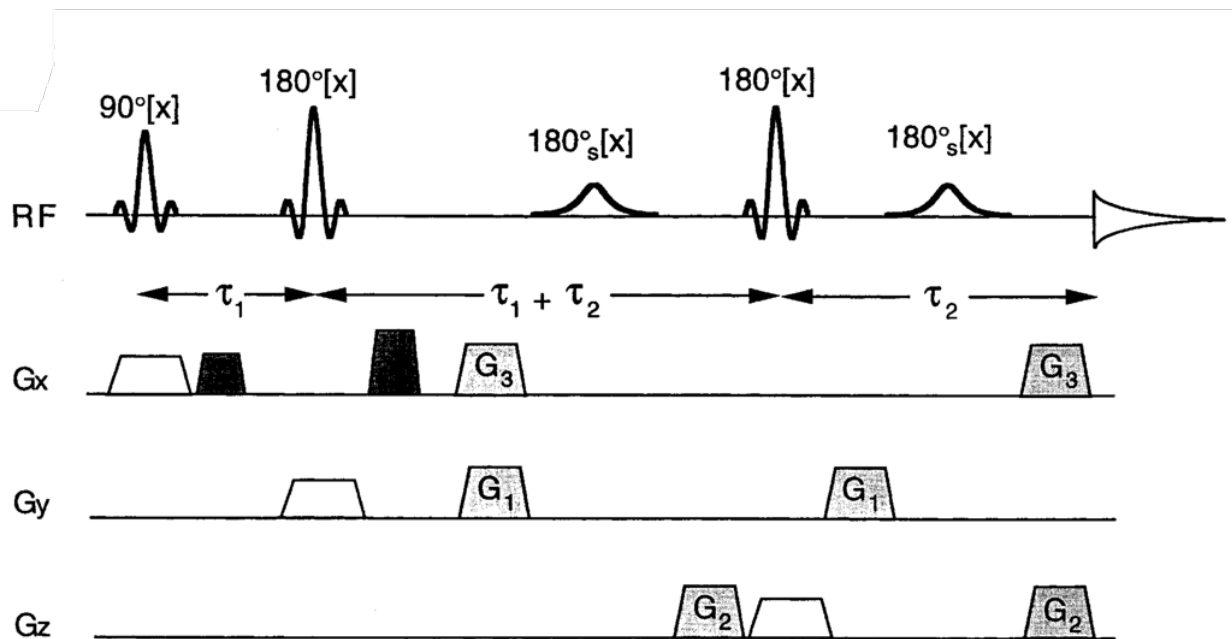


Figure 2-26. Impulsions et gradients de la séquence MEGA-PRESS. Les gradients G_1 , G_2 et G_3 sont spécifiques aux impulsions MEGA. Les temps τ_1 , τ_2 et τ_3 dépendent de la méthode de localisation PRESS [83].

Cependant, la méthode d'édition MEGA peut être associée à d'autres méthodes de localisation. Il est important de noter que la méthode de localisation choisie va contraindre la précision de l'édition : comme expliqué dans la section précédente, afin de réduire le phénomène de coédition, on sait que l'impulsion MEGA doit avoir une bande passante étroite, donc doit être longue. Puisque l'édition nécessite un TE précis, de 68 ms pour le GABA, si la méthode de localisation possède un TE minimum court, comme la PRESS, les impulsions d'édition pourront donc être plus longues donc plus précises, et inversement.

Ainsi, en fonction de la méthode de localisation choisie, la séquence finale obtenue présentera également des avantages et des inconvénients pour l'édition :

- MEGA-SPECIAL :
 - Avantages : TE minimum de la SPECIAL très court donc possibilité d'utiliser des impulsions d'édition très sélectives pour une meilleure suppression des macromolécules coéditées (MM), pouvant conduire à une amélioration de 10 % de l'édition du GABA par rapport à MEGA-PRESS [91], [96] ;
 - Inconvénients : difficile à mettre en œuvre car elle nécessite 4 acquisitions différentes au lieu de 2 pour la MEGA-PRESS [96] ;
- MEGA-LASER [97] :
 - Avantages : CSDE faibles, bonne suppression de l'eau, peu de contamination lipidique, rapport signal/bruit (SNR) élevé, insensibilité aux inhomogénéités B_1 , angle de bascule uniforme [93] ;
 - Inconvénients : méthode de localisation LASER au TE minimum long, limitant la longueur possible des impulsions d'édition et donc leur précision ;
- MEGA-sLASER [98] :
 - Avantages : TE minimum de la sLASER plus court que celui de LASER permettant d'utiliser des impulsions d'édition plus précises, profils de coupe uniformes et plus nets que la MEGA-PRESS [99] ;
 - Inconvénients : CSDE plus élevées que MEGA-LASER mais inférieur à la MEGA-PRESS.

Par ailleurs, un champ magnétique B_0 plus élevé permet d'augmenter le SNR, donc de réduire les temps d'acquisition et les volumes de détection, mais les erreurs de dispersion des déplacements chimiques sont augmentées, ce qui nécessite des impulsions de localisation avec des largeurs de bande passante plus importantes. Pour cette raison, la méthode PRESS n'est pas idéale pour les champs magnétiques élevés. En revanche, les impulsions adiabatiques utilisées dans les méthodes LASER et sLASER permettent une plus grande bande passante et sont moins sensibles au champ B_1 , ce qui présente des avantages par rapport à la méthode PRESS [65], [70]–[77][93]. La forme des impulsions adiabatiques, par exemple les impulsions de type sécant hyperbolique, est aussi plus performante dans la sélection du volume que celle des impulsions traditionnelles, comme les impulsions gaussiennes, ce qui conduit à moins de contamination du signal par le volume extérieur. Un module appelé Outer Volume Suppression (OVS), permet la suppression des contaminations du signal venu du volume extérieur à celui sélectionné. Ce module de suppression du volume extérieur est donc nécessaire avec la méthode de localisation PRESS, mais ce n'est pas le cas avec la LASER, ce qui facilite l'utilisation de cette dernière.

Par conséquent, la séquence MEGA-LASER semble être la séquence la plus appropriée à notre objectif. Cependant, si la méthode de localisation LASER limite trop la précision de l'impulsion MEGA, elle pourrait ne pas être une option. Dans ce cas, la MEGA-sLASER pourrait être intéressante.

Les différentes techniques de localisation discutées ci-dessus permettent la détection du signal dans un seul volume. Les avantages de cette approche sont les suivants :

- Le volume d'intérêt est généralement bien défini avec une faible contamination du volume extérieur ;

- Les inhomogénéités du champ magnétique peuvent être facilement réduites dans le volume lorsque le shimming est effectué, ce qui signifie que la résolution spectrale et la suppression de l'eau peuvent être facilement améliorées.

Cependant, la spectroscopie simple-voxel n'est pas adaptée à notre problématique dans la MTLE, dans la mesure où la localisation spatiale de la ZE par rapport aux régions adjacentes nécessiterait d'acquérir des spectres dans plusieurs voxels. C'est pourquoi nous allons introduire, dans la section suivante, différentes méthodes de spectroscopies multi-voxels aussi appelées imageries spectroscopique (MRSI).

2.2.3.6 Imagerie spectroscopique : MRSI

L'imagerie spectroscopique par résonance magnétique (MRSI) est très intéressante car elle permet la détection de multiples spectres RMN localisés à partir d'une matrice de positions en 2D ou 3D. Mais la MRSI présente des inconvénients qui la rendent techniquement plus difficile à mettre en œuvre :

- Les inhomogénéités du champ magnétique sont plus difficiles à corriger sur l'ensemble de l'objet ;
- Les CSDE sont importantes car le volume sélectionné est grand, et sont visibles sur les spectres (Figure 2-28) ;
- La contamination inter-voxel peut entraîner une dégradation spectrale ;
- Les temps d'acquisition sont plus longs qu'avec la spectroscopie simple-voxel, pour un seul voxel ;
- Les ensembles de données à traiter sont beaucoup plus importants et le traitement est plus complexe.

De plus, la taille nominale des voxels dans une expérience MRSI est calculée simplement avec la taille du FOV divisé par la taille de la matrice (ex : pour un FOV de $16 \times 16 \times 1 \text{ mm}^3$ et une matrice 16×16 , la résolution sera de $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$). Cependant, la taille réelle du voxel peut s'écarter considérablement de cette valeur en raison des caractéristiques de la transformée de Fourier. Un signal temporel mesuré sur une période infiniment longue produira une seule fréquence lors de la FT. Cependant, dans des conditions réelles, ce signal n'est échantillonné que sur une durée finie. C'est le cas de l'IRM, de la SRM simple voxel, de la MRSI et, en général, de toutes les techniques nécessitant une FT. La transformation de Fourier des points d'échantillonnage ou de la grille d'échantillonnage est appelée fonction d'étalement du point (PSF pour Point Spread Function en anglais). Bien que la PSF influence toujours les données traitées avec une FT, elle n'a pas été mentionnée précédemment, parce qu'elle n'était pas un facteur dominant en SRM simple-voxel ou en IRM, où le nombre d'échantillon est généralement élevé. Cependant, pour la MRSI, la durée d'acquisition limite la taille de la matrice, autrement dit la grille d'échantillonnage de l'espace des k, qu'il est possible d'utiliser. Ainsi, la taille réelle des voxels correspond à la largeur à mi-hauteur (FWHM pour Full-Width Half Maximum en anglais) de la PSF. La résolution réelle est donc plus faible que la théorique calculée la taille du FOV et de la matrice.

Cette PSF peut être améliorée avec une apodisation. Pour cela, il est possible d'utiliser un moyennage pondéré des acquisitions : au lieu d'acquérir les coordonnées de l'espace k avec le même nombre de moyennages, ce nombre peut être égal à 1 sur les bords de l'espace des k et augmenter progressivement jusqu'au centre. Cela permet de s'approcher d'une fonction d'apodisation gaussienne et donc améliorer directement la PSF (Figure 2-27).

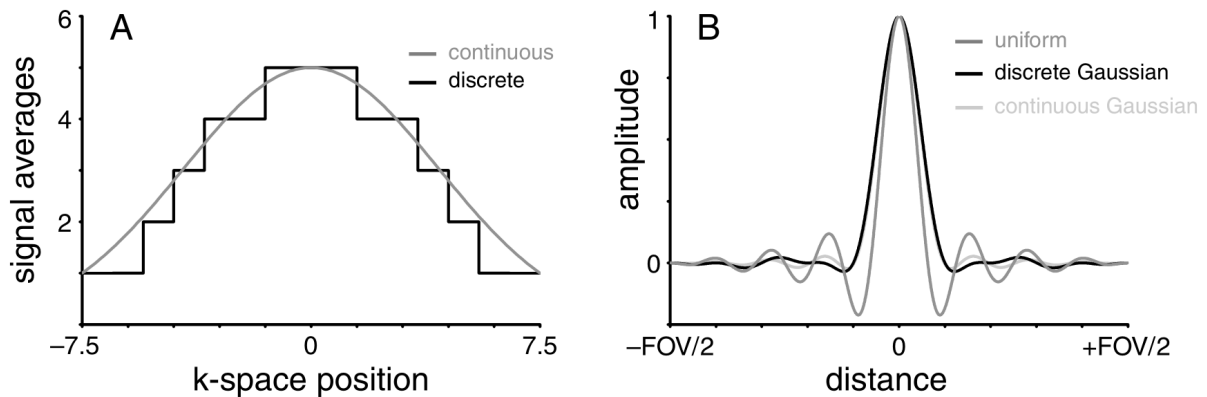


Figure 2-27. (A) Plan de moyennage discret pour la pondération de l'espace des k pendant l'acquisition du signal approxinant une fonction gaussienne continue pour 16 incréments de codage de phase. (B) Les PSFs correspondantes pour une pondération uniforme, discrète et continue de l'espace k gaussien.

Malgré ces problématiques, il y a un grand intérêt à utiliser la MRSI dans le cadre de l'épilepsie focale car elle pourrait aider à mieux définir la ZE d'une manière non-invasive, en permettant les comparaisons intracérébrales par individu. Mais, les différentes méthodes de localisation sont les mêmes que pour la spectroscopie *in vivo* simple-voxel et présentent donc les mêmes avantages et inconvénients présentés dans la section précédente. Ainsi, comme dit précédemment, la LASER a montré de faibles CSDE [93], [100], moins de contamination du signal par le volume extérieur et des voxels mieux définis [47] que la localisation PRESS pour l'IRM. Ces points sont d'autant plus importants lorsqu'il s'agit de la MRSI.

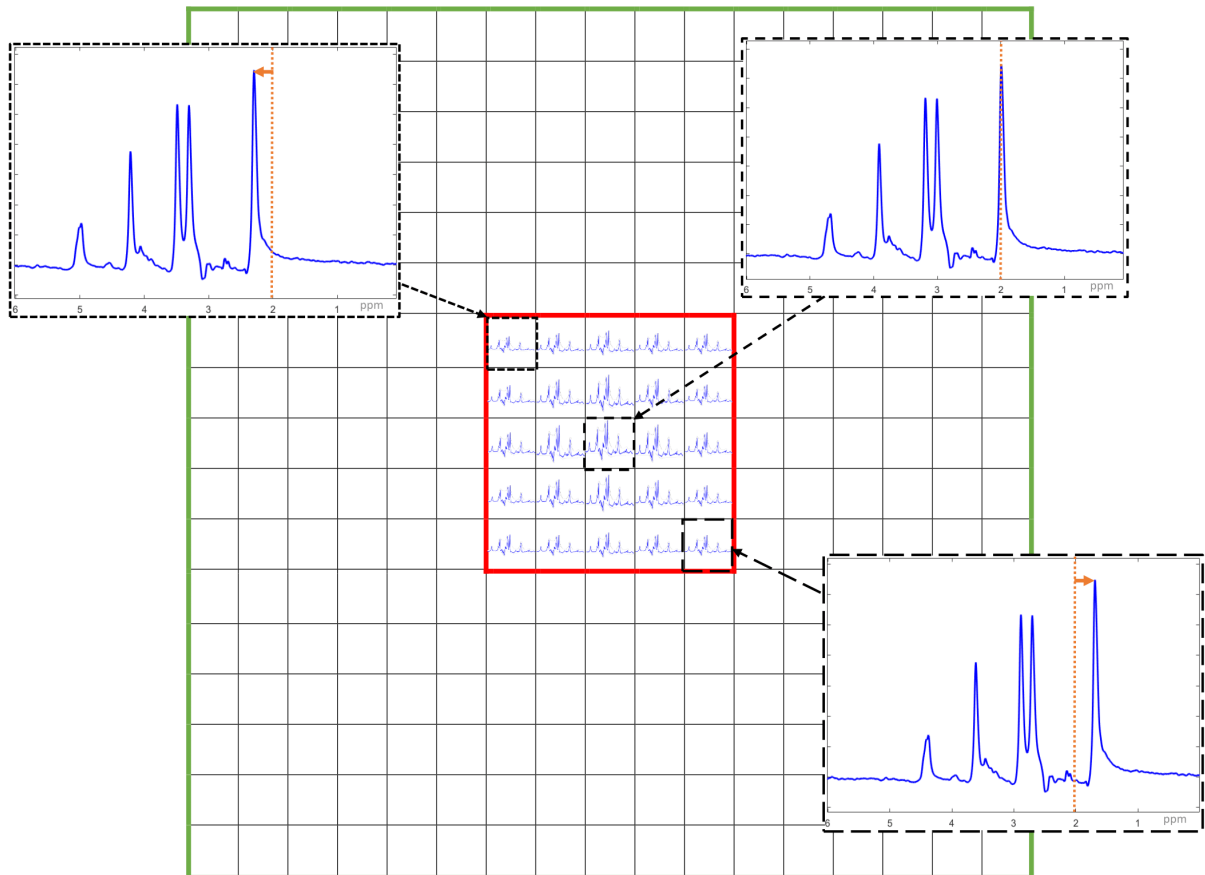


Figure 2-28. Représentation d'une matrice de spectres brutes, de taille 17x17, avec le FOV en vert et le voxel d'intérêt en rouge. En regardant en détail, on peut remarquer qu'il y a une différence de fréquence entre les spectres selon leur position dans la matrice, illustrée ici en orange par rapport au pic du NAA qui résonne à 2.02 ppm.

Quant à la MRSI éditée du GABA, des séquences ont déjà été développées sur des machines IRM cliniques [97], [101], [102], [103], [104], [105], [106], [107], [108]. En particulier, il a été démontré que la méthode CSI MEGA-LASER, par rapport à la CSI MEGA-PRESS, produit un signal plus important lors de simulations et sur fantômes, ainsi qu'une édition homogène sur l'ensemble du fantôme [97]. Une méthode MRSI MEGA-LASER 3D spirale a également été développée avec une correction de mouvement en temps réel, une mise à jour dynamique des shims [97] et une correction des artefacts liés à la dérive du champ B_0 [103]. L'encodage en spirale est moins sensible aux artefacts de mouvements et permet un temps de balayage plus rapide : la cartographie GABA+/GLX avec une matrice 20x20x20 et une résolution de 1 cm³ conduit à un temps d'acquisition de 24 min [97].

Ces études indiquent que cette méthode pourrait être une technique pertinente pour l'aide au diagnostic, car elle peut fournir une cartographie GABA+/GLX robuste et à haute résolution spatiale, avec des temps d'acquisition cliniquement réalisables. Par conséquent, nous avons décidé de développer la méthode d'imagerie spectroscopique par RMN MEGA-LASER. La mise en œuvre sur des IRM précliniques pourrait aider à la compréhension des pathologies dans des modèles animaux comme notre modèle de souris KA-MTLE.

2.2.3.7 Traitement et visualisation des données

Le traitement du signal joue un rôle essentiel en spectroscopie, et son automatisation n'est pas facile. Il repose donc souvent en partie sur des opérations manuelles qui sont opérateur-dépendant, ce qui explique qu'il n'y ait pas de standardisation actuellement. C'est d'autant plus vrai pour le traitement des données MRSI, et encore plus des données MRSI éditées qui sont complexes.

Afin d'évaluer la méthode développée dans ce projet, il était nécessaire de pouvoir traiter et visualiser les résultats au fur et à mesure des modifications implémentées dans les séquences, donc de disposer des outils adaptés. C'est pourquoi nous avons développé ces outils en parallèle du développement de la méthode d'acquisition.

Le traitement des spectres consiste en leur prétraitement suivi de leur quantification.

Le prétraitement consiste en :

- L'apodisation : consiste à multiplier le signal FID par une fonction de filtrage pour améliorer le SNR ou la résolution spectrale. Parmi les fonctions d'apodisation, on peut trouver des fonctions exponentielles, ou de Hanning par exemple. Cependant, l'amélioration du SNR par un filtrage exponentiel élargit les pics.
- Le zero-filling : augmente artificiellement le nombre de points échantillonnés en ajoutant des points de valeur nulle à la fin de la FID. Cela permet d'améliorer la résolution du spectre moyennant une réduction de SNR.
- La correction de phase : les signaux RMN acquis contiennent en général une composante de dispersion (imaginaire), en plus de la composante d'absorption (réelle) qui est une lorentzienne. Des décalages de phase peuvent se produire, ce qui se traduit par un mélange de ces 2 composantes et donc par l'apparition de composantes négatives dans les spectres. La correction de phase consiste à appliquer une phase constante, ou d'ordre zéro, et potentiellement un facteur dépendant linéairement de la fréquence, ou du premier ordre, afin que tous les pics du spectre soient de type lorentzien donc positifs et symétriques.
- La correction de fréquence : lors d'une acquisition avec plusieurs moyennages, il peut y avoir un « shift » (déplacement) en fréquence du champ B_0 de l'IRM entre chaque spectre. Si ce décalage n'est pas corrigé, cela peut entraîner un élargissement des raies et une diminution du SNR. Il faut donc effectuer ce recalage en fréquence pour chaque moyennage, et cela est d'autant plus important pour les méthodes d'édition nécessitant la soustraction entre deux spectres.

L'objectif de toutes ces étapes de prétraitement du signal est d'obtenir un spectre de qualité suffisante, donc avec un SNR et une résolution spectrale suffisant pour permettre ensuite la quantification des métabolites la plus efficace. Récemment un consensus a été publié sur le fait qu'un métabolite n'est pas quantifiable de façon fiable si son SNR est inférieur à 3, et la FWHM supérieure à 0,1 ppm [109] (Figure 2-29).

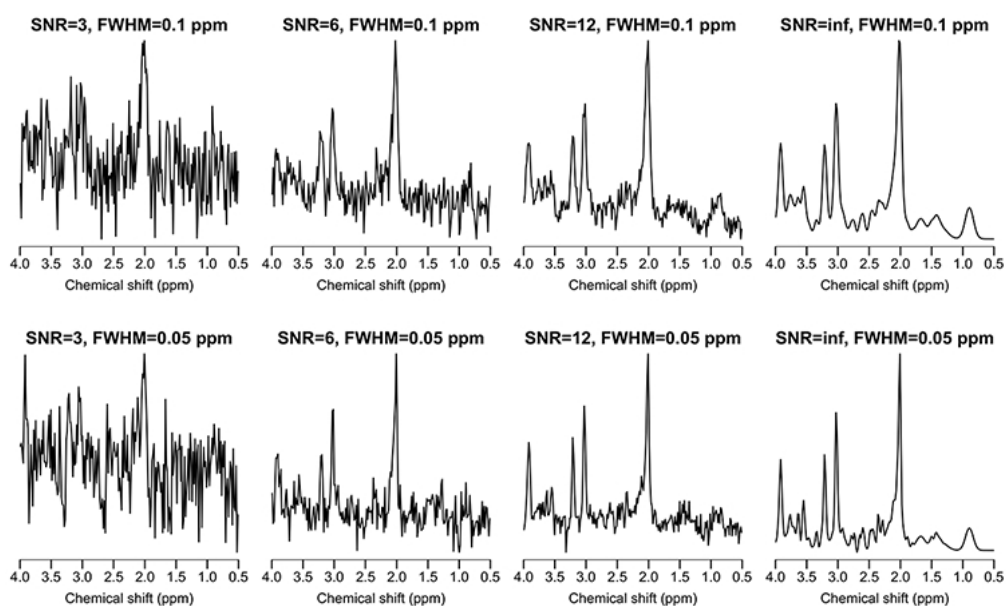


Figure 2-29. Spectres simulés de "cerveau normal" avec une acquisition PRESS à 3 T ; ($TE = 30$ ms, 1024 points et fréquence d'échantillonnage de 2000 Hz). Les valeurs SNR et FWHM sont données pour la plus grande résonance singulet (NAA à 2 ppm) [109].

La seconde étape du traitement est la quantification des spectres. La plupart des méthodes utilisées pour quantifier les spectres se basent sur l'ajustement du spectre expérimental comme une somme soit de pics, soit de spectres entiers de chaque métabolite identifié à partir de spectres de chaque métabolites expérimentaux ou simulés, regroupés dans ce que l'on appelle une « base de métabolites », ou une « base de pics ».

Des logiciels ont été développés et sont disponibles librement pour la communauté des spectroscopistes. Des logiciels « maison » sont aussi développés. Ces logiciels proposent généralement aussi les outils de prétraitement des données citées précédemment. Un point important dans cette étape de quantification est l'expression du résultat final, indépendamment de la méthode utilisée. En effet, il est possible d'exprimer les résultats en concentration absolue (mole/litre ou mole/gramme) en utilisant un métabolite endogène dont la concentration est connue, comme l'eau ou la créatine. Cela présente plusieurs avantages, notamment la possibilité de comparer les résultats obtenus avec différentes méthodologies et de minimiser les biais liés aux manipulations du signal par l'expérimentateur. Cependant, cette approche comporte des approximations car la concentration de l'eau ou de tout autre métabolite endogène peut varier d'un individu à l'autre et en fonction du type de pathologie. De plus, en spectroscopie RMN *in vivo*, les conditions de l'acquisition ainsi que les ajustements de la machine rendent la quantification absolue peu fiable. Une autre méthode consiste à exprimer les résultats de la quantification en valeurs relatives, en divisant (normalisant) l'amplitude d'un métabolite, ou d'un pic, par un autre métabolite ou pic, ou par le signal total, ou par le signal de l'eau (amplitude du pic de l'eau, et pas sa concentration). Ces différentes méthodes et l'absence de consensus compliquent la comparaison des valeurs des métabolites publiées (voir 2.2.3.3).

LCModel est actuellement le logiciel de quantification spectrale le plus largement utilisé [110], et il a été récemment rendu gratuit d'utilisation. C'est un outil de traitement dans le domaine fréquentiel et une base de spectres de métabolites est utilisée. Une correction automatique de la phase et de la ligne de base est effectuée, cette dernière pouvant également être modélisée comme une combinaison de pics de macromolécules. La concentration de chaque métabolite (par rapport au signal de l'eau) est déterminée (quantification absolue), avec un degré d'incertitude (bornes de Cramér-Rao exprimés en pourcentages). Cependant, LCModel présente certaines limitations, notamment en cas d'omission d'un métabolite ou d'une mauvaise prise en compte de l'impact de la variation du pH sur le déplacement chimique de certains pics. De plus, c'est une boîte noire et il n'y a pas de possibilité de connaître exactement comment ce logiciel fonctionne car le code n'est pas en libre accès. Également, LCModel traite les données éditées MEGA, mais pas les données MRSI Bruker.

jMRUI est un outil de traitement des spectres dans le domaine temporel qui est en libre accès et est aussi beaucoup utilisé dans la communauté des spectroscopistes. Il permet de traiter de manière semi-automatique les données et de les quantifier en utilisant différents algorithmes, par exemple les procédures AMARES ou QUEST. AMARES (Advanced Method for Accurate, Robust, and Efficient Spectral Fitting) [111], est une méthode basée sur un algorithme non linéaire de moindres carrés dans le domaine temporel, utilisant des conditions définies par l'expérimentateur : les valeurs de départ pour le delta de la fréquence de résonance et la largeur à mi-hauteur de chaque métabolite, les contraintes sur les résonances (forme, fréquence, largeur à mi-hauteur, amplitude et phase) et contraintes sur la phase et l'apodisation de l'ensemble du spectre. Pour QUEST (Quantitation based on semi-parametric quantum estimation) [112], comme LCModel, la méthode est basée sur une base de métabolites, simulée par mécanique quantique ou expérimentale. Il permet de traiter des grands groupes de spectres en des temps très courts (quelques minutes), et produit aussi les bornes de Cramér-Rao. Différentes méthodes sont aussi proposées pour gérer le signal des lipides et macromolécules. jMRUI permet également d'afficher les données MRSI [112], mais ne peut traiter les données MRSI éditées et le prétraitement n'est pas automatisé.

TARQUIN (Totally Automatic Robust Quantitation in NMR) [113] est également un outil intéressant, proche de jMRUI (domaine temporel). Les discontinuités de susceptibilité autour de l'hippocampe ont pour conséquences des inhomogénéités B_0 , ce qui nuit à la spectroscopie du GABA. Cet outil a donc été utilisé pour améliorer la reproductibilité de la spectroscopie du GABA+ hippocampique à l'aide de la méthode MEGA-sLASER simple-voxel chez des volontaires sains [114]. Cependant, TARQUIN permet la visualisation de données MRSI cliniques (Siemens, GE, Philips) mais pas de données MRSI précliniques (Bruker).

Gannet [115] (et plus récemment Osprey [116], développé par la même équipe) est un programme Matlab, totalement libre d'accès qui permet à l'utilisateur d'implémenter des modifications. Il est conçu spécifiquement pour l'analyse automatisée dans le domaine fréquentiel par lots des données de spectroscopie RMN éditées. Cependant, il traite uniquement les données simple-voxel acquises sur des IRM cliniques.

Le programme JET (Matlab) a été développé pour les données précliniques acquises avec la MEGA-PRESS simple-voxel [117]. Ce programme a le grand avantage de permettre le prétraitement ainsi que la quantification des spectres édités, le tout de manière automatique. Cette automatisation réduit les erreurs et incertitudes qui peuvent apparaître lors des étapes de prétraitement manuelles, principalement, lors du phasage et alignement des spectres ON et OFF pour éviter des artefacts lors du calcul de la différence. La quantification est effectuée de manière similaire à celle développée dans Gannet : le GABA et le GLX sont ajustés chacun avec une Gaussienne.

Une collaboration a été initiée avec Jia Guo (Université Columbia, New York, États-Unis), qui a développé ce programme, pour effectuer le prétraitement des données *in vivo* des souris KA-MTLE [5] (Figure 2-30), et pour quantifier le GABA⁺ et le GLX dans le spectre de différence ON-OFF, et le NAA, la CR, la CHO dans le spectre OFF. C'est donc ce programme que nous avons choisi d'utiliser, en le modifiant pour pouvoir traiter les données MRSI (expliqué dans le chapitre 4).

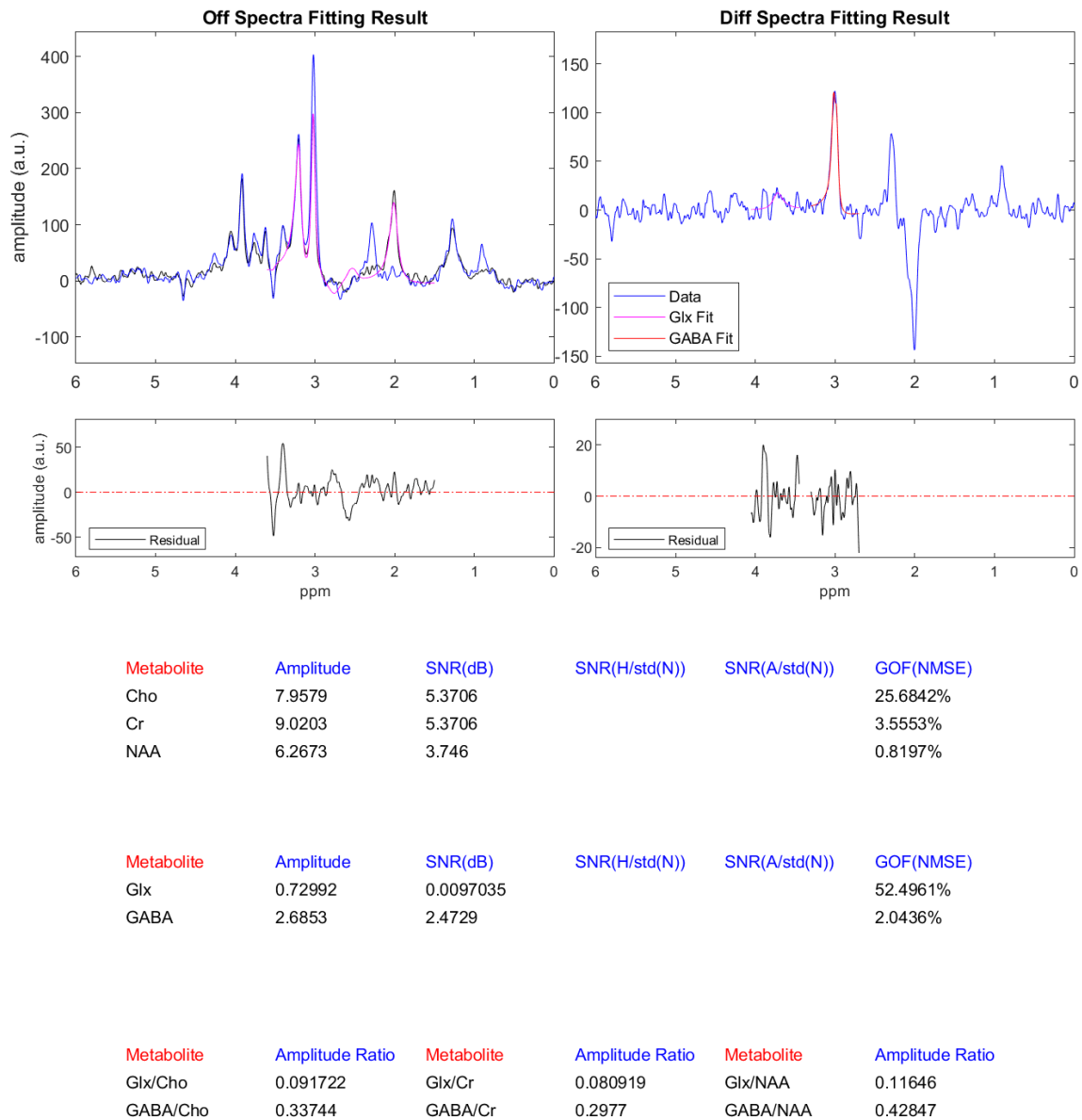


Figure 2-30. Exemple de résultat obtenu avec le programme JET pour le prétraitement et la quantification d'un spectre MEGA-PRESS d'une souris KA-MTLE. En haut, visualisation des spectres OFF et Différence avec les fit des pics d'intérêts (NAA, CR et CHO sur le spectre OFF, GABA et GLX sur le Diff) et les résidus des fits. En bas, résultats de la quantification des métabolites, avec le SNR de chaque pic et la qualité du fit (GOF pour Goodness Of Fit).

Et finalement, une étape importante est la visualisation des données. Dans le cas de spectroscopie simple-voxel, les logiciels décrits ci-dessus proposent soit une visualisation minimale des spectres expérimentaux et ajustés, avec les outils sous Matlab ou via une interface graphique (jMRUI, LCModel). Cependant, dans le cas de la MRSI la question de la visualisation devient cruciale dans la mesure où il est nécessaire de colocaliser les multiples spectres acquis avec l'imagerie anatomique.

Le logiciel CSIApy [118] (Figure 2-31) est un excellent outil permettant de prétraiter, quantifier et visualiser les données MRSI de plusieurs constructeurs IRM dont Bruker, et de visualiser la matrice des spectres simultanément aux images anatomiques. Cette étape semble anodine mais nécessite des connaissances particulières pour recalibrer les données spectroscopiques sur l'image anatomiques. Un phénomène connu sous le nom de décalage de demi-voxel [119] est une conséquence directe de la différence entre le centre lors de l'acquisition de l'image (au centre du voxel) et lors de la visualisation (dans un des coins). Cela se manifeste par un déplacement de la position d'un demi-voxel entre l'objet et l'image (Figure 2-32). Cet effet existe en IRM, mais est négligeable grâce au nombre de pas d'encodage qui est élevé (généralement 128 ou 256) et la grande résolution des images IRM. Cependant, cet effet est important en imagerie spectroscopique car la résolution spatiale est faible, et donc ce décalage d'un demi-voxel peut entraîner une erreur de localisation non négligeable. Ainsi, des corrections appropriées doivent être appliquées pour minimiser les erreurs de positionnement et garantir une interprétation précise des données spectroscopiques, ce qui est effectué par le logiciel CSIApy. De plus, les méthodes de quantification AMARES et QUEST sont aussi disponibles dans CSIApy.

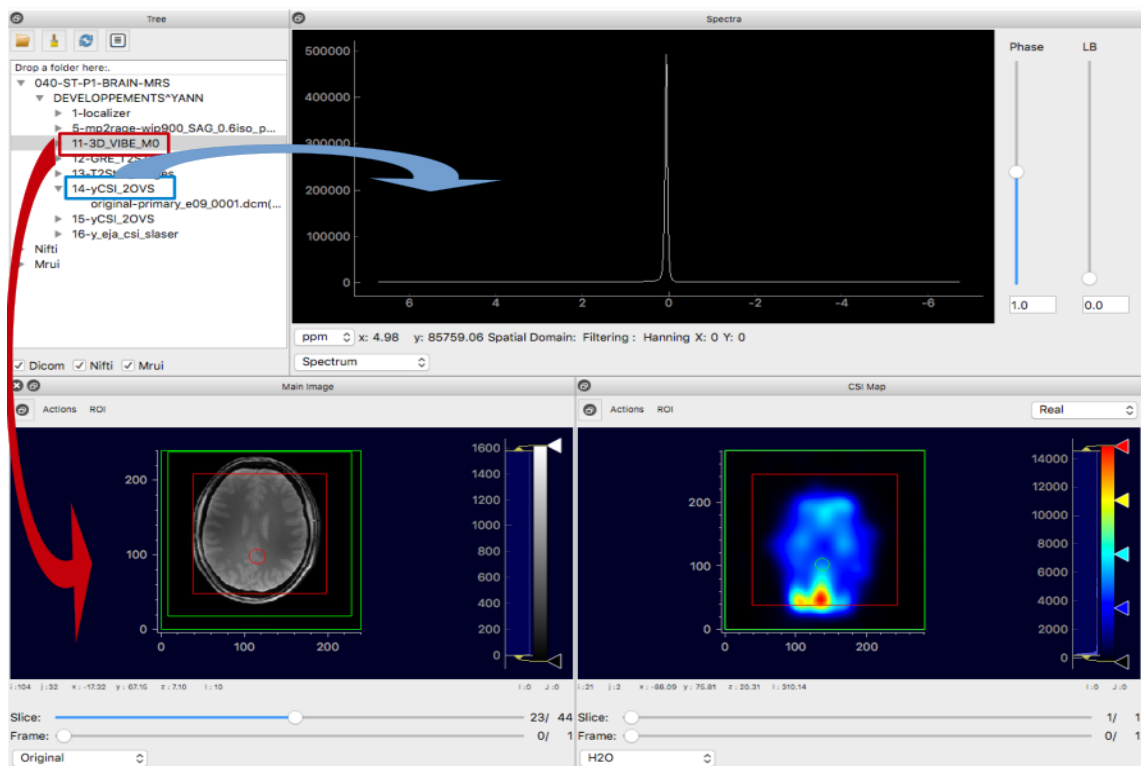


Figure 2-31. Logiciel CSIApy : exemple d'une acquisition clinique avec l'image anatomique en bas à gauche et les données CSI à droite (en haut visualisation d'un spectre et en bas la carte CSI).

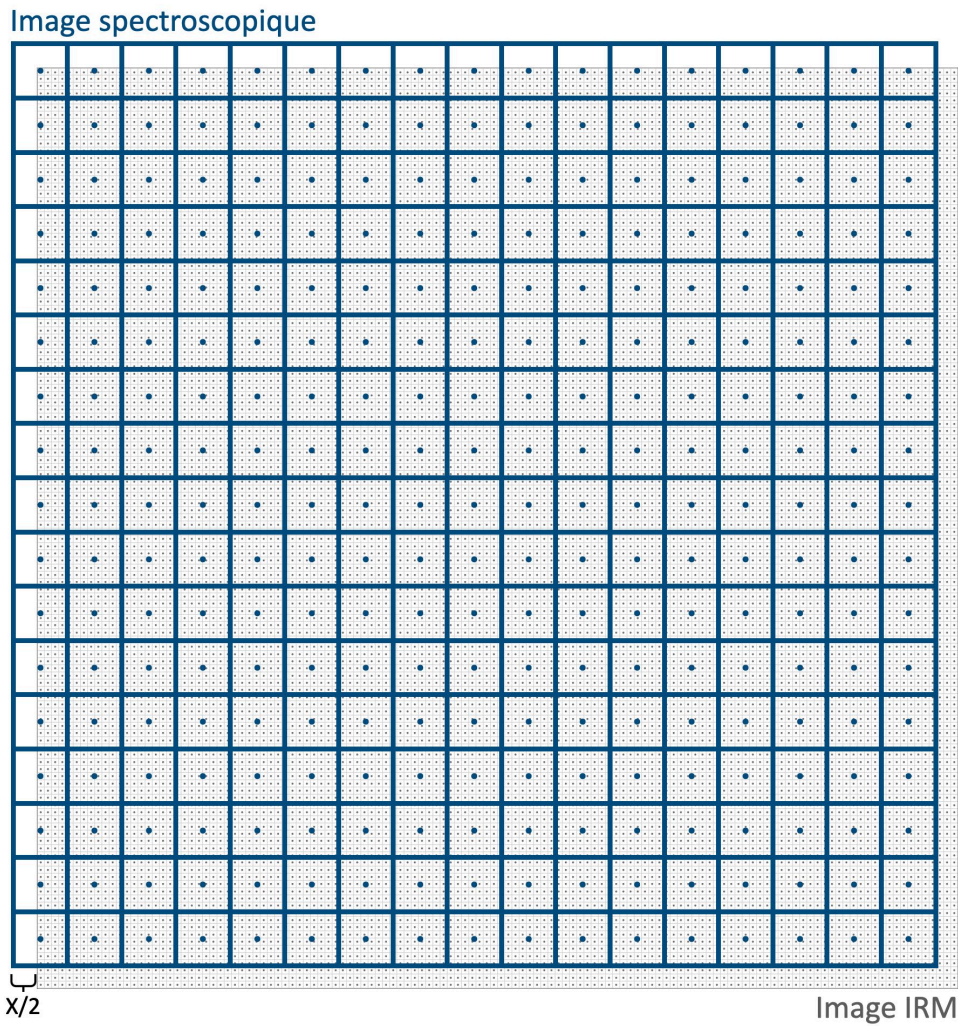


Figure 2-32. Décalage de la grille entre une image IRM classique haute résolution 128x128, et une image spectroscopique CSI 17x17, avec X la taille des voxels de la matrice CSI.

Nous avons donc décidé d'utiliser également ce logiciel, et de le combiner avec le programme JET, pour pouvoir visualiser, prétraiter, quantifier les données, et également les superposer avec les images anatomiques. Cependant, la méthode d'édition étant basée sur des spectres ON et OFF acquis de manière entrelacée, il a été nécessaire de modifier ce logiciel pour pouvoir lire les données MEGA-LASER MRSI.

La Figure 2-33 récapitule les fonctionnalités des logiciels et programmes énoncés précédemment.

Logiciels Fonctionnalités	jMRUI	LCModel	Gannet/Osprey	Tarquin	JET	CSIApy
Lecture des données éditées	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Lecture des données Bruker simple-voxel	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Oui
Lecture des données MRSI Bruker	Oui	Non	Non	Non	Non	Oui
Traitement des données automatisé	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
Quantification des données éditées	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Superposition des cartes métaboliques avec l'image anatomique	Oui	Non	Non	Non	Non	Oui

Figure 2-33. Tableau récapitulatif des fonctionnalités des différents logiciels et programmes de traitement des données MRS.

2.3 Conclusion

Pour résumer, nous nous intéressons dans ce projet au syndrome d'épilepsie du lobe méso-temporal, la MTLE, qui est la forme la plus fréquente d'épilepsie focale, la zone épileptogène (ZE) étant localisée dans le lobe temporal, principalement dans l'hippocampe, de manière unilatérale. Cette épilepsie est pharmacorésistante, c'est à dire qu'une résistance aux traitements pharmacologiques se développe, ce qui empêche le contrôle des crises épileptiques. La chirurgie de résection de la ZE peut être proposée comme solution thérapeutique, cependant 20 à 50% des patients subissent encore des crises récurrentes après la chirurgie, ce qui signifie que la ZE aurait été réséquée de façon incomplète. Le développement de nouvelles méthodes non invasives est donc essentiel pour améliorer la délimitation de la ZE et ainsi améliorer l'efficacité de cette chirurgie.

Pour cela, nous avons choisi le modèle de souris KA-MTLE, qui est très bien caractérisé et a été utilisé dans l'équipe pour plusieurs études. En particulier, le potentiel de l'IRM multiparamétrique a été montré pour l'identification de la ZE chez ce modèle animal [56]. Un autre projet [5] basé sur l'utilisation de la spectroscopie RMN du proton, a montré l'augmentation d'environ 100% du GABA dans la ZE, et la diminution du glutamate, impliqué notamment dans la synthèse GABA.

La méthode d'édition MEGA permettant de faire ressortir un pic du GABA, avait été utilisée en mode simple-voxel dans cette étude afin d'améliorer la robustesse et la précision de la quantification du GABA. Cependant, cette méthode simple-voxel ne permet pas la localisation spatiale de la ZE au sein du cerveau des souris épileptiques. Pour cela, la technique d'imagerie spectroscopique, qui est multi-voxel, et permet donc d'obtenir des cartes métaboliques qui, superposées à l'image anatomique, donnent une information spatiale, semble plus appropriée.

Puisque le GABA est discriminant de la ZE, notre stratégie a été, à partir de la méthode d'édition du GABA et de la technique d'imagerie spectroscopique, d'obtenir une méthode d'imagerie spectroscopique du GABA qui permettrait de quantifier cette augmentation dans la ZE. Nous avons pour cela décidé d'utiliser la méthode d'édition MEGA, associée à la méthode de sélection du volume LASER, pour développer la méthode d'imagerie spectroscopique du GABA CSI MEGA-LASER, qui n'existait pas en préclinique.

En conclusion, ce projet de thèse avait pour objectif d'évaluer si l'imagerie spectroscopique du GABA, associée ou non à l'IRM multiparamétrique, permettait de localiser spatialement la ZE dans le modèle KA-MTLE.

3. Développement et évaluation des méthodes de spectroscopie *in vivo*

3.1 Introduction

Avant d'expliquer le développement de méthodes de spectroscopie *in vivo*, il est essentiel de souligner que c'est un processus complexe mais surtout extrêmement chronophage. En effet, pour chaque modification apportée à la méthode, des essais doivent être réalisés directement sur la machine IRM. Donc l'avancée du développement nécessite que l'IRM soit disponible, et qu'un fantôme soit fabriqué pour effectuer ces essais. D'autres parts, comme expliqué précédemment, nous avons dû développer en parallèle les outils de prétraitement et quantification, visualisation des données. Toutes les données simple-voxels présentées dans ce chapitre sont traitées avec le logiciel JET. Toutes les données MRSI présentées dans ce chapitre sont traitées avec JET et visualisée avec CSIApy.

3.1.1 Programmation des séquences

La séquence simple-voxel MEGA-PRESS était déjà développée et utilisée au sein de l'équipe [5]. Cependant, comme expliqué dans la section 2.2.3.5., la méthode de localisation LASER (fournie par Julien Valette du MIRCen CEA Saclay) présente de nombreux avantages par rapport à la PRESS, particulièrement pour l'acquisition de données d'imagerie spectroscopique.

Ainsi nous avons décidé de développer la méthode d'imagerie spectroscopique MEGA-LASER. Toutefois, les données de spectroscopie *in vivo* simple-voxel sont plus rapide à acquérir mais également à analyser que les données d'imagerie spectroscopique. En conséquence, la mise en place d'une séquence MEGA-LASER simple-voxel était une étape préliminaire indispensable avant la programmation de la méthode d'imagerie spectroscopique. Le travail a donc été divisé en deux étapes :

- À partir des séquences simple-voxel MEGA-PRESS et LASER, développer la MEGA-LASER simple-voxel ;
- Ensuite, à partir de la séquence CSI PRESS fournie par Bruker, développer la séquence d'imagerie spectroscopique LASER puis MEGA-LASER.

A chaque étape, un travail de programmation a été réalisé, suivi d'une validation sur fantôme puis sur souris.

Bruker, le constructeur des machines IRM précliniques, fournit les codes sources de plusieurs méthodes d'acquisitions, incluant toutes des fichiers types, présentés Figure 3-1. La Figure 3-2 illustre l'organisation de ces fichiers selon différentes structures aux rôles spécifiques.

Les codes sources peuvent être modifiés via ParaVision. C'est le logiciel constructeur utilisé pour l'acquisition et l'affichage des images ou des spectres, mais aussi pour simuler les séquences d'acquisition. La programmation des méthodes a d'abord été effectuée avec la version 6.0.1 de ParaVision, puis à partir d'avril 2021 avec la version 7.0. Les séquences présentées ci-dessous sont donc fonctionnelles sous ces deux versions, moyennant quelques modifications simples.

File	Purpose
Makefile	Recipes for the compilation
gre.c	A glue file, always bearing the method's name, needs no modification
gre.xml	Description of the Editor Cards
method.h	Link to necessary header files. Identical for all methods, needs no modification.
relProtos.h	Link to function prototypes. Identical for all methods, needs no modification.
parsTypes.h	User defined parameter types (e.g. enumerations)
parsDefintion.h	Definitions of parameters
parsLayout.h	Definition of the MethodClass: defines the contents of a protocol, MethodRecoGroup: list of method-specific reconstruction parameters, and conflict parameters.
callbackDefs.h	Redirection of global (predefined) parameter relations
initMeth.c	Code of the <code>initMeth</code> function (required)
loadMeth.c	Code of the <code>loadMeth</code> function (required)
parsRelations.c	Parameter relations
backbone.c	<code>backbone</code> (function controlling interdependencies of parameters) and auxiliary functions
BaseLevelRelations.c	Functions for setting ACQP parameters
RecoRelations.c	Functions for setting RECO parameters

Figure 3-1. Liste des fichiers types composant une séquence d'acquisition sous ParaVision 7.0 (Manuel d'utilisation PV7.0)

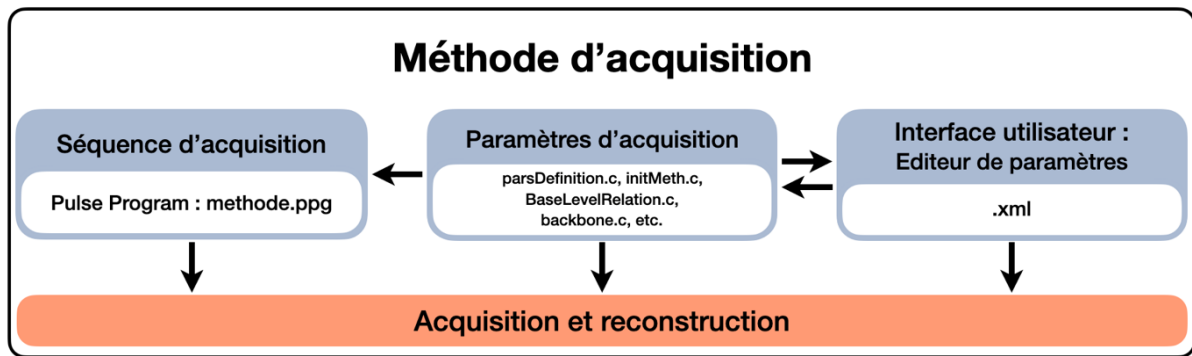


Figure 3-2. Représentation des différentes structures d'une méthode d'acquisition, et leurs relations, sous ParaVision 7.0

Pour rappel, comme expliqué au paragraphe 2.2.3.7 nous avons dû développer en parallèle des outils de prétraitement, quantification et visualisation des données :

- JET : programme Matlab, développé pour effectuer le prétraitement des spectres édités MEGA-PRESS simple-voxel, ainsi que leur quantification ;
- CSIApy : logiciel Python, permettant de visualiser les données d'imagerie spectroscopique et de les quantifier.

Les données présentées ci-dessous, obtenues lors des essais effectués sur fantômes et souris, ont donc été traitées avec ces outils.

3.1.2 Fabrication des fantômes

Pour effectuer les tests et validations de ces méthodes, il est nécessaire de commencer sur fantômes avant de passer aux animaux. Les fantômes sont des objets permettant de simuler les propriétés physiques et chimiques des tissus biologiques, ainsi que leur composition.

Les fantômes que nous avons fabriqués étaient composés d'agar gélifié dans du tampon phosphate salin (PBS), pour maintenir un pH neutre stable, de Dotarem, un agent de contraste à base de complexe de gadolinium, et des métabolites spécifiques que nous souhaitons étudier.

Le gel d'agar est utilisé comme matrice pour donner une consistance similaire à celui du cerveau. Pour les acquisitions simple-voxel, un fantôme homogène peut être utilisé, réalisé dans des tubes plastiques de type Falcon. Au contraire, pour valider la méthode d'imagerie spectroscopique, nous avons fabriqué des fantômes possédant plusieurs compartiments, à l'aide de tubes RMN haute résolution (verre sans impuretés paramagnétiques) afin de mimer plusieurs zones cérébrales avec des concentrations différentes de métabolites. Ces tubes ayant des petits diamètres (3, 5 et 10 mm de diamètre), de nombreux essais ont été nécessaires afin de trouver la concentration d'agar-agar optimale, notamment pour obtenir un gel qui ne se solidifie pas trop rapidement permettant de l'injecter dans ces tubes sans avoir de bulles d'air. Nous avons ainsi choisi une concentration de 1% de poudre d'agar-agar.

Lors de nos premiers essais sur fantômes, nous avons constaté que le signal était tronqué et il était nécessaire d'augmenter la fenêtre d'acquisition et le TR. Pour éviter cela, du Dotarem a été ajouté dans les fantômes. Cet agent de contraste est couramment utilisé en imagerie afin de raccourcir le T1 des protons de l'eau, mais il a aussi un impact sur le T2, ce qui a pour conséquence directe un élargissement des pics. Il faut donc trouver un compromis entre diminution du T1 sans élargissement trop important des pics. Ainsi, notre valeur compromis était de $3 \cdot 10^{-5}$ mmol/mL d'acide gadotérique (Dotarem à 0,5 mmol/mL d'acide gadotérique) (stage de Master 2).

Enfin, les métabolites ont été incorporés dans le gel avec une valeur maximale de 50 mM par métabolite afin de ne pas saturer le signal.

En résumé, un travail expérimental long et minutieux a été nécessaire pour obtenir des fantômes multi compartiments qui permettent l'acquisition de spectres RMN de qualité, et mimant un cerveau avec plusieurs régions cérébrales de concentration variables. La composition définitive pour la fabrication de ces fantômes est de 1% de poudre d'agar-agar dilué dans une solution aqueuse de PBS, du Dotarem ($3 \cdot 10^{-5}$ mmol/mL d'acide gadotérique), et des métabolites (GABA, NAA, CR, etc.) n'excédant pas 50 mM chacun.

3.2 MEGA-LASER Simple-voxel

3.2.1 Développement de la méthode

Comme évoqué précédemment, nous disposions au laboratoire des méthodes MEGA-PRESS et LASER simple-voxel. Avant de programmer la séquence d'imagerie spectroscopique du GABA, nous avons décidé de développer la méthode MEGA-LASER simple-voxel car l'acquisition de ces données, mais aussi l'analyse de ces dernières, est considérablement plus rapide que pour les données d'imagerie spectroscopique. De plus, pour ces données simple-voxel, il n'était pas nécessaire de développer un outil de visualisation des spectres pour contrôler nos données, puisque Topspin (logiciel de spectroscopie de Bruker, inclus dans ParaVision) nous permettait de visualiser directement les données lors de l'acquisition.

Cette approche nous a permis de valider cette méthode et de la comparer à la MEGA-PRESS, mais aussi d'effectuer les premiers réglages et optimisations spécifiques à la séquence LASER, tels que les paramètres des impulsions adiabatiques, de l'impulsion d'édition, les spoilers, etc.

Il est important de souligner également que lors du développement des méthodes nous avons veillé à ce qu'un certain nombre de paramètres, tel que le TE, TR, ou la fréquence et la bande passante de l'impulsion d'édition, soient éditables et modifiables par les utilisateurs, afin de garantir l'extension des applications à d'autres problématiques que le GABA.

La Figure 3-3 représente la séquence LASER d'origine (A), et la séquence MEGA-LASER à obtenir (B). Pour y parvenir, de nombreuses modifications du code source de la LASER simple-voxel ont été effectuées en parallèle, avec des acquisitions régulières sur un fantôme homogène pour évaluer l'impact des modifications. Les modifications principales sont expliquées ci-dessous.

Dans cette première partie, toutes les données présentées, obtenues sur fantômes ou lors d'acquisitions sur souris, ont été traitées avec le programme Matlab JET.

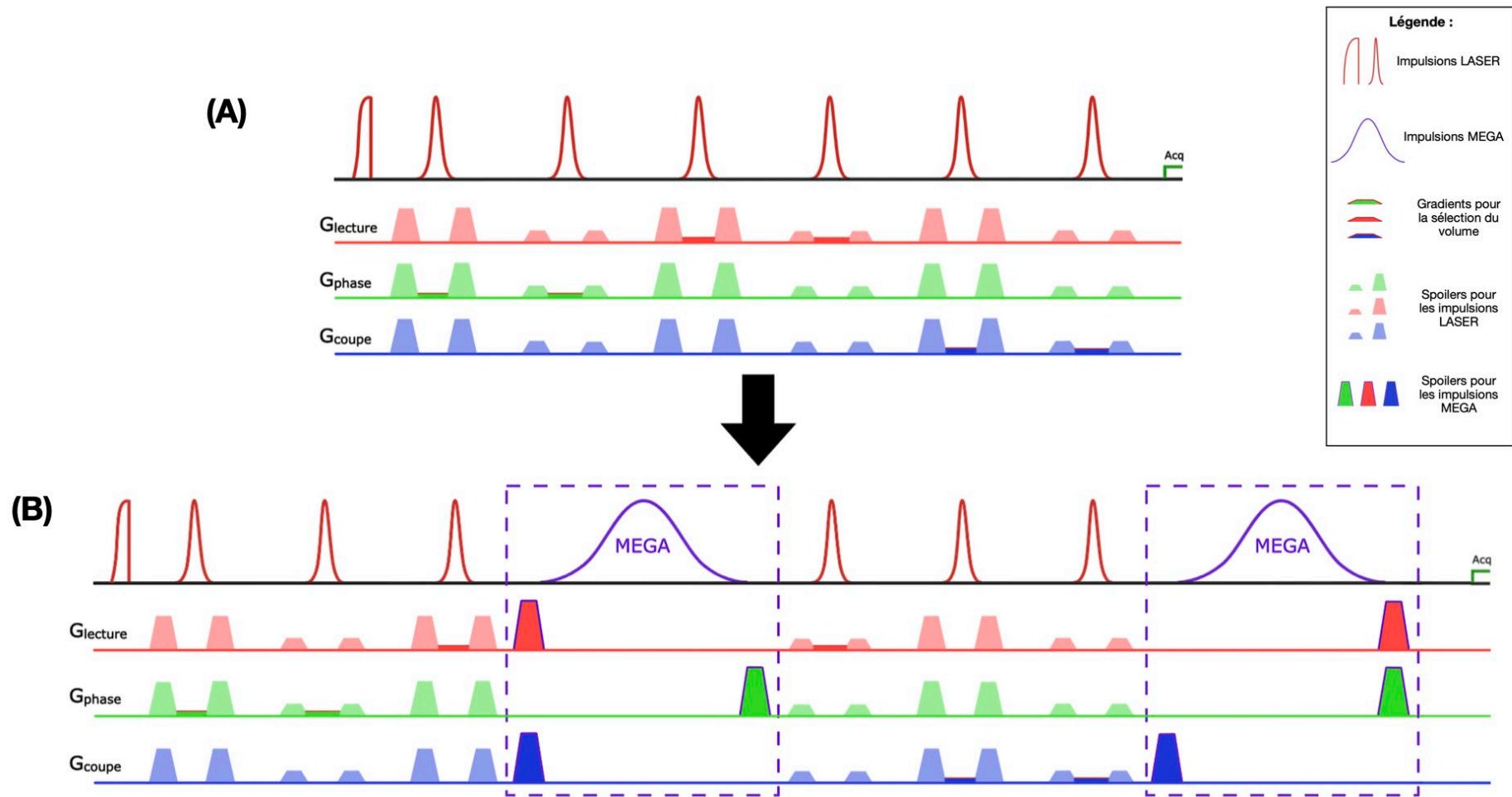


Figure 3-3. Schéma de la séquence LASER en haut (A) et de la MEGA-LASER à obtenir en bas (B). Les impulsions semi-adiabatique Half-passage et adiabatique Full-passage qui composent la méthode de sélection du volume LASER sont représentées en rouge. Les deux impulsions MEGA sont représentées en violet, avec les gradients de spoilers spécifiques comme proposé par Mescher et Garwood [83].

3.2.1.1 Impulsions MEGA

Pour obtenir la séquence MEGA-LASER, la première étape consiste à ajouter une impulsion d'édition à deux endroits dans la séquence LASER. Une impulsion est caractérisée entre autres par sa forme, sa longueur, son amplitude et sa fréquence. Pour effectuer cela, les fichiers gérant les paramètres d'acquisition (voir Figure 3-2) ont d'abord été modifiés pour définir cette nouvelle impulsion.

Le fichier `methode.xml` a ensuite été ajusté pour que les paramètres spécifiques à cette impulsion puissent être choisis par l'utilisateur dans l'éditeur de paramètres, notamment la forme de l'impulsion, la fréquence d'édition (en ppm) et la bande passante de l'impulsion. Les fichiers contrôlant les paramètres d'acquisition ont de nouveau été modifiés pour que l'impulsion d'édition soit mise à jour en fonction des modifications effectuées par l'utilisateur : calcul automatique de la puissance de l'impulsion, calcul de l'offset fréquentiel en Hz selon la fréquence de l'impulsion en ppm, etc.

Enfin, l'impulsion MEGA a été ajoutée au fichier `methode.ppg` (aussi appelé Pulse Program), aux deux endroits spécifiques visibles sur la Figure 3-3, permettant à la nouvelle impulsion de faire partie de la séquence d'acquisition.

De plus, une liste de fréquences a dû être définie pour les impulsions LASER. Lorsque l'impulsion MEGA a été ajoutée, l'incrément automatique dans la liste de fréquences permettant la sélection du volume ne fonctionnait plus comme initialement. Par conséquent, cette nouvelle liste a été créée afin de programmer l'incrément de la fréquence dans le Pulse Program après la première impulsion adiabatique « half-passage », puis après chaque paire d'impulsions adiabatiques.

3.2.1.2 Gradients/Spoilers

En plus des impulsions MEGA, les gradients de spoilers les entourant doivent être ajoutés également. Ces gradients sont arrangés d'une manière similaire à celle proposée à l'origine par Mescher & Garwood [83], comme réalisé dans Bogner et al. [97] (Figure 3-4) :

- Dans la direction de phase, un gradient après les deux impulsions MEGA ;
- Dans la direction de lecture, un gradient avant la première impulsion MEGA et un gradient après la deuxième ;
- Dans la direction de coupe, un gradient avant chaque impulsion MEGA.

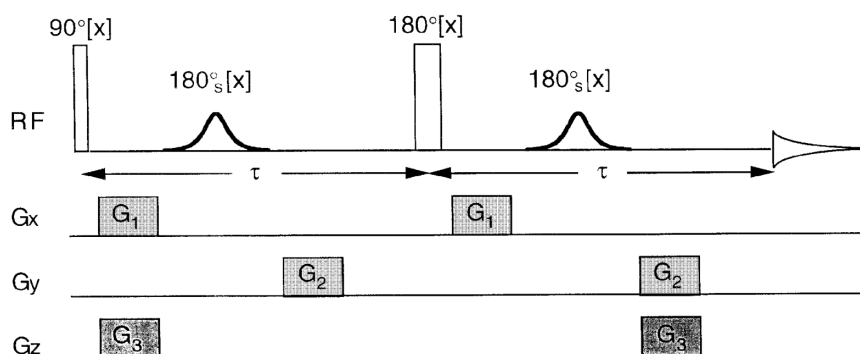


Figure 3-4. Les gradients de spoilers MEGA, indiqués par G₁, G₂ et G₃, dans une séquence d'écho de spin de Hahn [83].

Ainsi, comme pour l'impulsion MEGA, les gradients de spoilers MEGA ont d'abord été définis dans les paramètres d'acquisitions, puis ajoutés à l'éditeur de paramètres pour pouvoir être modifiés par l'utilisateur. Enfin, ils ont été ajoutés au Pulse Program, pour faire partie de la séquence d'acquisition.

3.2.1.3 Calcul du Temps d'Écho

Le temps d'écho est calculé en additionnant tous les éléments de la séquence d'acquisition situés entre la première impulsion et l'acquisition du signal. Puisque des impulsions et gradients ont été ajoutés à la séquence LASER pour obtenir la MEGA-LASER, il est indispensable de mettre à jour le calcul du temps d'écho. De plus, ce calcul doit respecter les échos créés après chaque impulsion, comme illustré Figure 3-5.

Une partie importante du travail concernant le temps d'écho est le fait qu'il doit pouvoir être modifiable par l'utilisateur. Dans notre projet, le TE doit être de 68 ms car nous souhaitons éditer le GABA. Or la méthode MEGA-LASER pourrait être utilisée pour éditer le GABA dans d'autres conditions, comme effectué par Andreychenko et al. [98] et Völzke et al. [114] à un TE de 74 ms, ou d'autres métabolites nécessitant un TE différent.

Pour permettre cela, et dans n'importe quelle méthode d'acquisition, des délais sont définis dans les fichiers gérant les paramètres d'acquisitions, puis ajoutés dans le Pulse Program (voir Figure 3-2) autour de chaque impulsion. Pour la LASER, la séquence est divisée en douze parties égales, représentées sur la Figure 3-5 A par les doubles flèches en rouge. Pour chaque partie, un délai est ajouté dans le Pulse Program. Ces douze délais ont la même valeur et sont mis à jour en fonction du TE choisit par l'utilisateur.

Pour la MEGA-LASER, les deux impulsions d'édition supplémentaires dans la séquence d'acquisition, plus longues que les impulsions LASER, complexifient le calcul de ces délais. Quatre délais supplémentaires ont été ajoutés, autour des deux impulsions d'édition, et les calculs de ces délais sont différents de ceux disposés autour des impulsions LASER.

En résumé, l'ajustement du TE est essentiel pour toute méthode, mais il nécessite un calcul complexe. Pour la méthode MEGA-LASER, cela a été réalisé en ajoutant des délais autour des impulsions d'édition, qui sont mis à jour en fonction du TE choisit par l'utilisateur.

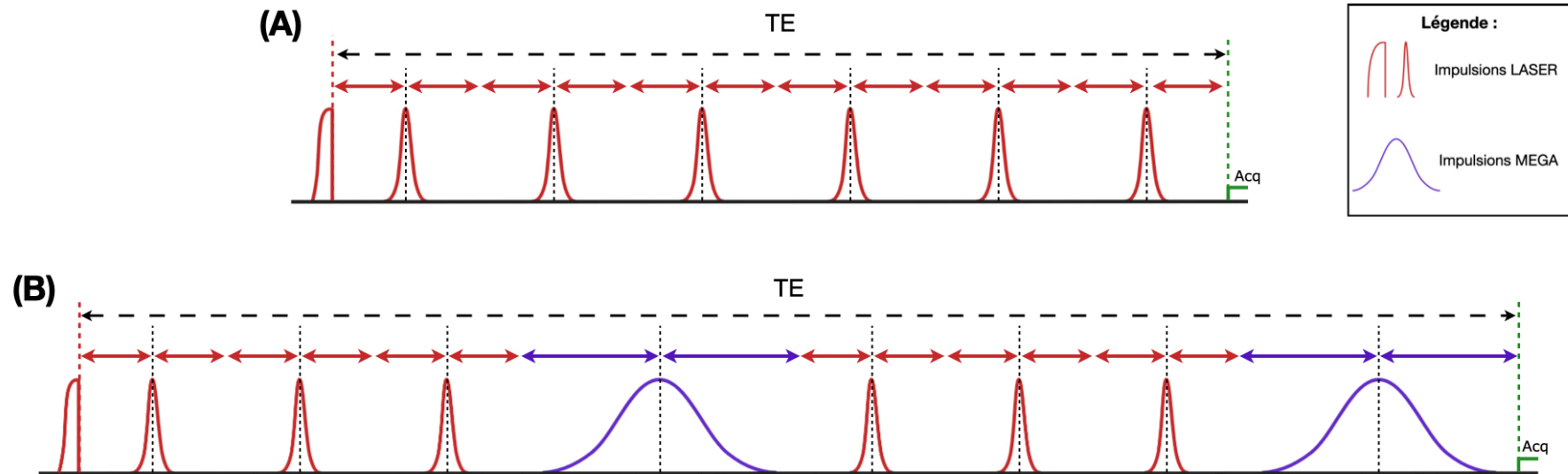


Figure 3-5. Schéma pour l'équilibrage du temps d'écho dans les séquences LASER (A) et MEGA-LASER (B). Chaque flèche de même couleur représente une même durée.

3.2.1.4 ON et OFF entrelacées

L'acquisition de données avec édition ON suivie d'une autre acquisition avec édition OFF est possible. Cependant, beaucoup de paramètres peuvent évoluer pendant une acquisition, entre le métabolisme de la souris, et l'évolution des paramètres physiologiques comme la fréquence de respiration par exemple, et le champ magnétique B_0 . Tous ces changements peuvent amener à une accumulation d'erreurs, notamment lors du prétraitement des données et du calcul de la différence ON - OFF. Afin de minimiser ces erreurs, une unique acquisition peut être réalisée en entrelaçant les éditions ON et OFF.

Pour la méthode MEGA-PRESS simple-voxel, un module spécifique avait été développé par Wafae Labriji [5] pour obtenir cela. Il a donc été utilisé de la même manière dans la méthode MEGA-LASER simple-voxel, et le Pulse Program a été modifié pour correspondre au fonctionnement de ce module. De plus, puisque cette méthode implique les deux fréquences d'édition ON et OFF, une liste a été créée en tant que paramètres d'acquisition, et contient les deux valeurs de fréquences d'édition en ppm. Ces deux valeurs ont été ajoutées au fichier `methode.xml`, permettant à l'utilisateur de modifier ces deux fréquences en fonction du métabolite à éditer.

En résumé, pour minimiser les erreurs lors de l'acquisition, la méthode MEGA-LASER développée intègre les acquisitions ON et OFF entrelacées, et les fréquences d'édition sont modifiables dans l'éditeur de paramètres.

3.2.1.5 Affichage sur l'interface de ParaVision

Comme expliqué précédemment, les différents paramètres de l'impulsion MEGA, notamment les offsets, l'angle de bascule et la largeur de bande, doivent être modifiables facilement et rapidement par l'utilisateur en fonction des besoins, dans l'interface de ParaVision. Pour cela, le fichier `methode.xml` a été modifié. Les Offsets ON et OFF et la bande passante de l'impulsion MEGA peuvent être ajustées dans l'onglet « Preparation », illustré Figure 3-6. Dans l'onglet « Sequence », les paramètres des impulsions MEGA et LASER peuvent être choisies, et la longueur et l'amplitude des spoilers peuvent être ajustées.

Les impulsions LASER ont une forme particulière qui n'est pas incluse dans ParaVision : la première adiabatique « Half Passage » et les 3 paires adiabatiques « Full Passage ». Ces formes d'impulsions ont été fournies par Julien Valette avec la séquence LASER simple-voxel, et elles doivent être sélectionnées dans l'onglet « Sequence ».

Avec ces modifications, lors de l'utilisation de cette méthode, les différents paramètres spécifiques à la méthode MEGA-LASER peuvent être modifiés facilement par l'utilisateur dans l'interface de ParaVision.

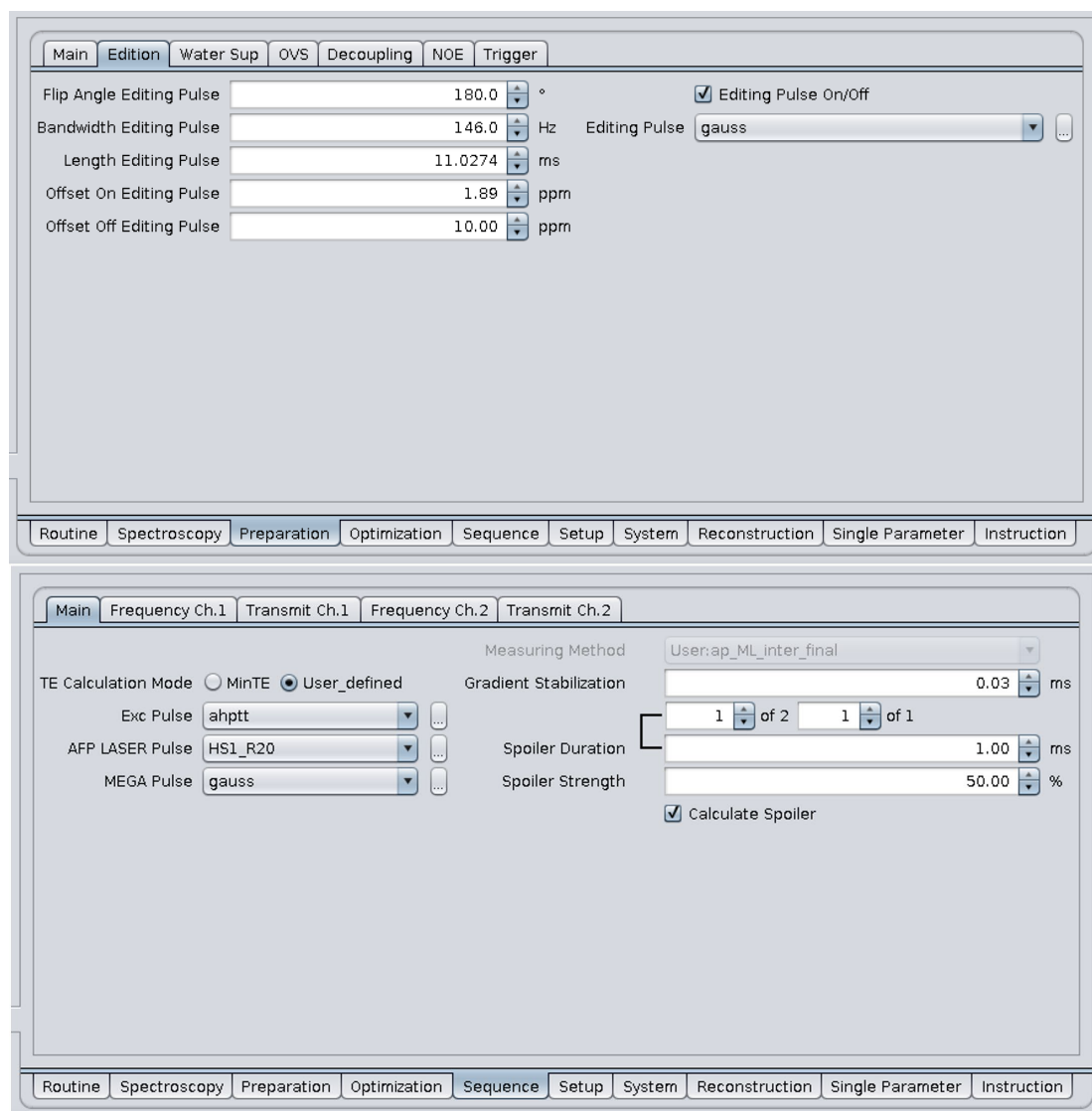


Figure 3-6. Onglets de la méthode MEGA-LASER simple-voxel dans l'interface de ParaVision 7.0. Dans l'onglet « Preparation », il est possible de modifier les différents paramètres de l'impulsion d'édition MEGA : angle de basculement, largeur de l'impulsion, type d'impulsion (ici gaussienne) et offsets des fréquences ON et OFF pour l'édition. Dans l'onglet « Sequence », on retrouve le type de l'impulsion MEGA, mais également l'impulsion d'excitation Half-passage « ahptt » et les impulsions adiabatiques Full-passage « HS1_R20 ». C'est également dans cet onglet que les spoilers sont paramétrés

3.2.1.6 Schéma récapitulatif

Sur le schéma récapitulatif ci-dessous, les impulsions LASER sont retrouvées en rouge et les impulsions d'édition MEGA en violet. Tous les gradients sont également indiqués avec leurs numéros spécifiques. Tout à gauche, les différents délais sont notés, avec notamment p1, p2 et p3 qui correspondent aux longueurs des impulsions LASER et MEGA. Les délais « d » notés en noir correspondent aux durées des gradients, au temps de stabilisation des gradients ou au temps de montée des gradients. Les délais « d » notés en violet correspondent quant à eux aux délais recalculés pour que le temps d'écho corresponde à celui choisi par l'utilisateur.

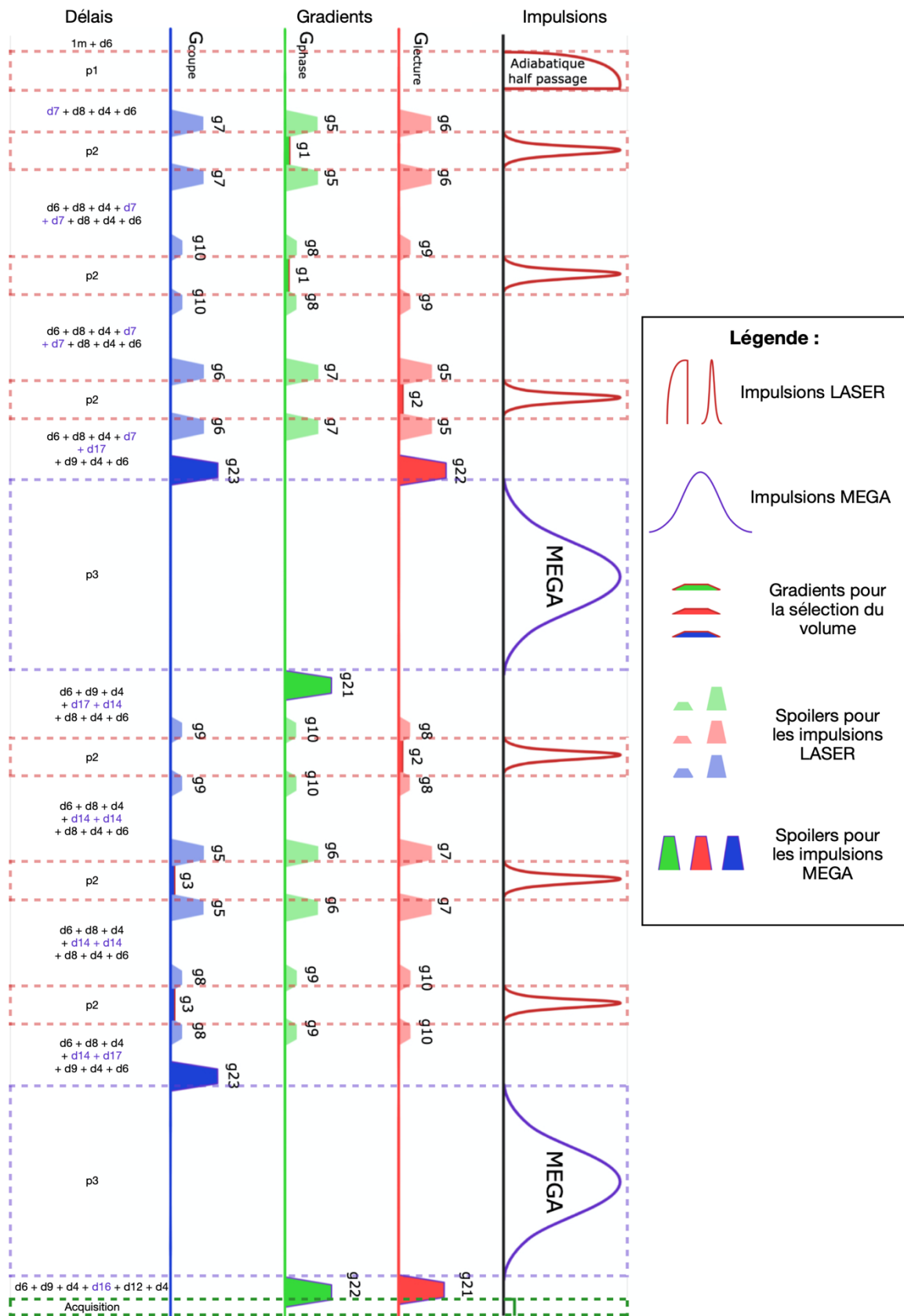


Figure 3-7. Séquence MEGA-LASER simple-voxel, avec les gradients et les délais correspondants.

3.2.2 Tests sur fantômes

Tout au long du développement de la méthode, des fantômes homogènes ont été utilisés. Nous avons opté pour des tubes Falcon de 15 mL, en raison de leur diamètre similaire à la taille de la tête d'une souris, ce qui a permis d'utiliser la cryosonde en tant qu'antenne de surface pour la réception du signal, comme lors des acquisitions *in vivo* sur souris.

Fantôme	GABA	GLX (= 50% GLU + 50% GLN)	NAA	CR	CHO
1	5 mM	25 mM	5 mM	25 mM	10 mM
2	10 mM	20 mM	10 mM	20 mM	10 mM
3	15 mM	15 mM	15 mM	15 mM	10 mM
4	20 mM	10 mM	20 mM	10 mM	10 mM
5	25 mM	5 mM	25 mM	5 mM	10 mM

Figure 3-8. Tableau indiquant les compositions en métabolites des gels agar des 5 fantômes de 15 mL fabriqués.

Le fantôme n°1 a été utilisé pour valider la version finale de la méthode MEGA-LASER simple-voxel et pour comparer ses performances avec celle de la MEGA-PRESS.

Pour commencer, la puissance des impulsions adiabatiques a été ajustée car celle-ci n'est pas calculée automatiquement. Cela concerne les paires d'impulsions adiabatiques « Full Passage » mais aussi la première impulsion excitatrice adiabatique « Half Passage ». Cette calibration consiste à augmenter progressivement la puissance des impulsions en mode « Setup » avec la séquence sans suppression d'eau. Lorsque l'intensité du signal de l'eau atteint un plateau malgré l'augmentation de la puissance des impulsions, cela signifie que le régime adiabatique est atteint. Cette puissance seuil est donc notée, mais une puissance 20 à 30% supérieure est choisie pour garantir ce régime adiabatique en toute circonstance (par exemple si l'antenne est moins bien accordée). Pour nos acquisitions sur l'IRM 9,4 T, la puissance de l'impulsion Half Passage est de 100 W, et de 590 W pour les impulsions Full Passage HS1, pour une largeur de bande de respectivement 5 et 10 kHz.

Ce sont les impulsions Full Passage qui permettent la sélection du volume dans la séquence LASER, et la largeur de bande de ces dernières permet de minimiser les CSDE. Pour comparer à la MEGA-PRESS, la bande passante des impulsions de sélection du volume utilisées était de 3420 Hz. Ainsi, à 9,4T, selon l'équation décrite dans la section 2.2.3.5, les CSDE sont de 19,9% pour le GABA et 11,7% pour le GLX avec la méthode de localisation PRESS, contre seulement 6,8% et 4% respectivement avec la méthode LASER.

Ensuite, nous avons déterminé les paramètres de l'impulsion d'édition. La méthode de localisation LASER, avec ses 7 impulsions, limite la longueur des impulsions d'édition et donc leur précision. Dans l'équipe, Hamelin et al. [5] ont utilisé une impulsion d'édition avec une largeur de bande de 146 Hz (0,365 ppm à 9,4 T). Pour reproduire cela, et pouvoir ensuite comparer les méthodes MEGA-PRESS et MEGA-LASER, la forme gaussienne a été sélectionnée comme expliqué dans Bogner et al. [97]. Cette forme permet d'utiliser la méthode d'édition MEGA-LASER avec une largeur de bande de 146 Hz tout en conservant le TE à 68 ms.

Pour traiter les données MEGA-PRESS, le programme JET a été utilisé comme dans la publication Hamelin et al. [39], et pour les données MEGA-LASER, ce même programme JET a été utilisé avec quelques modifications expliquées en détail dans le chapitre 4.

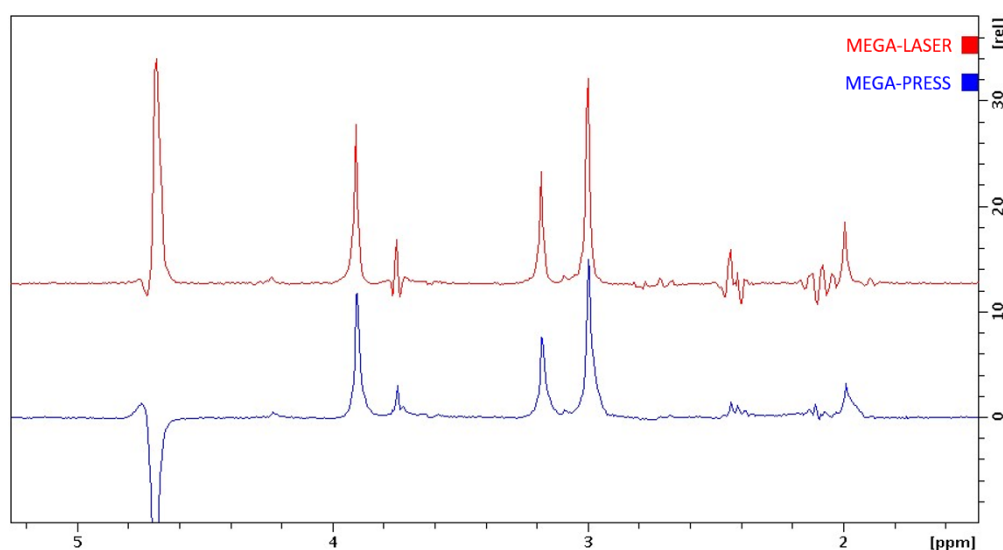


Figure 3-9. Visualisation dans Topspin des spectres OFF acquis sur le fantôme n°1 avec les séquences MEGA-PRESS (bleu) et MEGA-LASER (rouge) simple-voxel.

Acquisitions : 9,4 T, Antenne volumique en quadrature de 68 mm de diamètre intérieur pour l'émission, cryosonde à 4 canaux pour la réception, Voxel = 3x3x3 mm³, TE/TR = 68/2000 ms, 128 moyennages, édition ON/OFF = 1,89/10 ppm, largeur de bande de l'impulsion d'édition = 146 Hz.

Le SNR a été calculé dans le logiciel Topspin pour les deux acquisitions, sur le spectre OFF, et en prenant le pic de la Choline pour le signal (3,1 à 3,3 ppm) et le bruit de 7 à 10 ppm. Pour la MEGA-PRESS, le SNR est de 114,52, alors qu'il est de 156,37 pour la MEGA-LASER. Ainsi, il y a une augmentation de 36,5 % du SNR avec la MEGA-LASER. De plus, sur la Figure 3-9, on peut remarquer une meilleure résolution spectrale avec la MEGA-LASER, notamment les pics du GABA à 1,89 et 2,3 ppm et du GLX à 2,1, 2,3 et 3,7 ppm, J modulés à 68 ms. Les largeurs à mi-hauteur des pics du GLX à 3,75 ppm et du GABA à 3 ppm ont été mesurées sur le spectre Différence : pour la MEGA-PRESS, $FWHM_{GLX} = 41$ Hz / $FWHM_{GABA} = 32,8$ Hz, et pour la MEGA-LASER $FWHM_{GLX} = 32$ Hz / $FWHM_{GABA} = 23,1$ Hz. Ces mesures confirment l'augmentation de la résolution spectrale.

Ensuite, la performance du programme JET a été évaluée pour le traitement des données, en rajoutant les fantômes 2 à 5 de la Figure 3-8, avec des concentrations différentes de métabolites à l'exception de la Choline, qui reste constante.

La quantification effectuée dans le programme JET permet d'obtenir les valeurs d'amplitude de chaque pic. La Choline est ensuite utilisée comme référence pour normaliser les amplitudes des autres métabolites, ce qui permet de comparer les résultats entre les différents fantômes.

Les concentrations de NAA et de GABA augmentent des fantômes 1 à 5 ; et inversement pour la Créatine et le GLX. Nous retrouvons bien cela sur la Figure 3-10, qui illustre la quantification obtenue avec JET des 5 fantômes. Ainsi, les résultats obtenus après normalisation avec la Choline montrent une forte corrélation entre les concentrations théoriques des métabolites et les ratios respectifs. Cette corrélation est illustrée par la courbe de tendance linéaire, qui présente un coefficient de détermination (R^2) d'environ 0,97 pour les ratios GABA/CHO, NAA/CHO et CR/CHO. Cela signifie que nos mesures sont cohérentes et fiables, à l'exception du ratio GLX/CHO qui présente un R^2 légèrement plus bas.

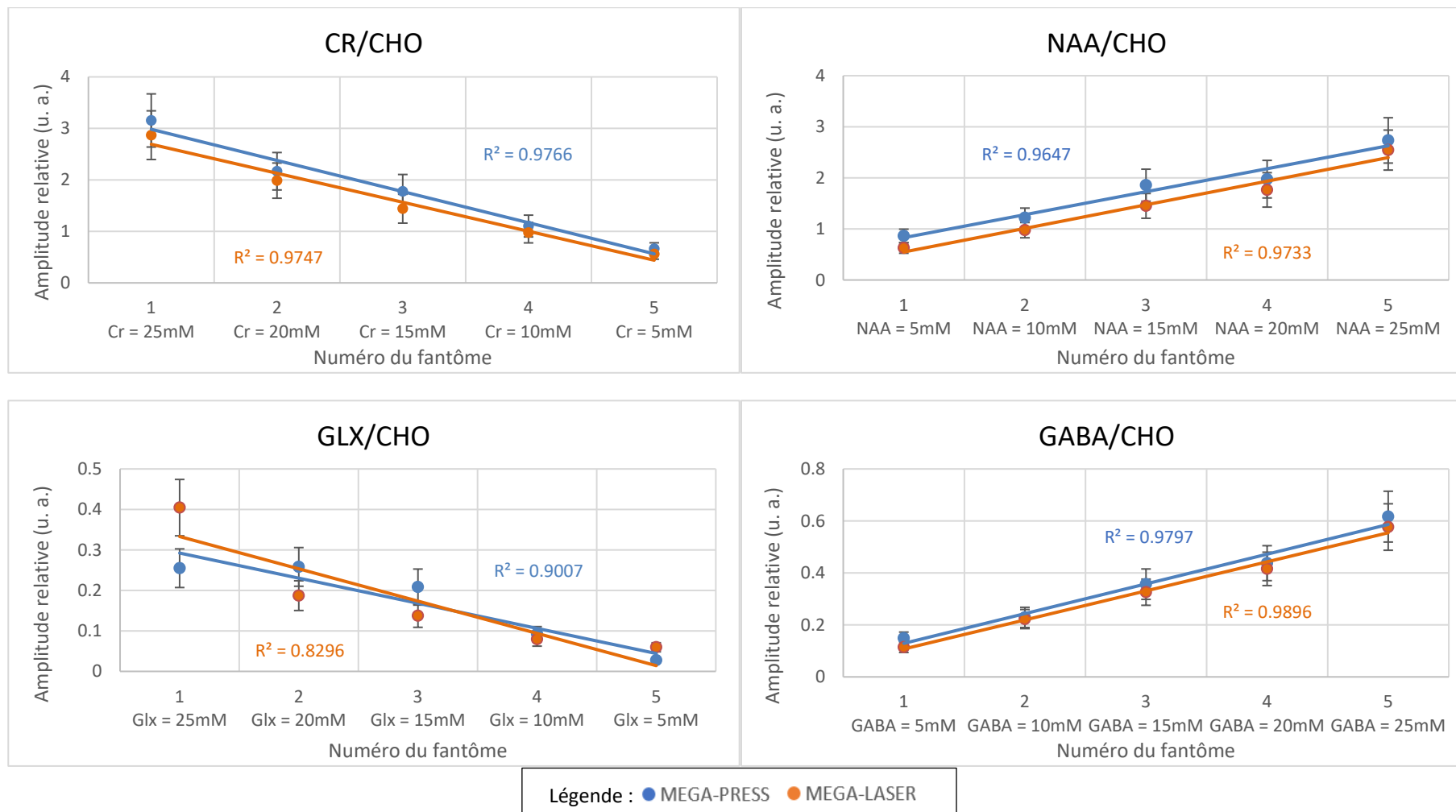


Figure 3-10. Amplitudes de la CR, du NAA, du GLX et du GABA, normalisés par l'amplitude de la CHO, obtenues avec le processing de JET, pour les 5 fantômes et avec les méthodes MEGA-PRESS et MEGA-LASER simple-voxel.

3.2.3 Tests sur souris

Après avoir validé les acquisitions sur fantômes, la nouvelle méthode a été testée *in vivo*, sur souris. Pour cela, le même protocole précédemment utilisé pour les acquisitions MEGA-PRESS simple-voxel [5] a été utilisé, en remplaçant seulement la PRESS à temps d'écho court par la LASER, et la MEGA-PRESS par la MEGA-LASER. Le protocole (1h35 d'acquisition environ) comprend :

1. Localizer.
2. Acquisition de la carte B_0 .
3. Acquisition d'une image anatomique pondérée en T2 : TE/TR = 36/2500 ms, moyennages = 8, FOV = 16 x 16 mm, nombre de coupes = 21, épaisseur de coupe = 0,4 mm.
4. Sélection du voxel dans l'hippocampe ipsilatéral avec une séquence PRESS simple-voxel puis calcul du Map shim sur ce volume : $2 \times 1 \times 2 \text{ mm}^3$.
5. Local shim sur ce même volume à l'aide d'une deuxième séquence PRESS simple-voxel.
6. Acquisition d'un spectre non édité à temps d'écho court : séquence LASER, TE/TR = 25/2000 ms, 256 moyennages, 8 min 32 secondes d'acquisition.
7. Séquence MEGA-LASER simple-voxel : TE/TR = 68/2000 ms, 512 moyennages (512 ON et 512 OFF), 34 min 8 secondes d'acquisition.

Lors des premières acquisitions sur souris, nous avons observé des artefacts sur les spectres des acquisitions LASER (Figure 3-11). Pour les supprimer, l'amplitude des spoilers a été augmentée de 25 % à 50 %, en gardant une durée de 1 ms.

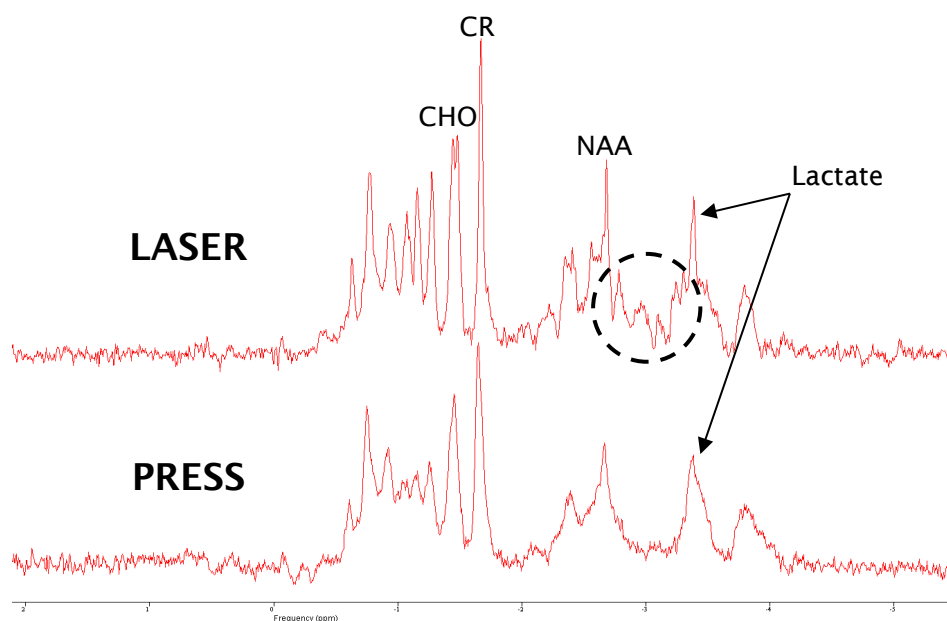


Figure 3-11. Exemple de deux acquisitions PRESS et LASER aux mêmes TE/TR (25/2000 ms). Pour la LASER, les spoilers étaient de 25% pendant 1 ms et des artefacts visibles sur le spectre obtenu sont entourés.

Les acquisitions MEGA-PRESS et MEGA-LASER ont été effectuées à quelques jours d'intervalle sur un total de 7 souris KA-MTLE et 5 souris SHAM. La Figure 3-12 présente les résultats obtenus avec ces deux méthodes. Ces résultats confirment que l'augmentation d'environ 100% du ratio GABA+/GLX, chez les souris KA-MTLE par rapport aux souris SHAM [5], peut être mesurée à la fois par la méthode MEGA-PRESS et par la MEGA-LASER.

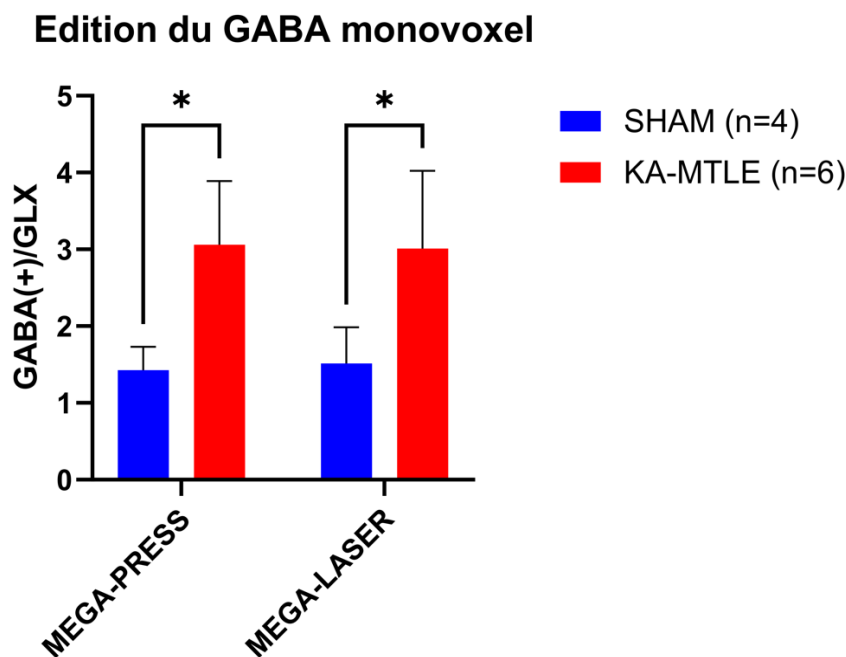


Figure 3-12. Comparaison du ratio GABA+/GLX entre les souris KA-MTLE (n = 7) et SHAM (n = 5), obtenus avec les séquences MEGA-PRESS et MEGA-LASER simple-voxel et traités avec le programme JET. * $P < 0,05$ Test Mann-Withney avec correction pour comparaisons multiples Holm-Šidák,

Acquisition : 9,4 T, Antenne volumique en quadrature de 68 mm de diamètre intérieur pour l'émission, Cryosonde à 4 canaux pour la réception, TE/TR = 68/2000 ms, voxel = $2 \times 1 \times 2 \text{ mm}^3$, édition entrelacée ON/OFF = 1,89/10 ppm, largeur de bande de l'impulsion d'édition = 146 Hz, 35 min d'acquisition.

3.3 CSI MEGA-LASER

3.3.1 Développement de la méthode

Tout d'abord, il est nécessaire de définir les termes utilisés en imagerie spectroscopique :

- La matrice de voxels ou matrice d'acquisition : détermine le nombre de voxels acquis et peut être en 2D ou 3D ;
- Le FOV : taille totale de la matrice d'acquisition et permet de déterminer la résolution spatiale des voxels (ex : pour un FOV $16 \times 16 \times 2 \text{ mm}^3$ et une matrice 2D 8×8 , les voxels auront une résolution de $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$) ;
- Le « voxel d'intérêt » : zone d'intérêt sélectionnée par la méthode de localisation, plus grande qu'un seul voxel de la matrice d'acquisition. Sa position est limitée par le FOV.

Dans ParaVision, la structure des méthodes d'imagerie spectroscopique est la même que pour la spectroscopie simple-voxel (Figure 3-2). Mais, puisqu'il s'agit d'acquérir une matrice de voxels, des paramètres de localisation supplémentaires sont nécessaires, complexifiant le développement par rapport à une méthode de spectroscopie simple-voxel. De plus, l'acquisition est beaucoup plus longue dans le cas de l'imagerie spectroscopique, et des outils de visualisation spécifiques sont nécessaires. Dans ParaVision, Image Display permet de visualiser les données d'imagerie spectroscopique, mais de manière très sommaire (spectres affichés en valeur absolue, et ne permet aucun traitement des données). En parallèle du développement de cette méthode d'imagerie spectroscopique, nous avons collaboré avec Yann Le Fur sur son logiciel CSIApy (Python), pour permettre la visualisation des données. Dans le même temps, un travail sur le programme JET (Matlab) a aussi été effectué pour que les données puissent être traitées de la même manière qu'en simple-voxel. Cependant, pour pouvoir lire les données dans JET, CSIApy a aussi été modifié pour exporter les données dans un format compatible avec Matlab. Le développement de ces outils est expliqué plus en détail dans le chapitre suivant.

La programmation de la méthode CSI MEGA-LASER a été divisée en 2 étapes. La séquence CSI PRESS est fournie par Bruker dans ParaVision. C'est donc à partir de celle-ci que la CSI LASER puis la CSI MEGA-LASER ont été programmées, comme illustré dans la Figure 3-13.

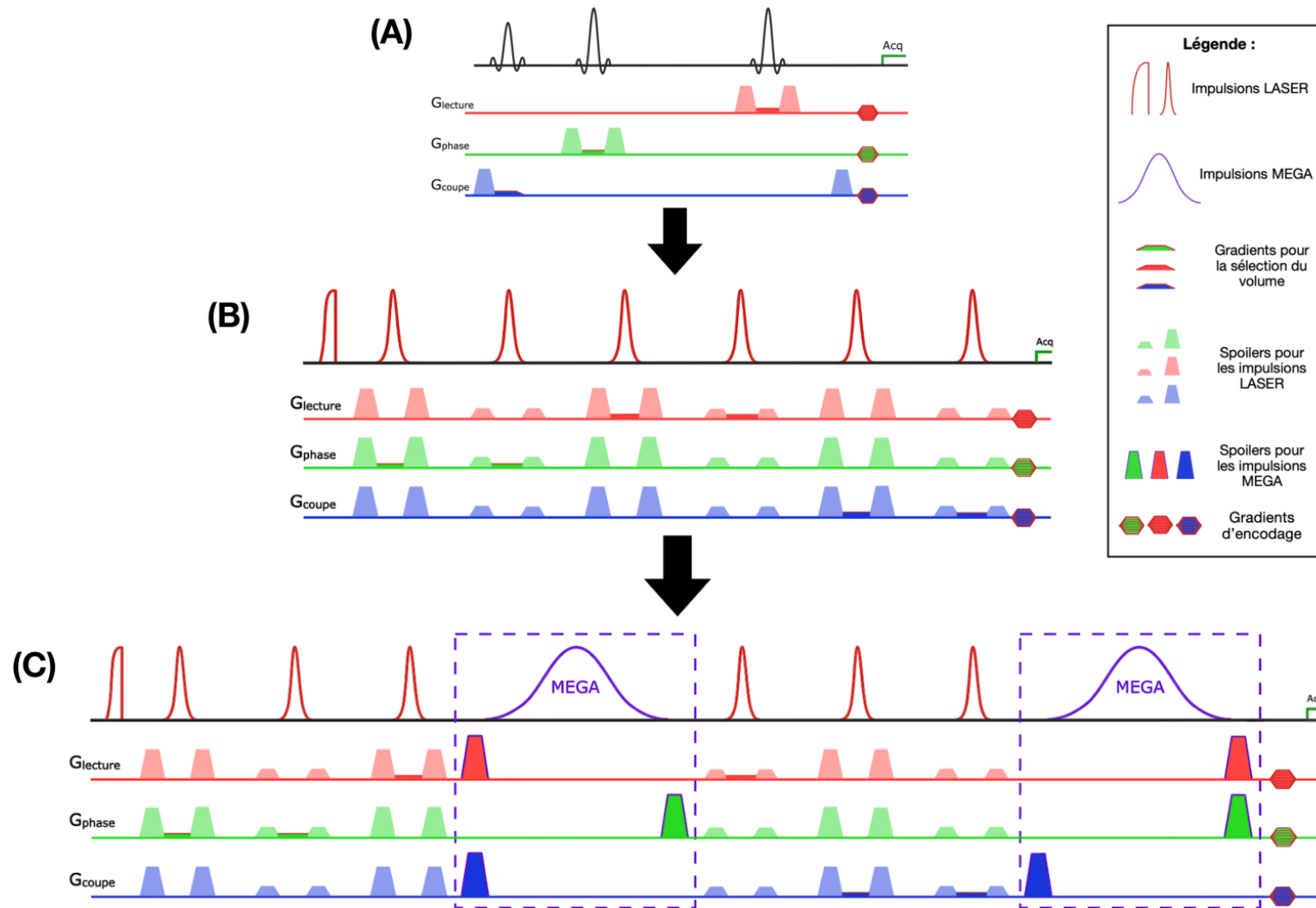


Figure 3-13. Schéma montrant les étapes du développement, de la CSI PRESS (A) disponible dans Paravision, à la CSI LASER (B) en remplaçant les impulsions de sélection du volume et les gradients associés, puis vers la CSI MEGA-LASER (C) en ajoutant le module d'édition MEGA comprenant 2 impulsions et 6 gradients de spoilers.

3.3.1.1 De la CSI PRESS à la CSI LASER

La première étape se fait à partir de la CSI PRESS. La séquence PRESS possède trois impulsions : une première excitatrice avec un angle de bascule de 90° , et deux suivantes de refocalisation à 180° . La LASER est composée d'une impulsion excitatrice adiabatique « Half Passage » puis de 3 paires d'impulsions adiabatiques « Full Passage ».

Pour passer de l'impulsion excitatrice de la méthode PRESS à l'impulsion Half Passage de la LASER, les fichiers contrôlant les paramètres d'acquisition n'ont pas nécessité de modifications. Les changements se font par la suite lors de l'acquisition dans l'interface utilisateur.

Pour les deux impulsions de refocalisation de la séquence PRESS, elles sont identiques et définies comme une unique impulsion dans les paramètres d'acquisitions, mais utilisée à deux reprises dans la séquence d'acquisition (Figure 3-2). Puisque la séquence LASER possède trois paires d'impulsions adiabatiques ayant les mêmes caractéristiques, il n'est pas nécessaire de définir de nouveaux paramètres pour ces impulsions. Les impulsions de refocalisation PRESS ont simplement été dupliquées dans le Pulse Program pour obtenir les six impulsions.

Le fichier méthode.xml a ensuite été modifié pour pouvoir sélectionner le type d'impulsion dans l'interface graphique : comme expliqué dans la section 3.2.1.1, pour utiliser les méthodes avec des impulsions adiabatiques, il est nécessaire de sélectionner la forme des impulsions dans l'éditeur de paramètres.

Ensuite, il est nécessaire d'associer les gradients de sélection de coupe et les spoilers à ces nouvelles impulsions. La séquence PRESS comprend trois gradients de coupes correspondant aux trois directions, et des spoilers autour de chaque impulsion. La plupart des ajustements apportés aux gradients ont été réalisés dans le Pulse Program, car les gradients préexistants ont été déplacés et/ou dupliqués, selon la Figure 3-13 (A et B) :

- Au sein de chaque paire d'impulsions, le gradient de sélection de coupe est le même, donc ces gradients ont été dupliqué et déplacés pour obtenir les 3 paires dans les trois directions de coupe ;
- Pour les spoilers, ceux autour de la première impulsion de chaque paire sont les mêmes que dans la séquence PRESS. Pour les suivants, autour de la deuxième impulsion de chaque paire, ils sont 3 fois plus faibles que ceux autour de la première. Ces gradients ont été définis dans les paramètres d'acquisitions avant d'être ajoutés dans la séquence d'acquisition.

Par ailleurs, comme pour toute modification d'une méthode, le calcul du TE a été actualisé, comme expliqué section 3.2.1.3 avec la Figure 3-5.

3.3.1.2 De la CSI LASER à la CSI MEGA-LASER

Après avoir programmé la CSI LASER, et vérifié son bon fonctionnement via des tests sur fantômes (voir partie 3.3.2), nous avons programmé la séquence CSI MEGA-LASER.

Tout d'abord, nous avons commencé avec une seule fréquence d'édition, donc sans éditions ON et OFF entrelacées. En utilisant la CSI LASER, les deux impulsions d'édition, avec les gradients associés, ont été rajoutées pour obtenir la CSI MEGA-LASER. Cela a été fait de manière très similaire au développement de la LASER vers la MEGA-LASER simple-voxel, expliqué précédemment. Cependant, les méthodes d'imagerie spectroscopique ont des paramètres possédant des noms différents des méthodes simple-voxel, mais aussi des paramètres supplémentaires pour l'encodage spatial par exemple. Ainsi, tous les calculs de temps d'écho, mais aussi de délais permettant de respecter le TE choisit par l'utilisateur, ont dû être reformulés pour correspondre à cette nouvelle séquence. Enfin, pour valider cette première méthode CSI MEGA-LASER, des tests sur fantôme ont été effectués pour vérifier que la localisation soit correcte, le calcul de temps d'écho, l'efficacité de l'édition, etc.

L'étape suivante était d'implémenter les acquisitions ON et OFF entrelacées. Le module SegMegaPress.mod permettait pour les méthodes MEGA-PRESS et MEGA-LASER simple-voxel d'obtenir cela. Des modifications de ce module et du Pulse Program, ont été nécessaires afin d'obtenir la séquence CSI MEGA-LASER finale avec l'édition entrelacée.

3.3.2 Tests sur fantômes

3.3.2.1 Localisation

Tout d'abord, un fantôme homogène de forme spécifique a été fabriqué afin de valider la localisation de la séquence CSI LASER dans un premier temps, puis de la CSI MEGA-LASER. Il a également été utilisé pour vérifier le bon fonctionnement de la suppression de l'eau lors des acquisitions avec ces méthodes.

- L'acquisition d'un volume homogène : au centre du fantôme, permet d'évaluer si la sélection du volume est correcte, mais est également la première étape pour vérifier si la visualisation est correcte également. La Figure 3-14 montre le voxel sélectionné en rouge sur l'image pondéré en T2, et la carte CSI acquise avec la séquence CSI MEGA-LASER sans suppression de l'eau. La carte obtenue est bien homogène et correspond au voxel d'intérêt sélectionné.

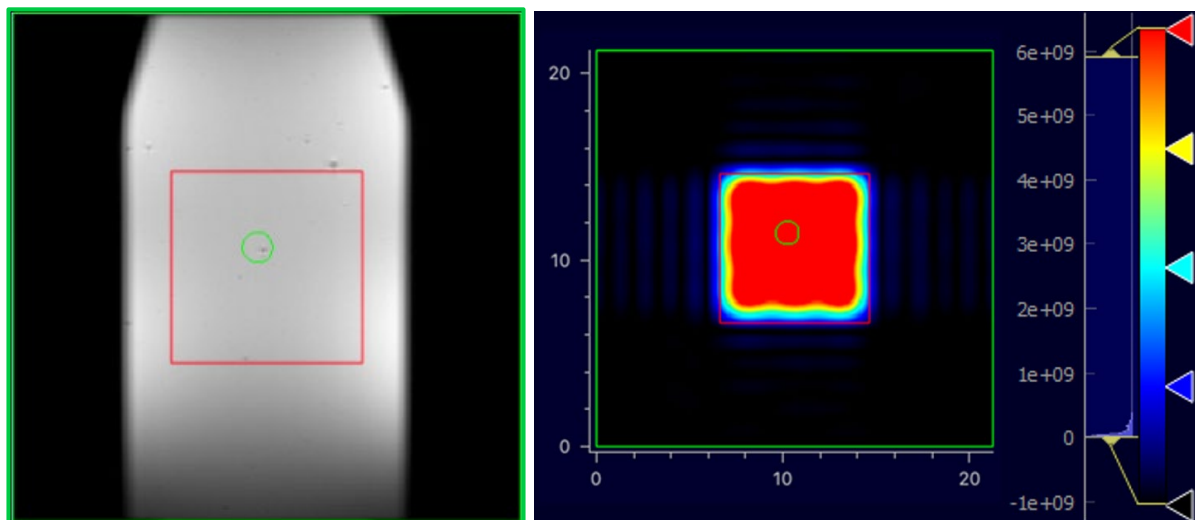


Figure 3-14. Gauche : Image pondéré en T2 possédant le même FOV que la CSI MEGA-LASER. Droite : Carte CSI obtenue avec la MEGA-LASER sans suppression de l'eau, après correction par JET, affichée dans CSIApy.

Le voxel d'intérêt est indiqué en rouge et le FOV en vert.

Acquisitions : 9,4 T, Antenne volumique en quadrature de 68 mm de diamètre intérieur pour l'émission, cryosonde à 4 canaux pour la réception, FOV = 21,25x21,25x1,25 mm³, Voxel d'intérêt = 7,5x7,5 mm², Matrice = 17x17, TE/TR = 68/2000 ms, 19 min d'acquisition.

- L'acquisition d'un volume inhomogène : sélection d'un volume asymétrique, situé ici sur l'extrémité du fantôme, permet d'évaluer si la sélection du volume d'intérêt par la séquence CSI n'est pas retournée ou inversée par rapport à l'image anatomique. C'est aussi une étape essentielle pour confirmer les outils de visualisation, ici CSIApy. Il peut y avoir des inversions droite/gauche et/ou haut/bas entre l'image anatomique et la carte métabolique, qui ne sont pas visible lors d'acquisition d'un volume homogène. La Figure 3-15 montre le voxel sélectionné en rouge sur l'image pondéré en T2, et la carte CSI acquise avec la séquence CSI MEGA-LASER sans suppression de l'eau. La carte obtenue montre un profil asymétrique, qui correspond bien à l'image anatomique du fantôme.

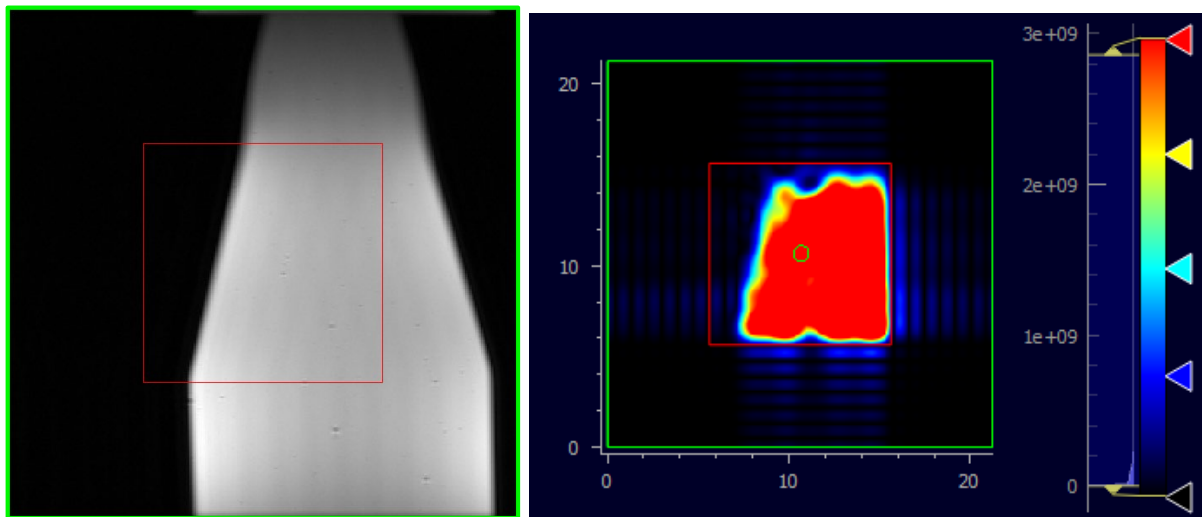


Figure 3-15. Gauche : Image pondéré en T2 possédant le même FOV que la CSI MEGA-LASER. Le voxel d'intérêt est indiqué en rouge.

Droite : Carte CSI obtenue avec la MEGA-LASER sans suppression de l'eau, après correction par JET, affichée dans CSIApy. On y retrouve en rouge le voxel d'intérêt.

Acquisitions : 9,4 T, Antenne volumique en quadrature de 68 mm de diamètre intérieur pour l'émission, cryosonde à 4 canaux pour la réception, FOV = 21,25x21,25x1,25 mm³, Voxel d'intérêt = 7,5x7,5 mm², Matrice = 17x17, TE/TR = 68/2000 ms, 19 min d'acquisition.

En conclusion, l'utilisation d'un fantôme homogène de forme spécifique a permis de valider la sélection du volume par la méthode de localisation LASER, mais aussi la visualisation des premières données d'imagerie spectroscopique dans l'outil CSIApy.

3.3.2.2 Efficacité de l'édition

Après la validation de la localisation, nous avons vérifié si le calcul de la fréquence d'édition en Hertz, en fonction du déplacement chimique en ppm choisi par l'utilisateur dans l'éditeur de paramètres, était correct. Pour cela, l'impulsion d'édition a simplement été ajustée sur le pic de l'eau, c'est-à-dire à 4,7 ppm, ce qui a conduit à la suppression du signal de l'eau. Cette première étape nous a permis de confirmer la bonne sélection de fréquence par l'impulsion d'édition.

Ensuite, il était important d'évaluer l'efficacité de cette édition, c'est-à-dire vérifier que l'impulsion d'édition soit appliquée à la bonne fréquence malgré les problèmes de déplacements chimiques (CSDE, voir partie 2.2.3.5 et 2.2.3.6) au sein de la matrice d'acquisition. Pour évaluer cela, il était nécessaire d'utiliser des fantômes avec plusieurs compartiments aux concentrations différentes.

Tout d'abord, nous avons essayé de fabriquer des fantômes avec différents compartiments afin qu'ils puissent être utilisés dans des conditions similaires aux acquisitions *in vivo*, c'est-à-dire avec la cryosonde. L'utilisation de cette antenne surfacique limite considérablement la taille du fantôme qu'il est possible d'utiliser, puisque celui-ci doit avoir un diamètre similaire à la tête d'une souris. Dans un premier temps, nous avons fabriqué des fantômes avec deux gels agar de compositions métaboliques différentes, disposés sans séparation entre les gels agar (image de gauche sur la Figure 3-16). Cependant, nous avons constaté un transfert de métabolites entre les différents gels. Nous avons ensuite essayé de créer des compartiments avec des tubes Eppendorf (exemple avec l'image de droite sur la Figure 3-16), mais la paroi en plastique de ces tubes posait trop de problématiques notamment concernant la susceptibilité magnétique. Afin de minimiser l'influence de la paroi en plastique, nous avons décidé d'utiliser du film alimentaire pour séparer les gels. Mais cette approche conduisait à la présence importante de bulles d'air entre les compartiments, ce qui, une fois de plus, n'est pas favorable à l'obtention d'un shim correct pour nos acquisitions.

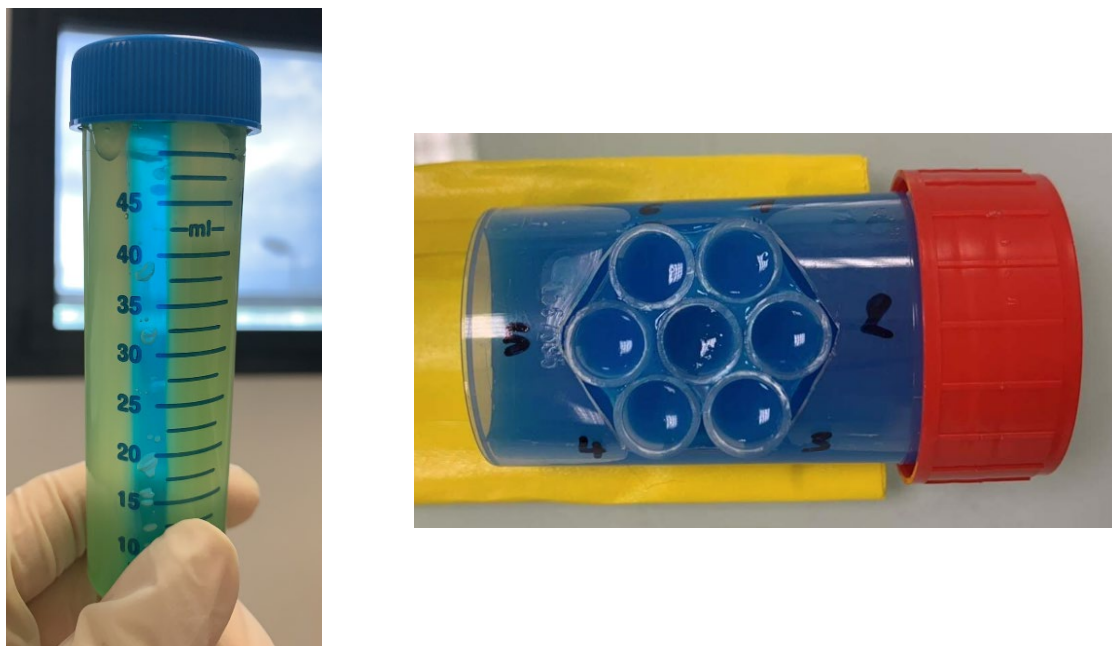


Figure 3-16. Exemple de différents fantômes multicompartiments développés.
Gauche : Fantôme avec deux compartiments différents formulés à partir de gel agar, disposés sans séparation. Ils sont différenciables grâce à leur couleur obtenue avec du colorant alimentaire.
Droite : Fantôme avec 7 compartiments fabriqués avec des tubes Eppendorf.

Nous avons alors opté pour 7 tubes RMN en verre de 10 mm placés dans un tube en plastique de 35 mm de diamètre. Cette configuration est présentée Figure 3-17 : le tube en plastique ainsi que chaque tube RMN ont été remplis du gel d'agar avec la composition détaillée dans la partie 3.1.2. Cependant, les tubes RMN contenaient également des métabolites avec la même concentration de NAA, CR et GLX (20 mM) et une concentration de GABA croissante entre les compartiments : 1 = 0 mM, 2 = 10 mM, 3 = 20 mM, 4 = 30 mM, 5 = 40 mM, 6 = 50 mM.

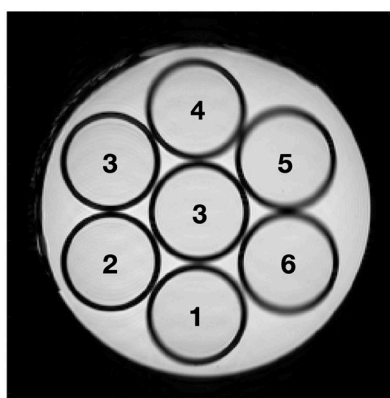


Figure 3-17. Image pondérée en T2 du fantôme multi compartiments, possédant le même FOV que l'acquisition CSI MEGA-LASER, avec le numéro de chaque compartiment.
Acquisition : 9,4 T, Antenne volumique en quadrature de 68 mm de diamètre intérieur pour l'émission et la réception ; TE/TR = 33/2500 ms, FOV = 39x39x4 mm³, Résolution = 0,152x0,152x4 mm³.

Le diamètre de ce fantôme était de 35 mm donc les acquisitions ont été effectuées sans la crysonde, avec uniquement l'antenne volumique en quadrature de 68 mm de diamètre intérieur. La Figure 3-18 montre les résultats obtenus avec l'acquisition CSI MEGA-LASER après prétraitement et quantification par le programme JET. On peut observer une amplitude relative homogène du NAA et du GLX, en accord avec leur concentration constante dans les différents compartiments. Pour le GABA, la quantification reflète bien l'augmentation de sa concentration entre les différents compartiments. La Figure 3-19 confirme cette augmentation de GABA, et montre une forte corrélation entre les concentrations théoriques et mesurées dans chaque compartiment. Ces résultats confirment notre protocole d'acquisition pour la CSI MEGA-LASER, mais également le traitement des données effectué avec CSIAPy et JET. Des spectres différence provenant des 6 compartiments extérieurs de ce fantôme sont visibles Figure 3-20.

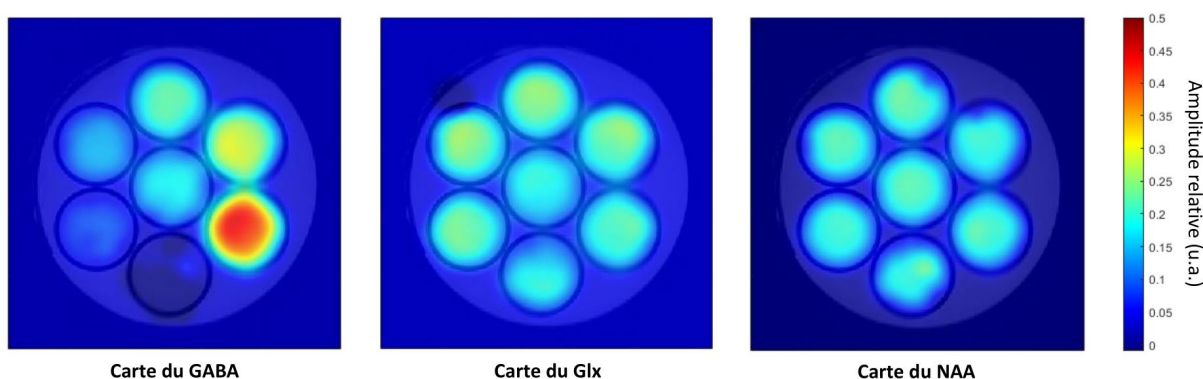


Figure 3-18. Cartes du GABA, GLX et NAA, obtenues après traitement (pré-processing et quantification) par JET, superposées à l'image pondéré en T2.

Acquisition : 9,4 T, Antenne volumique en quadrature de 68 mm de diamètre intérieur pour l'émission et la réception, TE = 68 ms, TR = 2000 ms, FOV = 39x39x4 mm³, Voxel d'intérêt = 35x35x4 mm³, Matrice = 39x39, Résolution = 1x1x4 mm³, 43 h 29 min d'acquisitions.

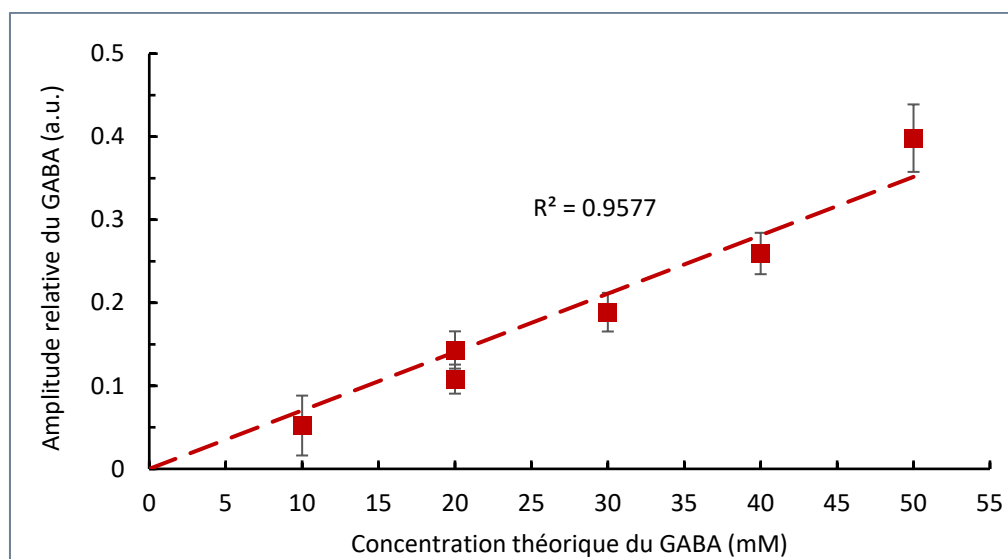


Figure 3-19. Corrélation entre l'amplitude du GABA obtenue avec JET et sa concentration théorique dans chaque compartiment du fantôme à 7 compartiments.

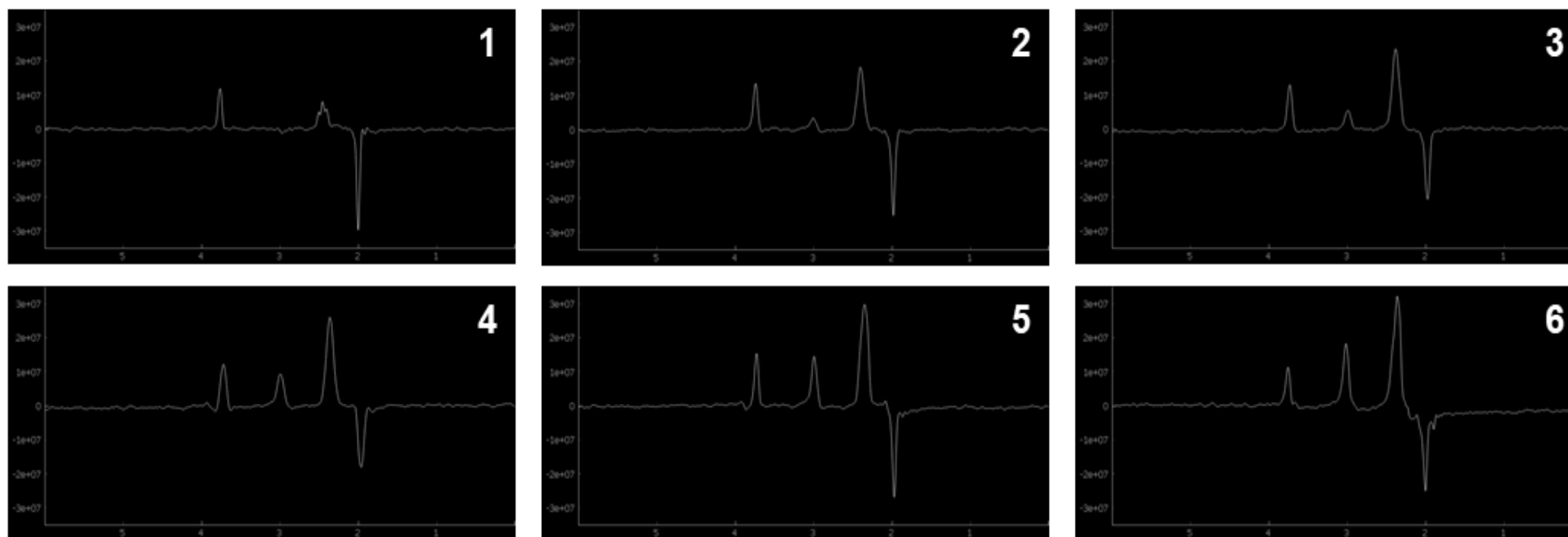


Figure 3-20. Visualisation de spectres différences obtenus dans 6 compartiments du fantôme présenté Figure 3-18, après prétraitement avec JET. On observe que l'intensité du pic du GABA à 3 ppm augmente progressivement entre le compartiment 1 et le compartiment 6, en accord avec la concentration théorique de GABA, alors que l'intensité du pic du GLX à 3,7 ppm est constante.

Par la suite, nous avons décidé de développer des fantômes multicompartiments, toujours fabriqués avec des tubes RMN en verre, mais suffisamment petits pour être utilisés avec la cryosonde ; et ainsi permettre une caractérisation plus précise de la méthode : limite de détection des métabolites, précision de la localisation, coéditation du GLX, etc. C'était l'objet d'un stage de Master 2. Le fantôme présenté dans la Figure 3-21 a été l'un des premiers développés lors de ce stage, à partir d'un tube Falcon de 15 mL et de deux tubes RMN en verre de 10 et 5 mm mis l'un dans l'autre, pour former 3 compartiments aux concentrations différentes (0) :

- 1 = Centre : 15 mM GABA + 10 mM (CR, GLX) + 5 mM NAA
- 2 : 10 mM GABA + 10 mM (CR, GLX) + 10 mM NAA
- 3 : 5 mM GABA + 10 mM (CR, GLX) + 15 mM NAA

On peut remarquer par exemple une différence de signal T2 du compartiment 2 par rapport aux deux autres compartiments, ce qui suggère une différence de concentration de gadolinium dans les solutions de gel agar, qui n'était pas intentionnelle.

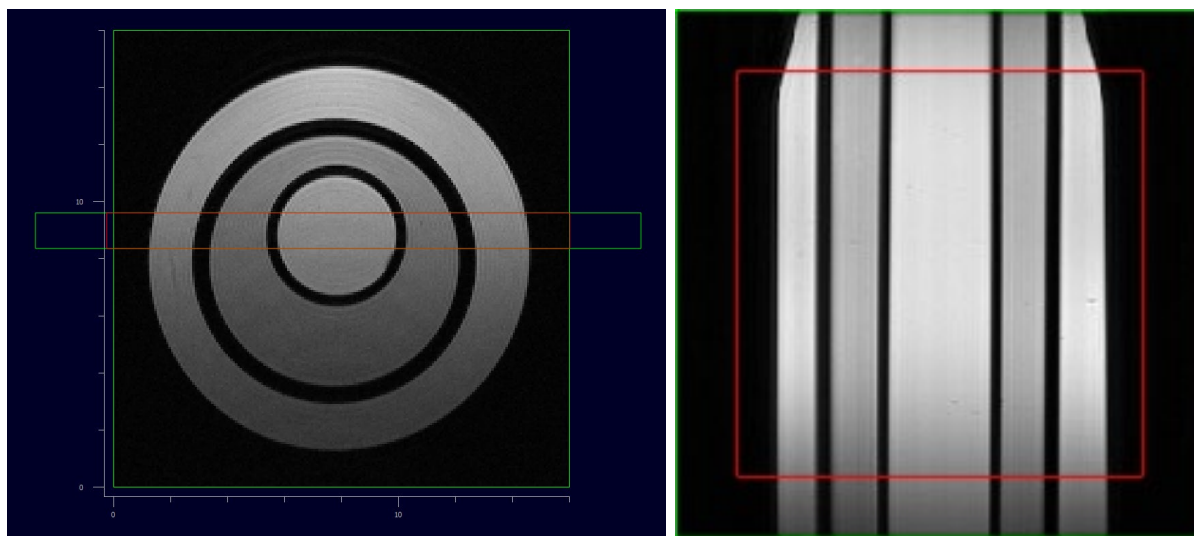


Figure 3-21. Images pondérées en T2 du fantôme multicompartiments dans le plan coronal à gauche ($FOV = 16 \times 16 \times 21 \text{ mm}^3$, Résolution = $0,0833 \times 0,0833 \times 1 \text{ mm}^3$, $TE/TR = 33/2500 \text{ ms}$) et axial à droite ($FOV = 21,25 \times 21,25 \times 1,25 \text{ mm}^3$, Résolution = $0,0830 \times 0,0830 \times 1 \text{ mm}^3$, $TE/TR = 36/2500 \text{ ms}$). La géométrie de la MEGA-LASER est représentée (rouge = voxel d'intérêt / vert = FOV).

Acquisition : 9,4 T ; Antenne volumique en quadrature de 68 mm de diamètre intérieur pour l'émission, Cryosonde à 4 canaux pour la réception.

Les Figure 3-22 et Figure 3-23 montrent les résultats obtenus avec la CSI MEGA-LASER, après reconstruction avec CSI Apy et traitement avec JET. On observe une concentration plus importante du GABA dans le tube central, et inversement pour le NAA, alors que la Créatine reste constante dans tous les compartiments, ce qui correspond aux concentrations théoriques. Dans la Figure 3-22, on peut observer la carte du GABA brute (A), sans zero-filling ni filtrage, et la carte (B) obtenue après zero-filling (17x17 à 51x51) et application d'un filtre gaussien (écart type = 1), classiquement effectué pour l'analyse des images spectroscopiques. Ce zero-filling et filtrage est retrouvé pour les cartes présentées Figure 3-23.

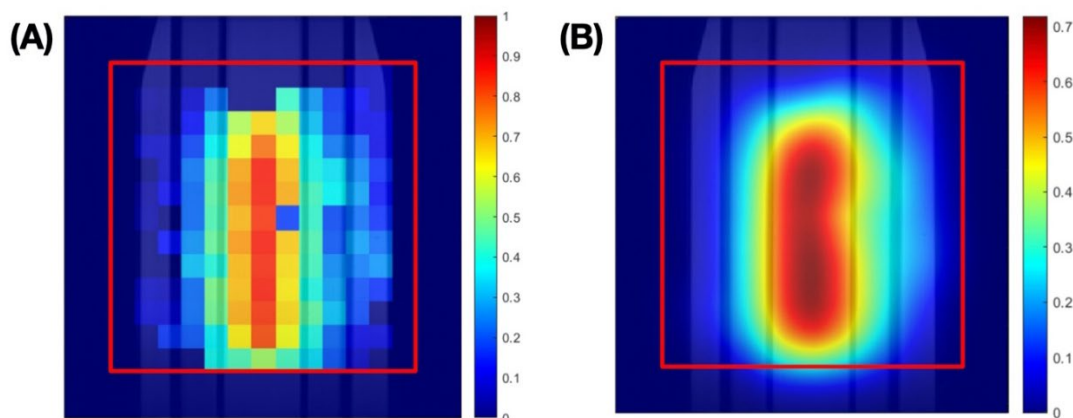


Figure 3-22. Cartes du GABA, obtenues avec la CSI MEGA-LASER, après reconstruction avec CSI Apy et prétraitement et quantification avec JET, sans (A) et avec (B) zero-filling et filtrage gaussien, superposées à l'image T2 axiale.

Acquisition : 9,4 T ; Antenne volumique en quadrature de 68 mm de diamètre intérieur pour l'émission, Cryosonde à 4 canaux pour la réception ; FOV = 21,25x21,25x1,25 mm³, Voxel d'intérêt = 16,25x16,25x1,25 mm³, Résolution = (1,25)³ mm³, Matrice = 17x17, 1 h 10 min d'acquisitions.

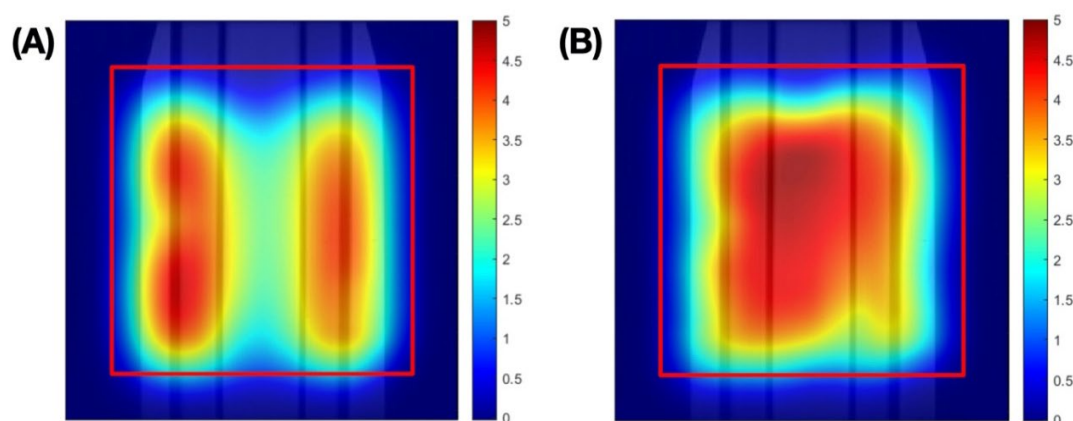


Figure 3-23. Cartes du NAA (A) et de la Créatine (B), obtenues avec la CSI MEGA-LASER, après reconstruction par CSI Apy et prétraitement et quantification avec JET, et avec zero-filling et filtrage gaussien et superposées à l'image T2 axiale.

Acquisition : 9,4 T ; Antenne volumique en quadrature de 68 mm de diamètre intérieur pour l'émission, cryosonde à 4 canaux pour la réception ; FOV = 21,25x21,25x1,25mm³, Voxel d'intérêt = 16,25x16,25x1,25 mm³, Résolution = (1,25)³ mm³, Matrice = 17x17, 1 h 10 min d'acquisitions.

L'acquisition sur ce fantôme a été effectuée dans les mêmes conditions que pour les acquisitions *in vivo*, avec une taille de matrice CSI de 17x17. Sur la Figure 3-24, nous observons le profil du GABA dans le voxel comparé à la concentration théorique dans les différents compartiments. Ce profil semble suivre une gaussienne, alors que l'on devrait observer des paliers correspondant aux 3 compartiments. Cela est expliquée par le phénomène de volume partiel, c'est-à-dire que les voxels n'ont pas une composition unique. Sur la Figure 3-25, où l'on peut observer la position des voxels sur l'image coronale pondérée en T2 : on constate que des voxels sont composés d'un compartiment et d'une paroi, ou même de deux compartiments et d'une paroi. De plus, la taille des voxels représentée sur cette figure est de 1,25 mm isotrope, qui est celle choisie dans les paramètres lors de l'acquisition, alors que la taille réelle des voxels est de 1,875 mm isotrope (largeur à mi-hauteur de la Point Spread Function calculée avec CSIApy). Cela peut expliquer par exemple le fait qu'il y a plus de signal dans le voxel central comparé aux deux voxels adjacents, car le signal de ces derniers est partiellement contaminé par la paroi du tube central. Ce phénomène de contamination, ou de volume partiel, s'étend à tous les voxels et explique le profil obtenu. Il est aussi important de noter que la quantification a été obtenue avec JET (seule méthode disponible au moment de cette expérimentation), et nous pouvons voir sur la carte du GABA des problèmes de quantification (voxel bleu au centre du fantôme par exemple, voir section 4.5).

Pour résoudre cette problématique de volume partiel, une solution qui a été envisagée était de réaliser des acquisitions avec une matrice CSI plus résolue, ce qui nécessiterait des acquisitions beaucoup plus longues, impliquant de ne pas respecter les paramètres des acquisitions *in vivo*, c'est-à-dire la taille de matrice CSI de 17x17. Cependant, le stage ayant été interrompu prématurément et le développement de ces fantômes multicompartiments pour la cryosonde étant complexe, nous avons décidé de nous concentrer sur les acquisitions *in vivo* et l'optimisation des outils de traitement des données.

Aussi, l'évaluation de la limite de détection de la méthode avec des fantômes dans les conditions expérimentales exactes de l'*in vivo* (même résolution spatiale, même temps d'acquisition) aurait été intéressante. Cependant, cela n'a pas été réalisée pour différentes raisons, notamment du fait de la non transposabilité des résultats à l'*in vivo* (qui était notre priorité).

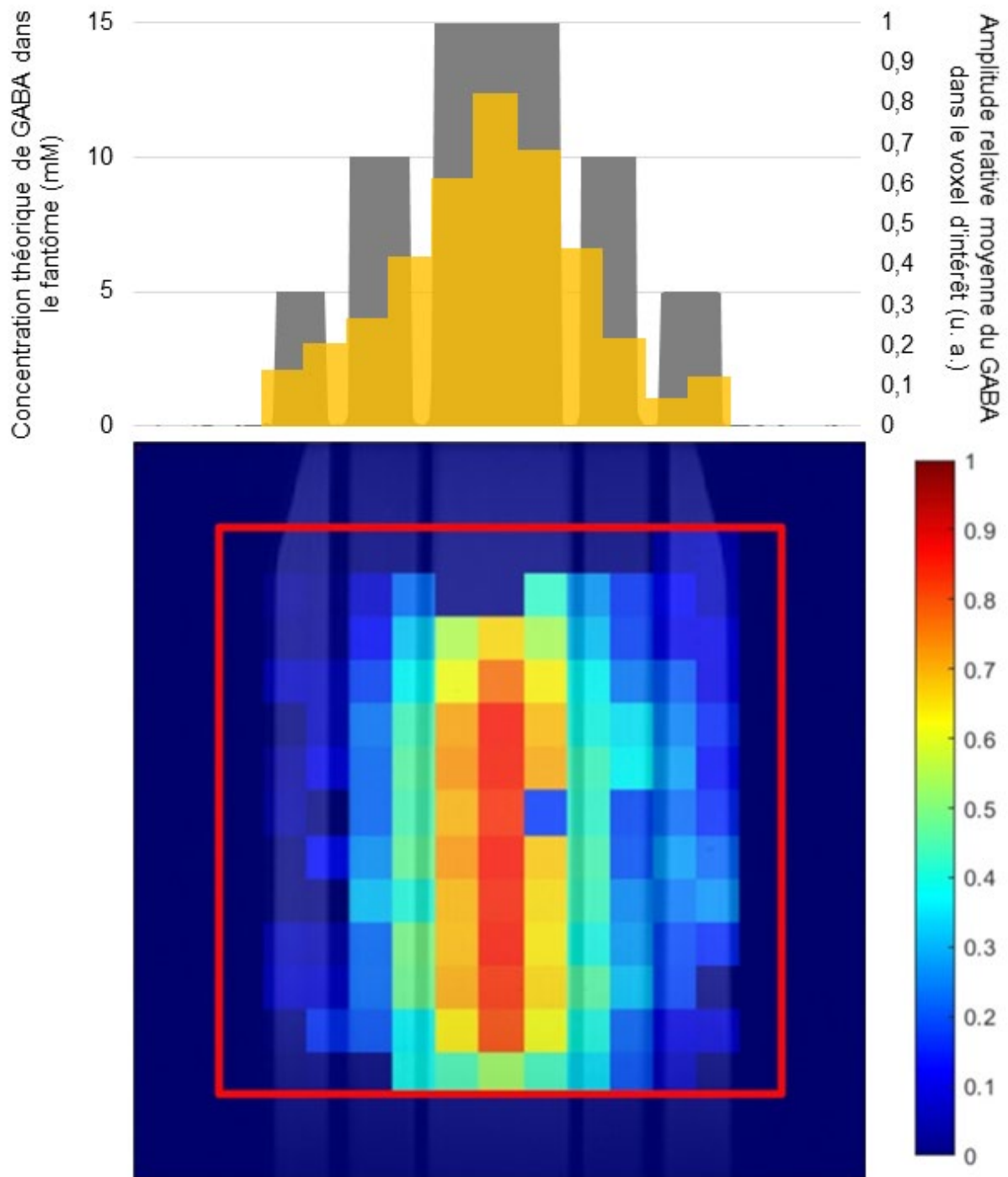


Figure 3-24. Profil de coupe du GABA du fantôme présenté Figure 3-22 (haut), et carte du GABA obtenue avec JET superposée à l'image pondérée en T2 (bas). Le profil de coupe représente la moyenne de chaque colonne de voxels situés dans le voxel d'intérêt.

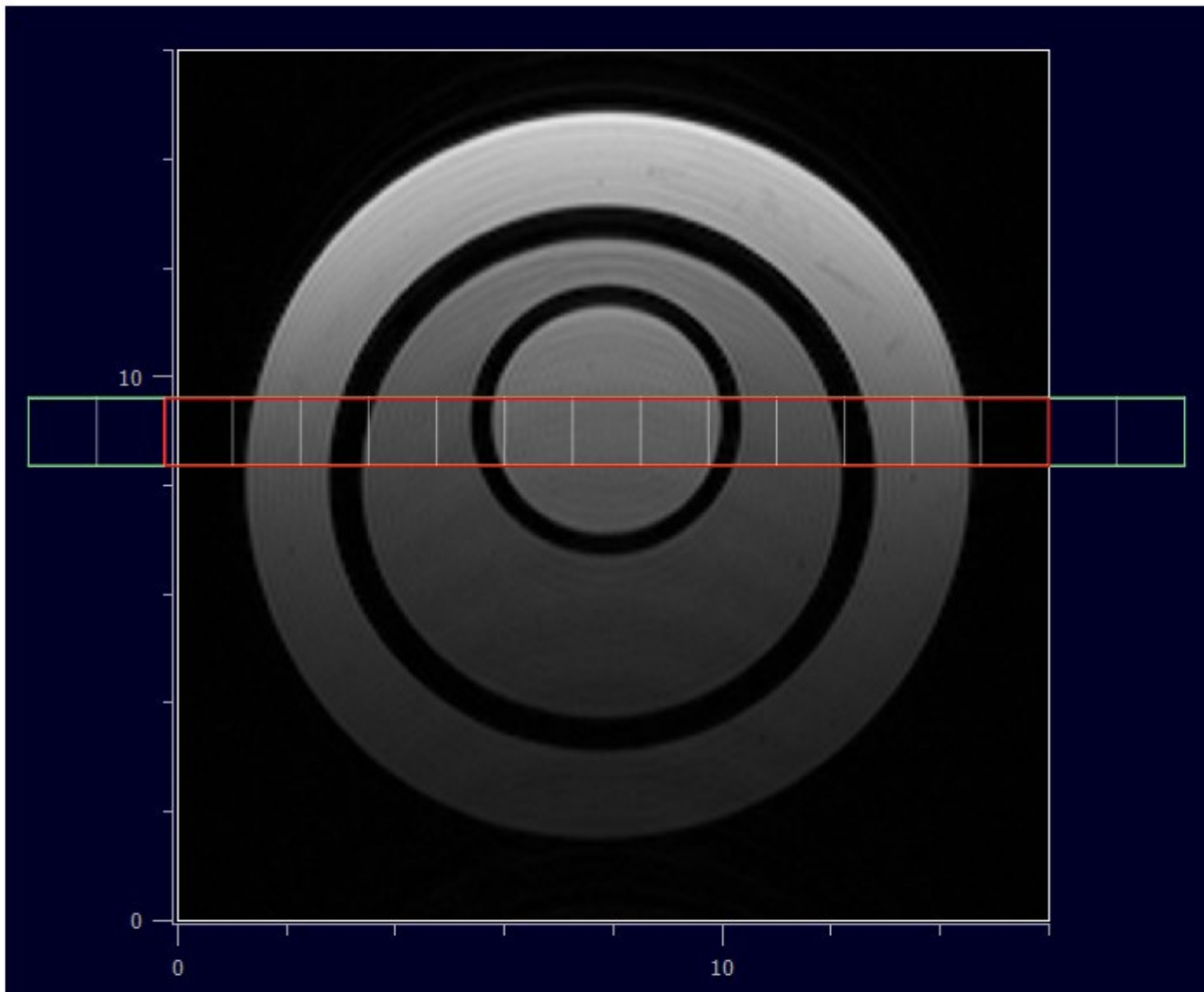


Figure 3-25. Image coronale pondéré en T2 du fantôme des Figure 3-21, Figure 3-22 et Figure 3-23, avec représentation du FOV sélectionné pour la CSI MEGA-LASER en vert et du voxel d'intérêt en rouge. La taille de la matrice, avec les 17 voxels visibles dans ce plan, est représentée en blanc.

3.3.2.3 Conclusion

Les divers essais effectués sur des fantômes ont permis de valider l'efficacité de notre méthode CSI MEGA-LASER. Tout d'abord, les acquisitions sur des fantômes homogènes ont confirmé la bonne sélection du volume. Ensuite, les acquisitions sur fantômes à faible diamètre, permettant d'utiliser la cryosonde avec exactement les mêmes conditions expérimentales que pour les souris, ont montré leurs limites. Cependant, le fantôme avec les 7 compartiments a permis de vérifier la qualité de l'édition des données et de déterminer si la localisation de compartiments aux concentrations différentes était possible.

Ces expérimentations ont également été d'une grande importance dans l'élaboration du protocole d'acquisition destiné à nos acquisitions sur souris. La spectroscopie simple-voxel est très sensible à la qualité du réglage du shim, et c'est un aspect encore plus critique pour l'imagerie spectroscopique. Le calcul du shim du premier et second ordre, avec un Map shim puis un Local shim, est donc indispensable. Mais nous avons aussi observé que l'acquisition d'une carte B_0 de meilleure résolution peut améliorer ce calcul du shim. Cela a donc été pris en compte pour l'optimisation du protocole d'acquisition, expliqué section 5.2.2.1.

3.3.3 Tests sur souris

Après les diverses acquisitions sur les fantômes, nous avons entrepris les premiers tests sur des souris saines afin d'identifier les problèmes spécifiques aux acquisitions *in vivo*.

3.3.3.1 Optimisation des spoilers

Tout d'abord, il est important de noter que dans le cas des LASER et MEGA-LASER simple-voxel, les spoilers étaient fixés à 50 % pour une durée de 1 ms. Lorsque ces spoilers étaient plus faibles, et uniquement lors des acquisitions sur souris, des artefacts apparaissaient (section 3.2.3).

Lors des premiers essais sur souris, nous avons observé (acquisition en mode Setup) que la quantité de signal obtenue n'était pas aussi élevée que prévue. Après une analyse plus approfondie, nous avons identifié que l'amplitude des spoilers jouait un rôle essentiel : en diminuant l'amplitude des spoilers, la quantité de signal augmentait, et inversement.

Pour remédier à ce problème, les spoilers utilisés pour les impulsions d'édition MEGA ont été séparés de ceux utilisés pour les impulsions LASER, afin de régler indépendamment leur amplitude. Pour cela, le code de la méthode a dû être une nouvelle fois modifiée, puis cette nouvelle version a dû également être validée sur fantôme comme expliqué dans la section précédente. Finalement, l'amplitude des spoilers des impulsions MEGA a été optimisée, permettant d'augmenter le signal sans apparition d'artefact à 30%, avec une durée maintenue à 1 ms.

3.3.3.2 Optimisation du protocole d'acquisition et problématiques rencontrées

En premier lieu, un travail important consistait à déterminer les paramètres de la CSI MEGA-LASER, notamment la dimension de la matrice d'acquisition, le nombre de moyennages et la résolution des voxels, tout en veillant à ce que le protocole total n'excède pas 2 heures, pour éviter une durée d'anesthésie trop importante pour les souris. Ainsi, nous avons déterminé une taille de matrice d'acquisition de 17x17 pour garantir une bonne fonction d'étalement des points (Point Spread Function). Aussi, le choix d'une taille de matrice d'acquisition de valeur impaire était essentiel, pour obtenir un voxel central, facilitant le travail de lecture et de traitement des données par la suite. Ensuite, une valeur de 12 moyennages pondérés, avec une résolution de voxel de 1,25x1,25x1,25 mm³, a été choisie après plusieurs essais. Ces valeurs de paramètres nous ont permis d'obtenir un rapport signal sur bruit (SNR) optimal tout en maintenant un temps d'acquisition de la CSI MEGA-LASER raisonnable, soit 1h10.

Par ailleurs, les acquisitions en spectroscopie, et d'autant plus en imagerie spectroscopique, sont fortement influencées par la qualité du Shim. Ainsi, un Map Shim puis un Local Shim sont effectués, permettant le calcul de premier et second ordre. Le calcul du Map Shim est effectué en fonction de la carte B₀ obtenue. Par conséquent, le FOV a été réduit de 58x58x58 mm³ à 24x24x24 mm³ avec deux moyennages au lieu d'un, pour améliorer la résolution de la carte B₀. En améliorant la résolution de cette carte, les inhomogénéités du champ B₀ sont mieux connues, et cela permet d'améliorer la qualité du Map Shim par la suite.

Ainsi, notre protocole final (temps d'acquisition total = 2h) comprend les étapes suivantes :

1. Localizer.
2. Acquisition de la carte B₀ pour connaître les inhomogénéités du champ magnétique.
3. Acquisition d'une image pondérée en T2 (TE/TR = 36/2500 ms) hautement résolue (21 coupes, FOV = 16x16mm, Résolution = 0,083x0,083x0,4 mm³), dans le plan coronal, pour sélectionner le volume d'acquisition de la séquence MEGA-LASER.
4. Placement du FOV (= 21,25x21,25x1,25 mm³) et du voxel d'intérêt (5,5x5x1,25 mm³) de la MEGA-LASER dans le plan axial sur l'image anatomique.
5. Réglage du Shim : Map Shim puis Local Shim.
6. Acquisition MEGA-LASER avec suppression de l'eau (1 h 12 min d'acquisition).
7. Acquisition d'une image pondérée en T2 (TE/TR = 33/2500 ms) avec la même géométrie de FOV que la MEGA-LASER. Cette image est destinée à être superposée avec les cartes des métabolites obtenues après traitement des données.

8. Acquisition d'une troisième séquence PRESS pour mesurer et régler la fréquence de référence dans le voxel d'intérêt.
9. Deuxième acquisition MEGA-LASER avec un seul moyennage et sans suppression de l'eau pour obtenir la carte de l'eau (19 min).

4. Développement et évaluation des outils de traitement des données

4.1 Introduction

Le développement et l'évaluation des outils de traitement des données ont été des étapes cruciales dans ce projet. En effet, la problématique principale à laquelle nous avons été confrontés était la lecture des données issues de la méthode CSI MEGA-LASER avec les acquisitions ON et OFF entrelacées, qui ne sont pas correctement reconstruites dans ParaVision. Il était donc impératif de mettre en place un outil permettant de lire ces données correctement.

Pour remédier à cette situation, nous avons collaboré avec Yann Le Fur (CRMBM, Marseille, France) sur son logiciel CSIApy [118], pour permettre de lire puis d'exporter les données afin qu'elles puissent être traitées par la suite.

En parallèle, nous disposions déjà d'un programme Matlab performant pour le prétraitement et la quantification automatique des données simple-voxel MEGA-PRESS appelé JET [117]. Cependant, il devait être modifié pour prendre en charge les données obtenues avec la localisation LASER, ainsi que l'imagerie spectroscopique. Notre objectif était de mettre en place un traitement automatique des données, afin de minimiser les interventions manuelles et les erreurs potentielles associées. Nous avons donc travaillé sur l'adaptation de ce programme en y intégrant les fonctionnalités nécessaires pour le traitement des données CSI MEGA-LASER.

Dans cette partie, les étapes de mise en place du pipeline de traitement des données sont expliquées dans l'ordre de traitement des données, c'est-à-dire avec tout d'abord la reconstruction et la visualisation des données CSI MEGA-LASER sous CSIApy, puis l'exportation des données en format Nifti-MRS lisible par JET, le prétraitement et enfin la quantification et l'obtention des cartes des métabolites. Cependant, il est important de noter que les modifications des deux outils CSIApy et JET ont été réalisées simultanément, au fur et à mesure du développement de la CSI MEGA-LASER.

4.2 Reconstruction et Visualisation des données CSI MEGA-LASER entrelacées avec CSIapy

Lors de nos premières expérimentations avec les séquences d'imagerie spectroscopique (LASER puis MEGA-LASER non entrelacée), nous pouvions visualiser les acquisitions sur l'outil « Image Display » de ParaVision (Figure 4-1). Cet outil est très sommaire avec une visualisation des spectres en valeurs absolues, et ne permet pas de prétraitement. Pour la quantification, il est seulement possible de sélectionner une partie du spectre, puis l'outil « Image Display » effectue l'intégration de l'intensité de cette fenêtre spectrale et affiche ces valeurs sur l'image anatomique. Ceci est visible sur la Figure 4-2.

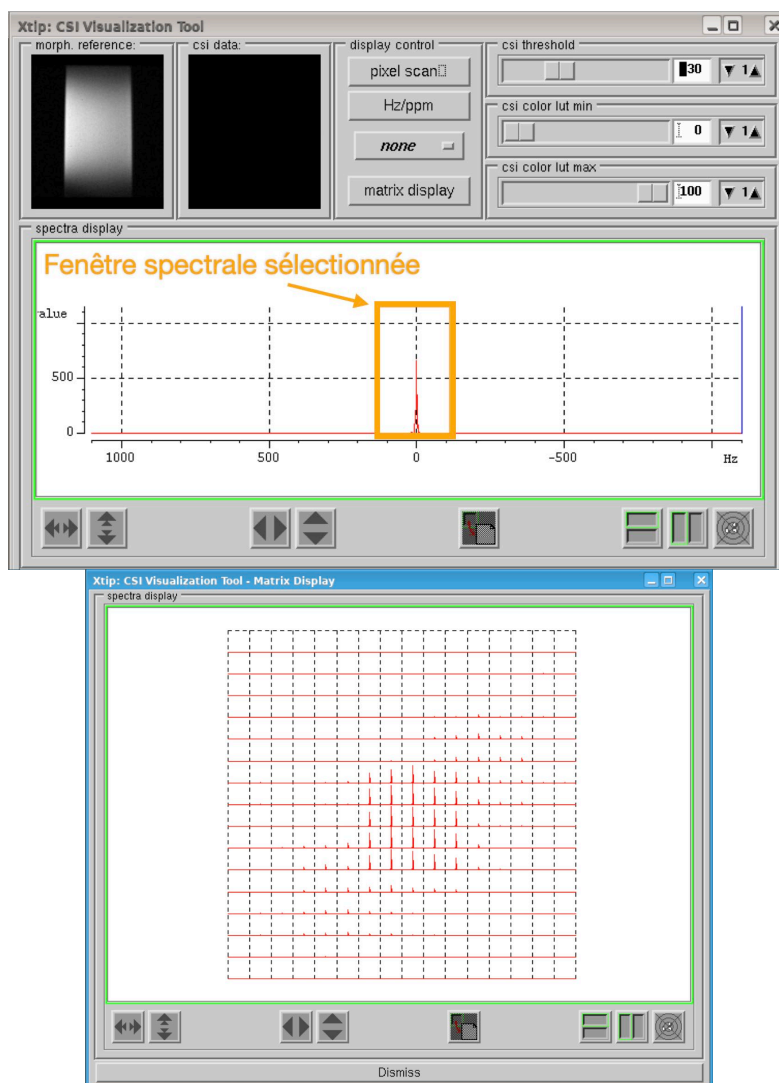


Figure 4-1. Utilisation de l'outil « Image Display » de ParaVision, avec l'exemple de données CSI LASER acquises sur un fantôme homogène.

Fenêtre « CSI Visualization Tool » : Visualisation d'un seul spectre de la matrice CSI en valeurs absolues. / Fenêtre « Matrix Display » : Visualisation de la matrice CSI complète.

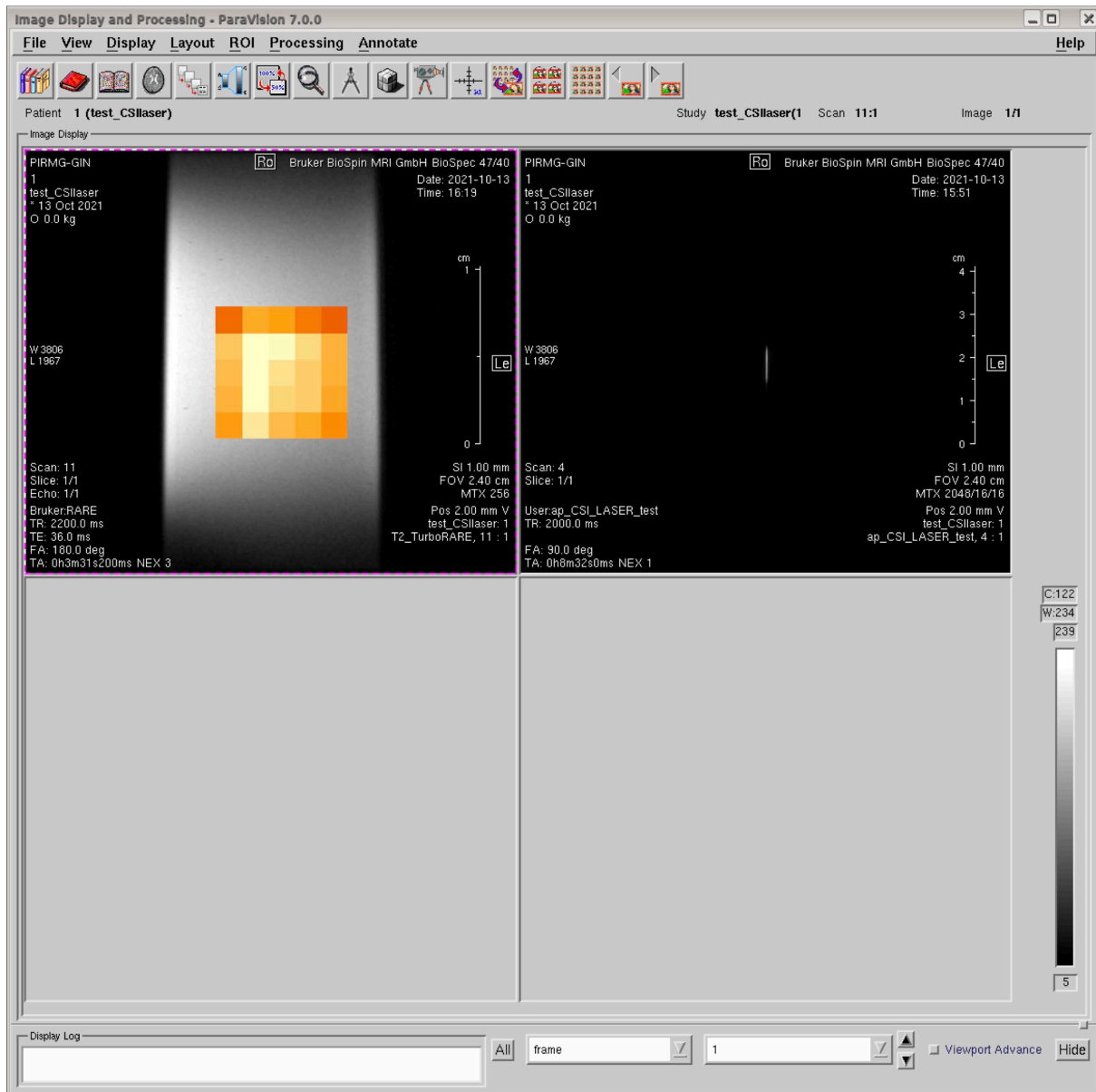


Figure 4-2. Utilisation de l'outil « Image Display » de ParaVision, avec l'exemple de données CSI LASER acquises sur un fantôme homogène.

Fenêtre « Image Display and Processing » : Visualisation de l'intensité de la fenêtre spectrale sélectionnée sur l'image anatomique du fantôme.

Nous avons alors utilisé le logiciel jMRUI (présenté section 2.2.3.7) pour permettre un traitement plus poussé des acquisitions. Comme présenté dans l'État de l'art, c'est un outil de visualisation et de traitement des données spectroscopiques. jMRUI nous permettait alors d'ouvrir ces premières données CSI, d'ajuster la phase et la fréquence des spectres manuellement ou en fonction de la phase de l'eau, de quantifier les matrices de spectres avec des outils performants (QUEST ou AMARES), et de superposer la matrice de spectres ou les cartes des métabolites quantifiées sur l'image anatomique (Figure 4-3).

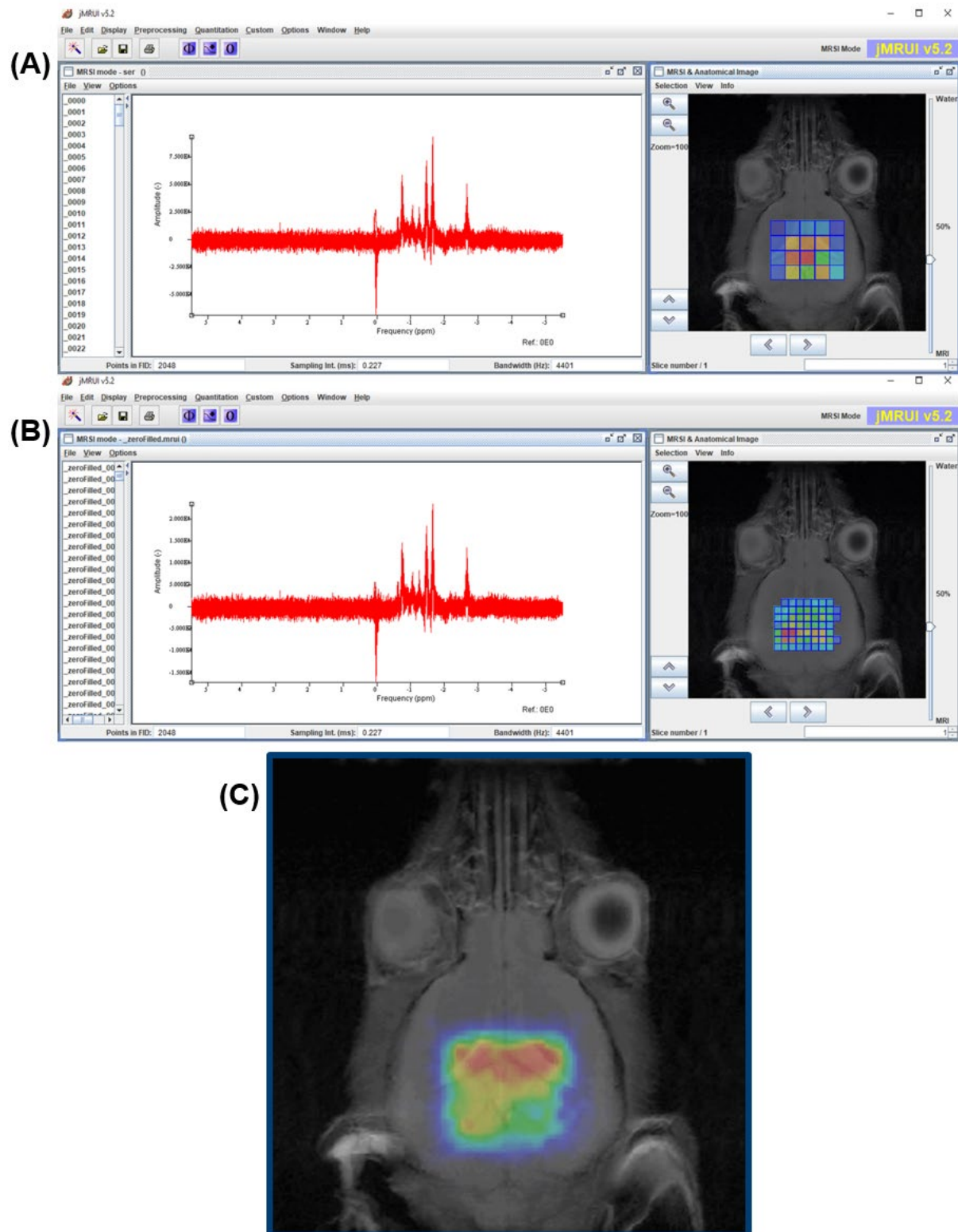


Figure 4-3. Exemple d'utilisation de jMRUI pour la visualisation et le traitement des données CSI LASER acquises sur une souris saine.
Affichage la matrice CSI sur l'image anatomique à droite, et des spectres à gauche, après utilisation de l'acquisition de l'eau pour corriger la phase sans (A) et avec zero-filling (16x16 à 32x32) (B).
(C) : Carte métabolique de la créatine après quantification avec QUEST.

Cependant, lorsque nous avons commencé à tester la CSI MEGA-LASER avec acquisitions ON et OFF entrelacées, nous nous sommes confrontés à des problèmes de reconstruction des données dans ParaVision. En effet, pour une acquisition entrelacée, les données doivent être stockées dans 2 matrices différentes (ON et OFF) ce que nous n'avons pas réussi à faire dans ParaVision. Ce dernier reconstruit les données sous la forme d'une seule matrice rectangulaire, par exemple de taille 17x34 au lieu de 2 matrices de 17x17. Ces données mal reconstruites n'étaient ensuite pas reconnues par jMRUI.

Ainsi, cela a bloqué la modification et l'optimisation de la méthode CSI MEGA-LASER entrelacée, impossible à réaliser sans outil de visualisation/évaluation de nos données. Nous avons alors envisagé l'utilisation du logiciel CSIapy, dédié aux données MRSI, mais pas aux données éditées et entrelacées. La reconstruction des données brutes CSI Bruker était déjà disponible mais pas la séparation des acquisitions ON et OFF.

La première étape a donc été de permettre la reconstruction correcte des données CSI MEGA-LASER entrelacées. Cette étape, cruciale pour notre projet, a nécessité un travail sur la compréhension de l'écriture des données brutes Bruker lors de l'acquisition, afin de reconstruire les matrices de spectres ON et OFF indépendamment, notamment avec plusieurs répétitions. Ensuite, CSIapy a été modifié pour permettre l'affichage des 4 canaux de la crysonde, pour les 2 acquisitions ON et OFF, donc de 8 spectres différents dans CSIapy.

Ce travail a été évalué en premier lieu sur des données acquises sur fantômes et sans suppression de l'eau, avec le voxel d'intérêt placé au centre du fantôme (Figure 4-4). Cela permettait d'avoir des données « simples », avec une matrice de spectres symétrique, pour évaluer les premières reconstructions.

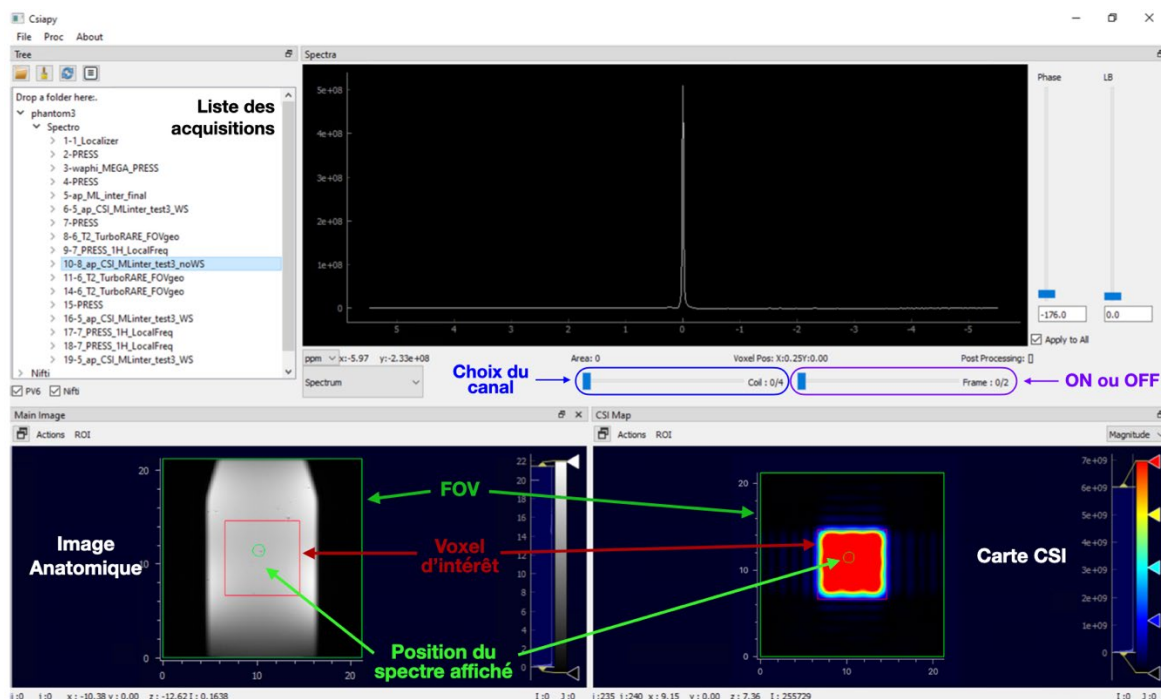


Figure 4-4. Affichage des données brutes CSI MEGA-LASER sans suppression de l'eau, acquises au centre d'un fantôme homogène. En haut, spectre de l'eau, à gauche image anatomique avec position du voxel de spectroscopie en rouge, et à droite carte CSI de l'eau (intensité). On peut observer l'homogénéité de l'intensité de l'eau au sein du voxel d'intérêt.

Ensuite, une acquisition toujours sur fantôme mais avec un voxel placé de manière asymétrique, a été réalisée pour valider la localisation de la séquence (déjà expliquée dans la partie 3.3.2) mais également la visualisation de la carte CSI dans CSIapy.

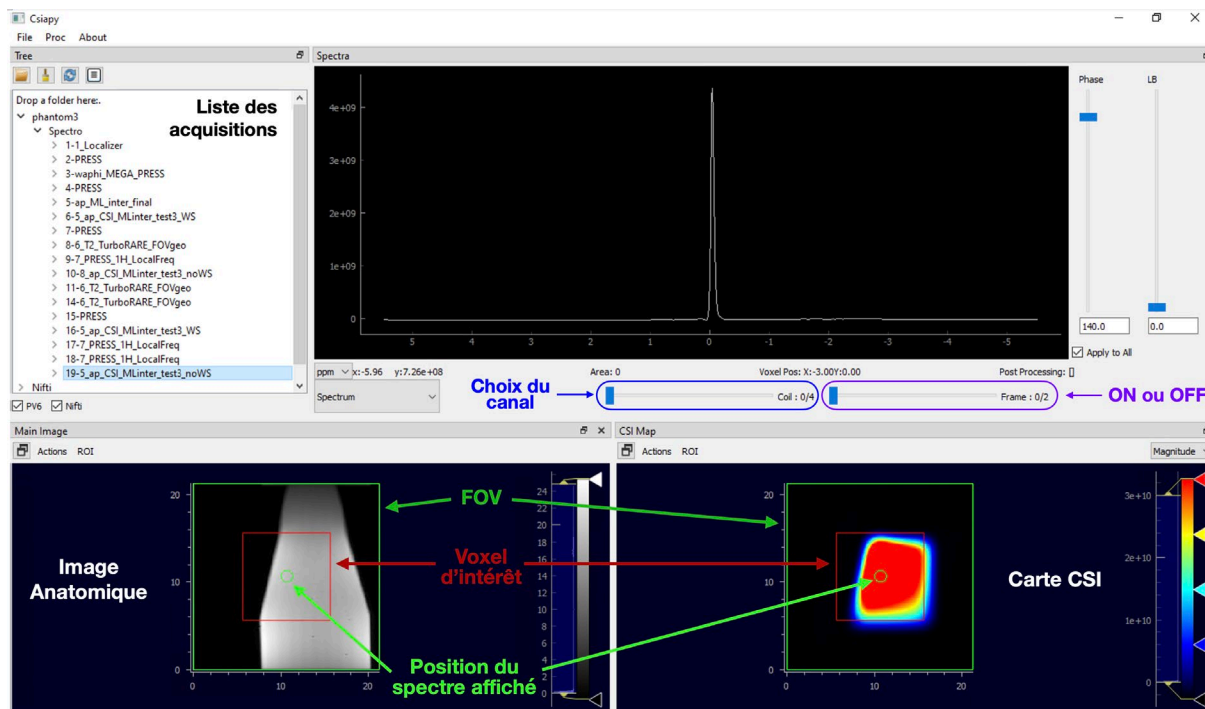


Figure 4-5. Affichage des données brutes CSI MEGA-LASER sans suppression de l'eau, acquises sur le bord d'un fantôme homogène de manière asymétrique. En haut, spectre de l'eau, à gauche image anatomique avec position du voxel de spectroscopie en rouge, et à droite carte CSI de l'eau (intensité). On peut observer l'assymétrie de la carte, en accord avec la position du voxel d'intérêt.

A la fin de cette étape, la reconstruction de la carte CSI MEGA-LASER entrelacée a été validée. Il était possible de visualiser la carte CSI, mais également de cliquer sur l'image anatomique pour afficher et analyser les spectres ON et OFF correspondants (Figure 4-6). Cela nous a permis de continuer la modification et l'optimisation de la méthode CSI MEGA-LASER sur fantôme puis sur souris.

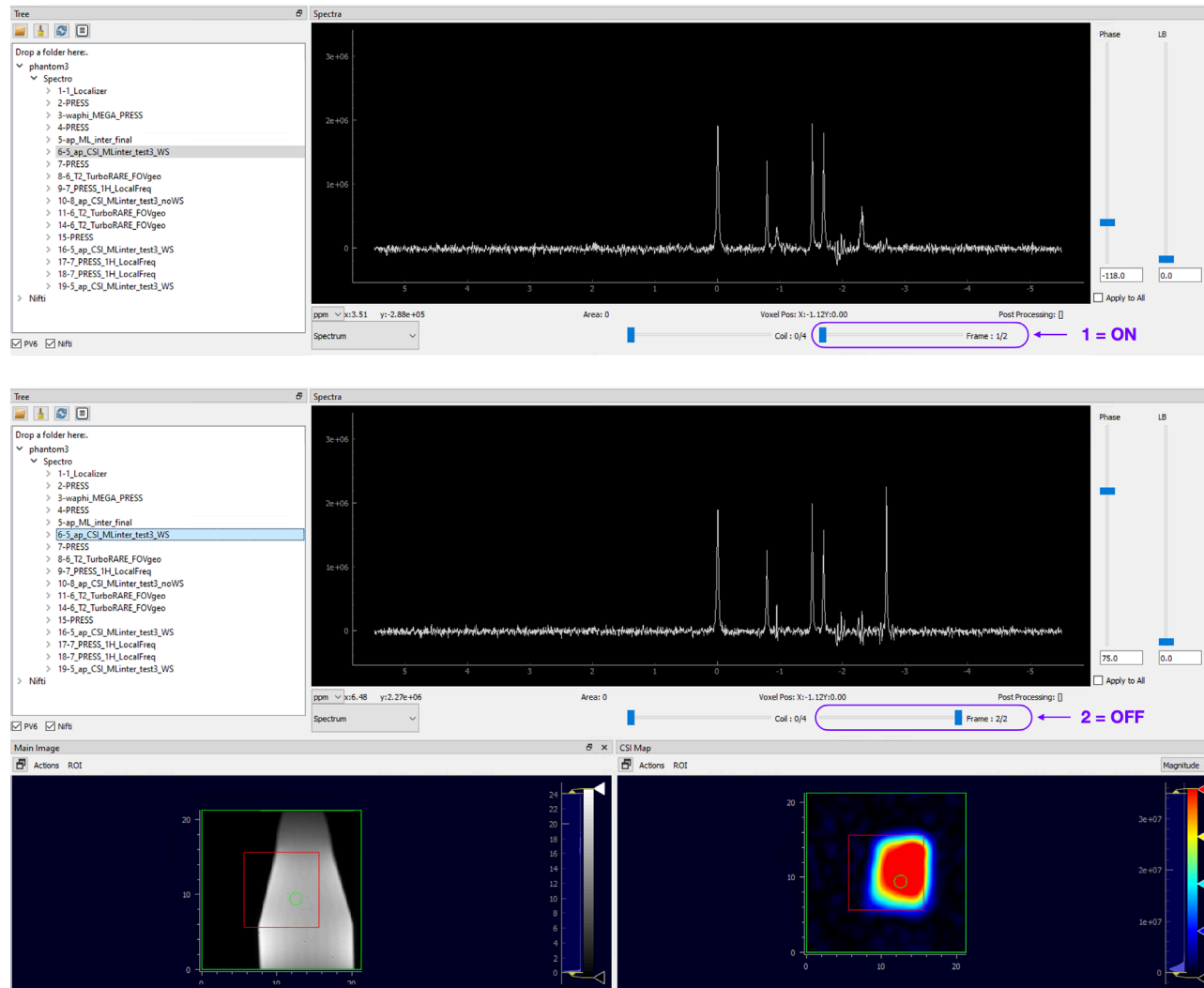


Figure 4-6. Affichage dans CSIapy des données brutes CSI MEGA-LASER avec suppression de l'eau, acquises sur le bord d'un fantôme homogène de manière asymétrique. On peut afficher l'acquisition ON (haut), et la OFF (bas), avec la position de ces spectres sur l'image anatomique (à gauche) et sur la carte CSI (à droite).

4.3 Exportation des données brutes pour le prétraitement

Les données d'édition requièrent un prétraitement plus poussé que des données CSI classiques, pour éviter les erreurs lors du calcul de la différence ON - OFF. Pour cela, le programme Matlab JET, développé et déjà utilisé dans l'équipe pour les données MEGA-PRESS simple-voxel, s'est avéré performant et nous souhaitons l'utiliser. Pour cela, il est nécessaire d'exporter les données brutes de CSIApy dans un format compatible pour pouvoir les lire et les traiter avec JET.

Après des premiers tests d'exportation des matrices de spectres sous format texte puis sous format Excel, l'utilisation du format de fichier Nifti-MRS (Magnetic Resonance Spectroscopy in Neuroimaging Informatics Technology Initiative) s'est imposée, pour permettre de regrouper toutes les informations (matrice ON et OFF, données des 4 canaux) dans un format compatible entre Python et Matlab. De plus, c'est un format très utilisé pour le traitement des données IRM, permettant d'envisager plus facilement une utilisation combinée de l'imagerie spectroscopique à d'autres techniques d'IRM comme l'IRM multiparamétrique.

Pour cette exportation sous format Nifti-MRS, les bibliothèques NiBabel (Brett M.) et spec2nii [120] ont été utilisées. Il a aussi été nécessaire de vérifier que les données CSI corrigées, toujours en format Nifti-MRS, soient correctement lues par CSIApy. Pour tout cela, un travail complexe a été effectué sur les matrices de rotations pour que les images anatomiques Nifti et la carte CSI soient affichées dans la bonne orientation. Ce travail a aussi été important pour que cette dernière soit bien positionnée sur l'image anatomique. Par ailleurs, une fonctionnalité supplémentaire a été rajoutée dans CSIApy, permettant d'exporter les données CSI, avec un zero-filling.

En parallèle, le programme JET a été adapté pour pouvoir lire ces nouvelles données au format Nifti-MRS. Les données exportées brutes comportent deux types d'informations (Figure 4-7) :

- Le Header, où sont enregistrées les informations indispensables à l'imagerie spectroscopique et qui permettent également par la suite de visualiser le volume sélectionné par rapport aux autres acquisitions IRM et notamment l'image anatomique : fréquence de référence de la machine IRM, dimension de la matrice, coordonnées du FOV sélectionné, etc.
- La Matrice de spectres, possédant une dimension (X, Y, 2048, 4, 2) pour les données CSI MEGA-LASER, avec X et Y la taille de la matrice d'acquisition, 2048 le nombre de points enregistrés par spectre, 4 le nombre de canaux de la cryosonde et 2 pour les deux acquisitions ON et OFF.

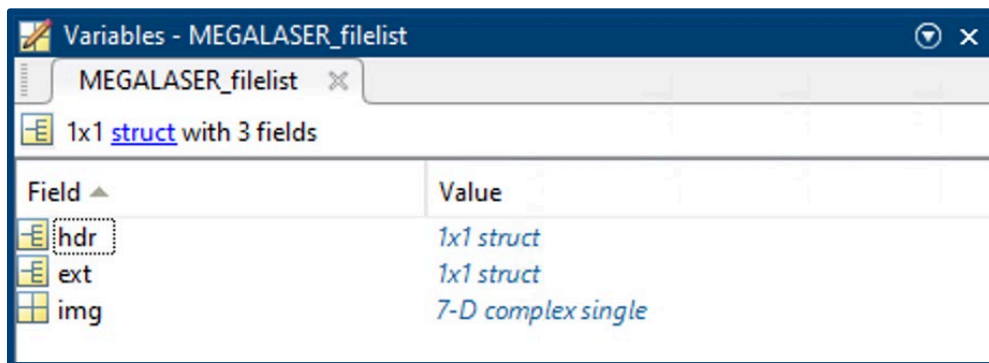


Figure 4-7. Illustration de la structure des données Nifti-MRS chargées dans Matlab, obtenues avec une acquisition CSI MEGA-LASER et après exportation par CSIApy.

Associés aux données Nifti-MRS, des fichiers JSON (JavaScript Object Notation) sont aussi indispensables pour la lecture des données CSI dans CSIApy. Les métadonnées tels que les paramètres d'acquisition (TE, TR, fréquence de référence, position de la matrice d'acquisition, etc.) sont stockées dans ce fichier. Ce type de fichier est standardisé, pour pouvoir être supporté par différents langages d'acquisition, mais permet aussi d'ajouter des informations supplémentaires ou des champs spécifiques au projet, sans perturber la structure générale.

Après avoir été modifié pour lire les données Nifti-MRS, JET a également été modifié pour parcourir la matrice CSI et ainsi traiter les spectres voxel par voxel, mais aussi pour pouvoir enregistrer les données corrigées dans ce même format. Ainsi, avec 2 fichiers en entrée, un Nifti-MRS et un JSON, 6 fichiers sont obtenus en sortie pour les données prétraitées ON, OFF et Différence (ON-OFF). Encore une fois, les données asymétriques obtenues sur fantôme ont été utiles pour vérifier que les données corrigées enregistrées avec JET soient visualisées correctement par CSIApy (Figure 4-8).

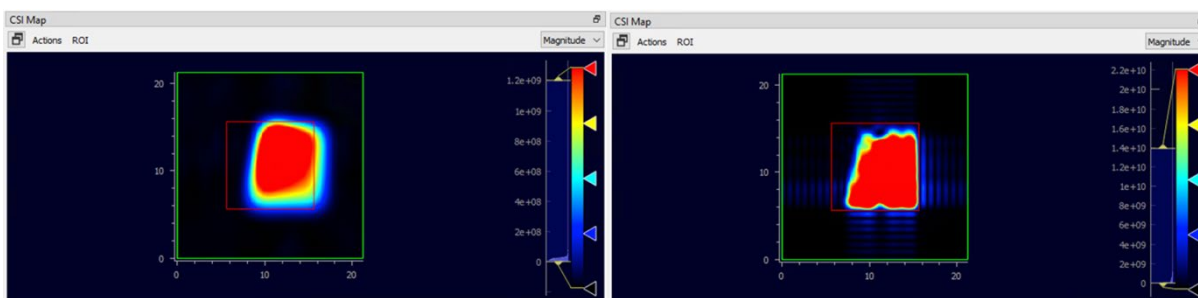


Figure 4-8. Matrice CSI brute (Gauche) et après prétraitement par JET (Droite), obtenues avec l'acquisition CSI MEGA-LASER sans suppression de l'eau sur fantôme homogène avec un voxel positionné de manière asymétrique

4.4 Prétraitement des données d'édition MEGA avec JET

Le prétraitement des données effectué dans JET est divisé en 4 étapes principales :

- Zero-filling de 2048 à 32768 points puis application d'une apodisation gaussienne de 9 Hz.
- Correction de phase avec l'algorithme ACME (Automated phase Correction based on Minimization of Entropy) [121], qui détermine les corrections de phase d'ordre zéro et de premier ordre optimales pour un spectre RMN en minimisant l'entropie, qui est définie comme la dérivée normalisée des données spectrales RMN : les spectres ON et OFF des 4 canaux sont phasés indépendamment.
- Alignement des spectres ON et OFF avec Icoshift (Interval Correlation Optimized SHIFTing) [122] qui utilise une approche d'alignement par corrélation : calcul de la moyenne des spectres des 4 canaux puis alignement des spectres en fonction de cette moyenne.
- Calibration des spectres sur le pic du NAA à 2 ppm.

Tout ce prétraitement étant spécifique aux données MEGA-PRESS, il a donc été nécessaire de faire quelques ajustements pour les données obtenues avec la localisation LASER. En effet, lors de la programmation de la méthode MEGA-LASER simple-voxel, le programme JET a été utilisé pour traiter les données acquises, mais ce n'était pas aussi performant que sur les données MEGA-PRESS. Après analyse des différentes étapes du prétraitement, nous avons identifié qu'il y avait un problème lors de la correction de phase des données MEGA-LASER, nécessitant une modification de l'utilisation de ACME.

La fonction ACME prend en entrée le spectre entier et retourne la phase à appliquer pour corriger le spectre. Cette phase est ensuite appliquée au spectre par une fonction différence. Ainsi, pour modifier le calcul effectué par ACME, les points de la zone 5,1–4,3 ppm, correspondant au pic de l'eau, sont supprimés du spectre avant d'être utilisé par ACME (Figure 4-9). Mais la phase calculée est ensuite appliquée au spectre entier. Cette modification nous a permis d'avoir une correction de phase efficace pour les données MEGA-LASER simple-voxel, et a donc ensuite été utilisée pour les données MEGA-LASER CSI également (Figure 4-10).

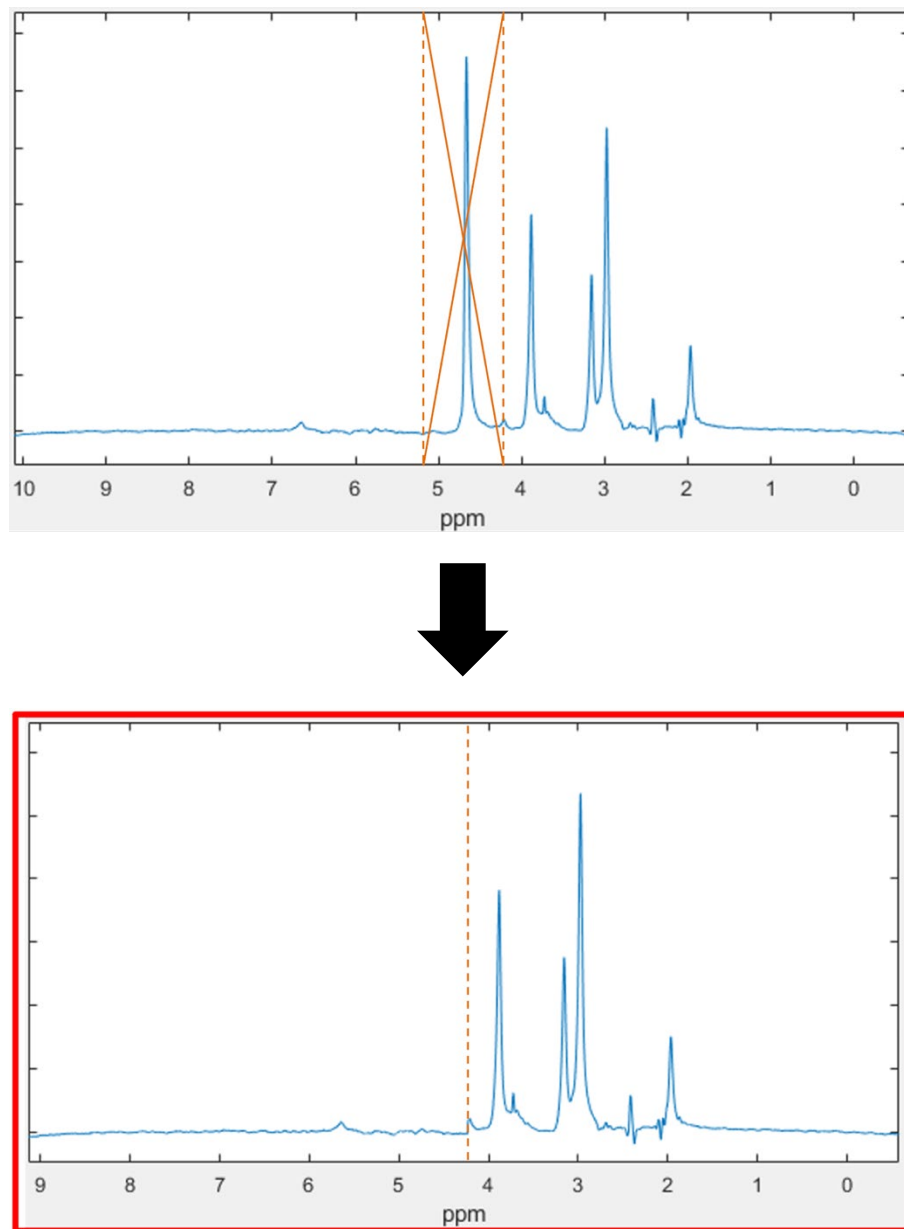


Figure 4-9. Exemple d'un spectre MEGA-LASER dont la zone spectrale de 4,3 à 5,1 ppm autour de l'eau a été supprimée.

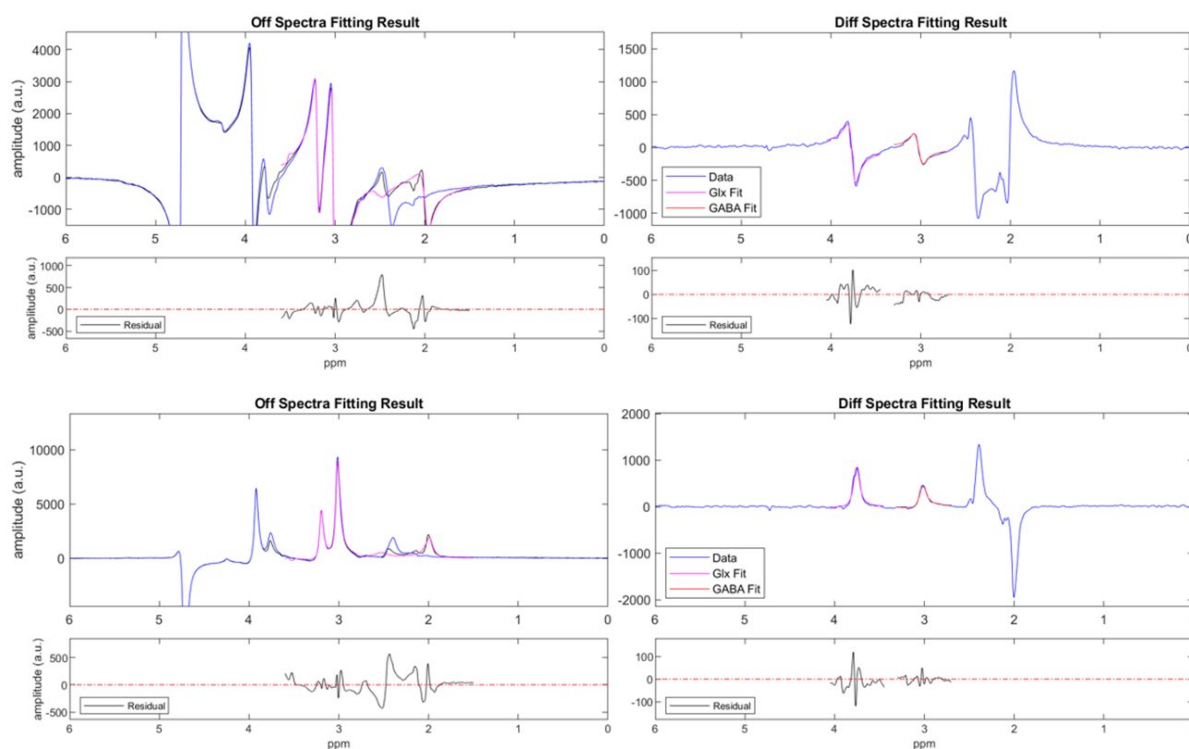


Figure 4-10. Exemple du prétraitement par JET d'un spectre MEGA-LASER avant (Haut) et après (Bas) modification de la correction de phase, à gauche sur le spectre OFF et à droite sur le spectre Différence.

Par ailleurs, ces modifications concernent les données acquises sur souris et avec la cryosonde. Des améliorations supplémentaires ont dû être apportées pour les données acquises sur fantômes, notamment celles acquises avec un FOV important. En effet, en imagerie spectroscopique, un décalage en fréquence peut être observé sur les spectres entre les extrémités de la matrice CSI. Ce décalage est aussi visible sur l'acquisition de l'eau, c'est-à-dire une acquisition sans suppression de l'eau, que nous effectuons à la suite de chaque acquisition CSI avec suppression d'eau. Cette acquisition de l'eau est donc utilisée dans JET pour calculer le décalage du pic de l'eau par rapport à la fréquence de référence de l'eau chez l'animal à 4,7 ppm, pour chaque voxel de la matrice. La correction de ce décalage fréquentiel est ensuite appliquée aux données des métabolites, avant tout recalage fréquentiel entre les spectres des 4 canaux.

De plus, la température des fantômes ne peut pas être contrôlée et n'est donc pas à 37°C comme la température corporelle des souris. Cette différence de température est aussi visible sur les spectres avec un décalage des pics vers les hauts champs lorsque la température diminue. Comme expliqué précédemment, chez les souris c'est le mode « Mean » qui est utilisé, c'est-à-dire que Icoshift permet de corriger la fréquence des spectres des 4 canaux en fonction de la moyenne de ceux-ci. Mais il y a également le mode « Max » qui permet de corriger le décalage fréquentiel en fonction du spectre qui a le plus de signal. Deux bases, pour les acquisitions ON et OFF, ont été simulées avec le logiciel FID-A (développé par Jamie Near [123]). Ces bases ont ensuite été utilisées pour correspondre au spectre « Max » dans Icoshift, permettant ensuite de corriger la fréquence pour les acquisitions ON et OFF respectivement.

4.5 Quantification et Obtention des cartes métaboliques

Après le prétraitement des spectres de la matrice CSI, la quantification des métabolites doit être réalisée afin d'obtenir les cartes métaboliques. Pour rappel, JET a été développé pour le prétraitement mais aussi la quantification des données MEGA-PRESS simple-voxel : GABA+ et GLX sur le spectre Différence, et CR, CHO et NAA sur le spectre OFF. Il a donc dû être modifié pour pouvoir traiter les données CSI MEGA-LASER.

La version de JET adaptée aux données d'imagerie spectroscopique MEGA-LASER, permet donc non seulement le prétraitement, spectre par spectre, mais aussi leur quantification.

Pour réaliser cela, des matrices, destinées à stocker les valeurs quantifiées de chaque spectre, ont été initialisées pour chaque métabolite (NAA, CR, CHO, GABA+, GLX). Après la quantification, ces matrices sont ensuite sauvegardées sous forme de fichiers Nifti-MRS. Ces fichiers intègrent les informations du Header et du format JSON des données brutes, ce qui permet leur repositionnement sur les images anatomiques par la suite dans CSIapy.

L'avantage majeur de ce programme est, entre autres, la possibilité de visualiser les résultats pour chaque spectre, avec le fit et le calcul de son erreur, la valeur de l'amplitude relative et le SNR pour chaque pic. Cela nous a permis d'évaluer rapidement la performance de la quantification, mais aussi de rajouter des conditions : par exemple, pour un pic dont le SNR était inférieur à 3 [109], la valeur de la quantification n'était pas prise en compte.

Cette méthode a donné des résultats satisfaisants avec des données de fantômes, même si nous avons remarqué que le GLX était le métabolite le moins bien quantifié sur les fantômes, comme le montre la Figure 3-10 présentée dans la section 3.2.2.

Au fil du développement de la méthode CSI, nous avons constaté que cette quantification n'était pas fiable pour les données *in vivo*, car pour certains spectres, un ou plusieurs pics n'était pas ajustés correctement. Un exemple est montré Figure 4-11, où l'on peut observer que le fit du pic du GLX est correct, mais ce n'est pas le cas pour le GABA+. Pour corriger cela, de nombreux tests et modifications ont été effectués : modification des bornes de déplacement chimique sélectionnées pour les pics, modification de l'apodisation, ajustement de nombreux paramètres, etc. Ces modifications ont permis d'améliorer la fiabilité de la quantification mais le problème était toujours retrouvé aléatoirement pour certains spectres, notamment pour le pic du GLX. La Figure 4-12 illustre cela avec deux spectres consécutifs d'une carte CSI MEGA-LASER : le pic du GLX du spectre de gauche est correctement quantifié, mais ce n'est pas le cas pour le spectre de droite. Ces erreurs conduisent ensuite à des valeurs aberrantes dans la carte GABA+/GLX.

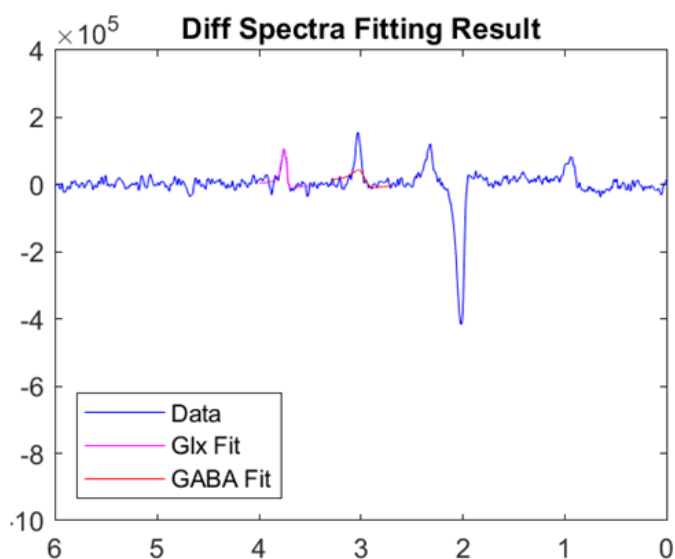


Figure 4-11. Exemple d'une quantification d'un spectre *in vivo* réalisée avec JET où l'on observe que le pic du GABA+ n'est pas correctement fitté.

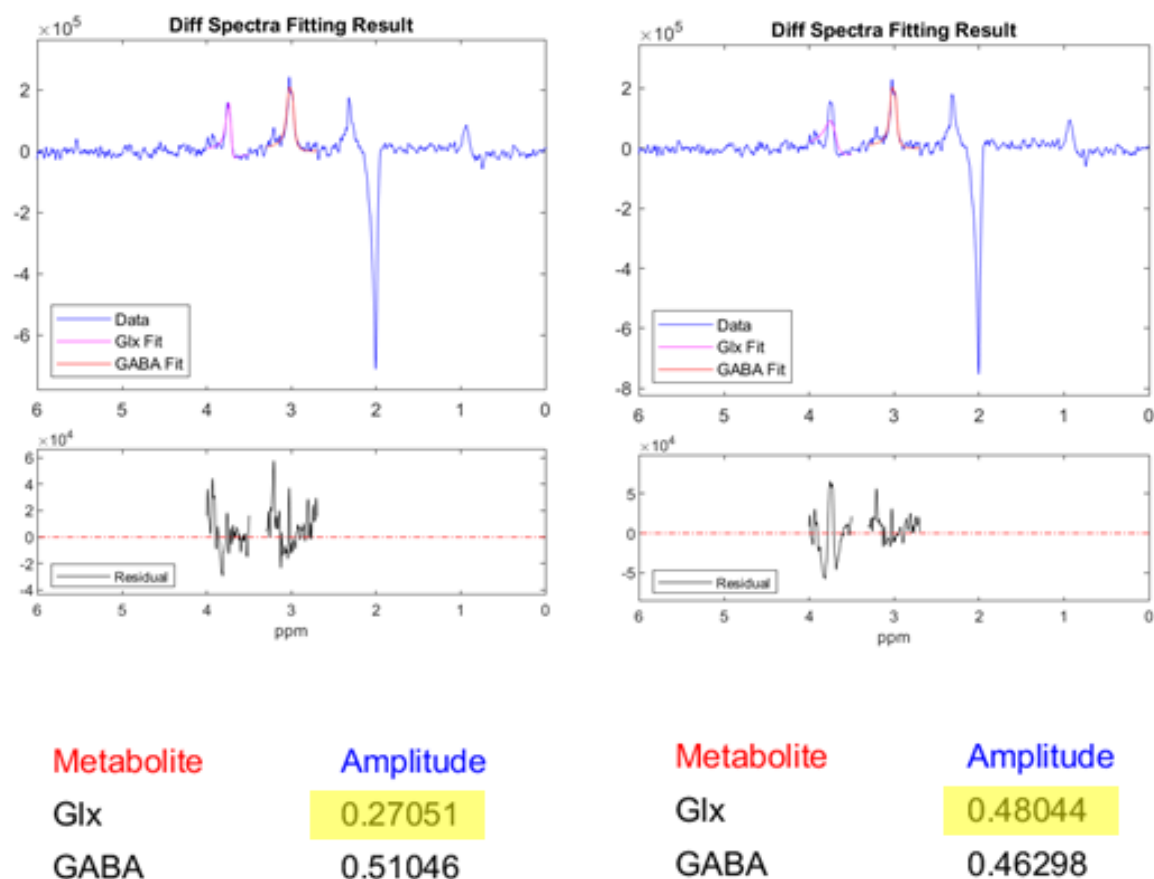


Figure 4-12. Exemple de deux spectres consécutifs d'une même carte CSI MEGA-LASER (51x51) acquise sur une souris et quantifiés avec JET. On peut observer que le fit du pic du GLX du spectre de gauche est correct, contrairement au spectre de droite. L'amplitude relative ainsi calculée avec JET pour le spectre de droite est aberrante.

Nous avons rencontré une autre problématique plus spécifique aux souris KA-MTLE : le GLX diminuant dans la ZE, il est possible que le SNR du pic soit inférieur à 3 et donc exclu de la quantification (Figure 4-13). Si le GLX n'est pas quantifié, le ratio GABA+/GLX ne peut donc pas être calculé. La Figure 4-14 montre un exemple de cartes du GABA+, du GLX et du ratio GABA+/GLX obtenues chez une souris KA-MTLE. On observe que pour certains voxels, notamment en bas à droite (correspondant environ à la ZE), le GABA+ a été quantifié mais pas le GLX, ce qui ne permet pas de calculer la carte complète du GABA+/GLX.

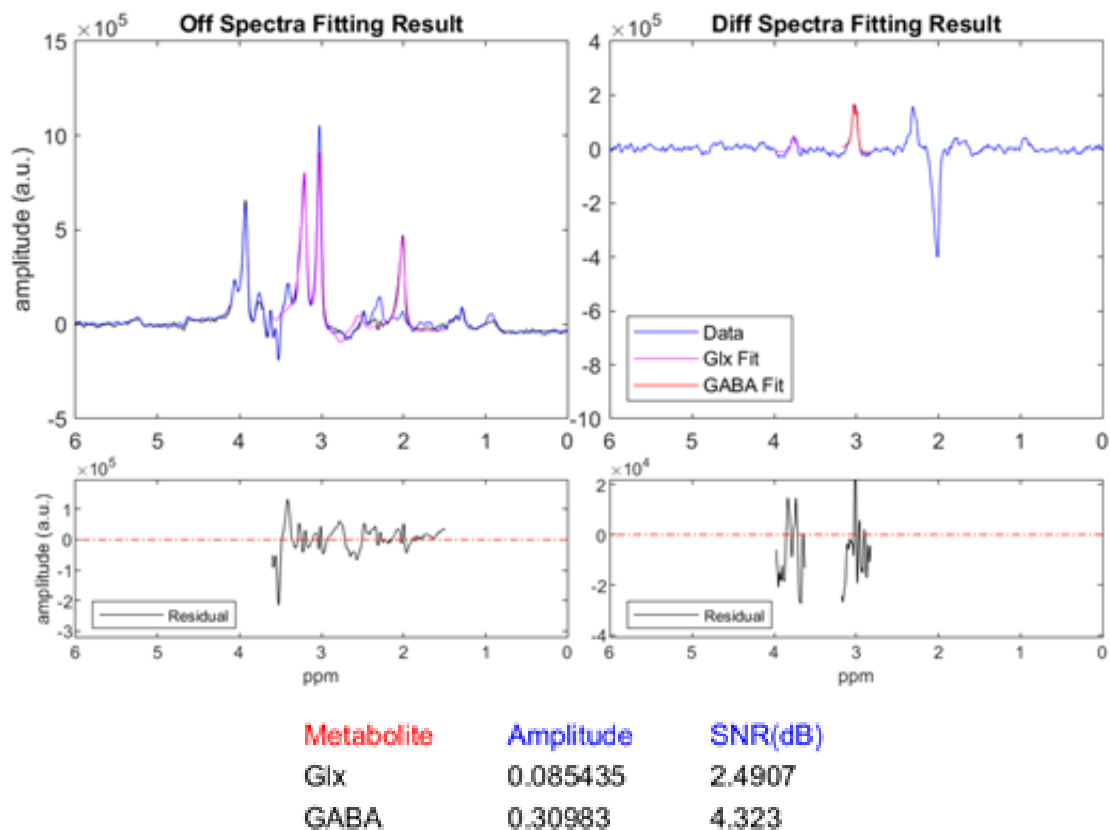


Figure 4-13. Quantification d'un spectre *in vivo* avec JET. Le SNR du pic du GABA+ est supérieur à 3, en accord avec le consensus pour quantifier un spectre RMN *in vivo*. Ce n'est pas le cas du pic du GLX. Il n'est donc pas possible de calculer le ratio GABA+/GLX.

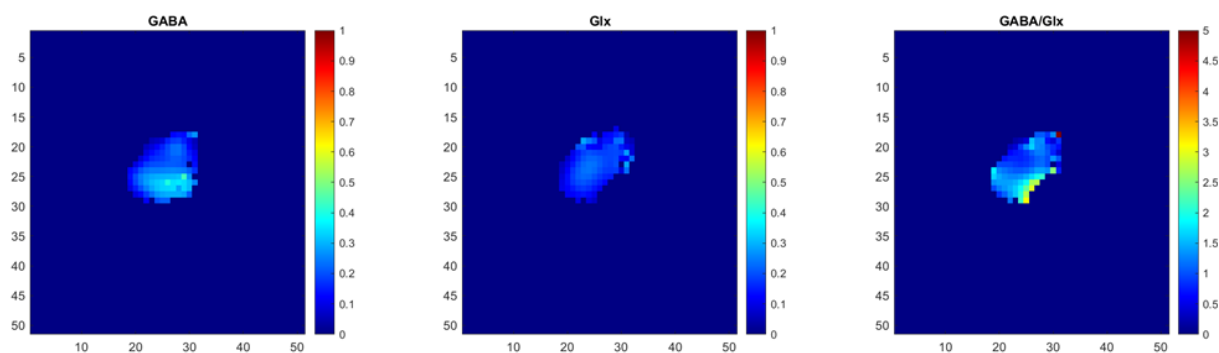


Figure 4-14. Exemple de cartes du GABA+, GLX et GABA+/GLX, obtenues sur une souris KA-MTLE après prétraitement et quantification avec JET.

Ces différents aspects nous ont poussé à nous diriger vers la méthode AMARES [111] (décrite 2.2.3.7), disponible dans CSIApy, à la fin de l'année 2023. La quantification obtenue semble plus robuste, car nous n'observons plus de valeurs aberrantes comme c'était le cas avec JET. Cependant, cette méthode ne donne pas accès à la quantification pour chaque voxel individuellement, et nous obtenons directement les cartes GABA+ et GLX. D'autres part, ne sont pas encore mis en place actuellement le calcul des erreurs, et la quantification des métabolites dans le spectre OFF (NAA, CR et CHO). La problématique du SNR trop faible pour la GLX, observée lors de l'utilisation de JET, est aussi à évaluer avec le calcul des erreurs.

4.6 Conclusion et Discussion

Pour conclure, voici la Figure 4-15 qui résume les différentes étapes du traitement des données CSI MEGA-LASER, des données brutes directement obtenues après l'acquisition, aux cartes GABA+/GLX. Toutes les étapes présentées sont automatiques, mais l'enchaînement entre chaque étape ne se fait pas automatiquement, et nécessite la contribution de l'utilisateur pour qu'elles s'effectuent correctement. Un avantage des étapes effectuées dans Matlab est qu'elles peuvent s'effectuer en mode « batch », c'est-à-dire que toutes les données peuvent être modifiées (soit prétraitées dans JET, soit pour le calcul de la carte GABA+/GLX) avec une seule intervention de l'utilisateur. Ce n'est pas le cas des étapes dans CSIApy qui sont effectuées indépendamment pour chaque acquisition. Notre objectif étant d'obtenir le traitement des données le plus automatisé possible, nous souhaitons faire une version compilée des programmes Matlab, pour les intégrer directement dans CSIApy. Cela permettrait d'effectuer le traitement des données uniquement dans CSIApy, et d'éviter les manipulations entre les différents logiciels. Cette automatisation offrirait un traitement des données plus robuste, mais faciliterait aussi la distribution de la méthode CSI MEGA-LASER.

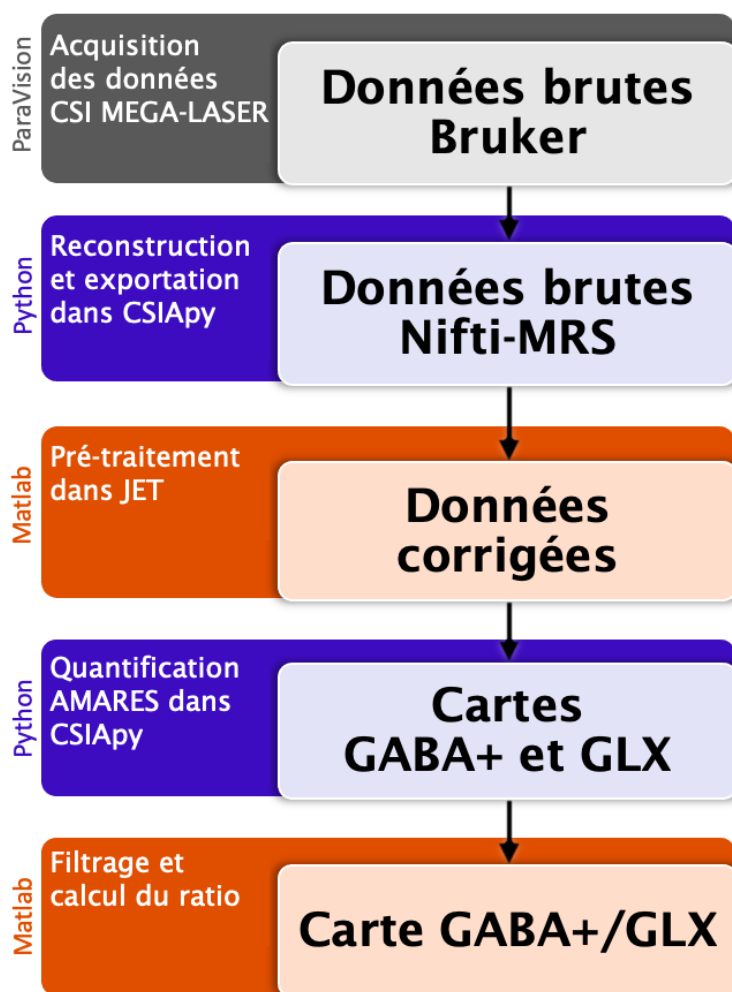


Figure 4-15. Workflow du traitement des données CSI MEGA-LASER, depuis l'acquisition jusqu'à la production des cartes GABA+/GLX.

5. Application au modèle murin KA-MTLE

5.1 Introduction

Dans cette étude, nous avons développé la méthode CSI MEGA-LASER, permettant d'imager le GABA dans le cerveau du petit animal. Le GABA étant généralement en concentration très faible dans le cerveau, disposer d'un modèle animal tel que le modèle souris KA-MTLE, avec une augmentation de 100% de ce métabolite [5] pour valider cette méthode *in vivo*, était un atout. D'autres parts, la méthode est parfaitement adaptée pour localiser spatialement la ZE, de manière non invasive, en cartographiant le ratio GABA⁺/GLX chez ce modèle animal. C'est dans ce but que la CSI MEGA-LASER a été utilisée. Et finalement, une étude longitudinale sur un sous-groupe de souris a été réalisée durant les 4 semaines que dure l'épileptogénèse.

En parallèle, comme expliqué dans la section 2.2.2.2b, une étude dans l'équipe a évalué l'utilisation de l'IRM multiparamétrique chez le modèle de souris KA-MTLE [6]. Nous souhaitons donc étudier l'éventuelle corrélation entre l'augmentation du ratio GABA⁺/GLX et les différences quantifiées par IRM multiparamétrique.

Enfin, une analyse *ex vivo*, comprenant de la spectroscopie RMN haute résolution HRMAS, de l'immunohistologie et du Western Blot, a été conduite pour essayer de comprendre les mécanismes conduisant à de l'augmentation du GABA⁺ et à la diminution du GLX dans la ZE.

5.2 Matériel et méthodes

5.2.1 Modèle KA-MTLE

Pour ce modèle, des souris mâles C57BL/6J (8-10 semaines, Janvier LABS, Saint Berthevin, France), sont utilisées. Elles sont individualisées et maintenues en cycle lumière-obscurité de 12 heures. Toutes les procédures animales ont été réalisées conformément à la directive 2010/63/EU du Comité européen après validation par notre comité d'éthique local et autorisation du ministère français de la Recherche (APAFIS #6938-2016062717111654).

Une injection stéréotaxique dans l'hippocampe dorsal droit de 50 nL d'une solution de 20 mM de KA (soit 1 nmol ; Sigma, Lyon, France) est réalisée sous anesthésie (isoflurane 1 à 2%) comme précédemment décrit et utilisé par différents groupes [38], [124], [125], tandis que les souris SHAM reçoivent du NaCl. Après l'injection de KA, les souris sont observées afin de noter les modifications comportementales typiques (voir 2.1.3) [38], [124]. Les tailles des groupes, utilisés pour chaque protocole expérimental, sont résumées dans la Figure 5-7.

5.2.2 Acquisitions IRM

L'IRM multiparamétrique et la spectroscopie RMN ont été réalisées sur un scanner de 9,4 T (BioSpec 94/20 Avance III HD, Bruker Biospin) de la plateforme IRMaGe de Grenoble avec le logiciel ParaVision (7.0.0). Une antenne volumique en quadrature de 68 mm de diamètre intérieur a été utilisée pour l'émission, et une sonde cryogénique à quatre canaux pour la réception.

Pour les deux acquisitions de spectroscopie RMN et IRM, l'anesthésie est induite en utilisant 4 % d'isoflurane et maintenue à travers un masque facial en utilisant 1,5 à 2,5 % d'isoflurane, dans un mélange 75 % d'air et 25 % d'O₂. Pendant toutes les procédures d'imagerie, le niveau d'isoflurane est ajusté pour maintenir la fréquence respiratoire entre 70 et 90 BPM. Un bain-marie permet de faire circuler de l'eau à 40°C dans le berceau de la cryosonde pour éviter une diminution de la température corporelle des animaux pendant l'anesthésie dans l'IRM.

5.2.2.1 CSI MEGA-LASER

Les acquisitions d'imagerie spectroscopique CSI MEGA-LASER ont été réalisées sur les souris 4 semaines après l'injection de kaïnate. Cependant, pour étudier l'évolution temporelle de l'augmentation du ratio GABA+/GLX, des acquisitions un jour avant l'injection puis 3, 6 et 14 jours après l'injection ont été également effectuées sur quelques souris, voir Figure 5-7 (B).

Pour obtenir les données d'imagerie spectroscopique, 8 acquisitions sont nécessaires pour un temps total d'acquisition de 2 heures :

- Localizer
- Image anatomique pondéré en T2 haute résolution : TE/TR = 36/2500 ms, FOV = 16x16 mm², Résolution = 0,083x0,083x0,4 mm, 21 coupes dans le plan coronal, 8 min d'acquisition. Cette image permet de visualiser la zone injectée avec la sclérose de l'hippocampe.
- Carte B₀
- Position de la coupe d'intérêt pour l'imagerie spectroscopique : FOV = 21,25x21,25x1,25 mm³ dans l'orientation axiale, Voxel d'intérêt = 5x5,5x1,25 mm³, résolution = (1,25)³ mm³.
- Acquisitions PRESS pour les ajustements de shim : Local shim puis un Map shim effectués sur le volume du voxel d'intérêt précédemment défini. Une valeur de largeur à mi-hauteur du pic de l'eau inférieure à 25 Hz permettait de valider le shim et de passer à l'acquisition suivante.
- Acquisition CSI MEGA-LASER avec suppression de l'eau : Après avoir fait ces ajustements, la suppression de l'eau de cette première CSI MEGA-LASER est réglée et l'acquisition est lancée : TE/TR = 68/2000 ms, Matrice = 17x17, 12 Moyennages pondérés, fréquences d'édition entrelacées ON/OFF = 1,89/10 ppm, Durée d'acquisition : 1 h 12 min.
- Image anatomique pondérée en T2 avec la même géométrie que la CSI : TE/TR = 33/2500 ms, Résolution = 0,083x0,083x1,25 mm³, 1 min 20 s d'acquisition, mêmes coordonnées du FOV que la CSI.
- Ajustement de la fréquence locale avec une acquisition PRESS : sur le volume du voxel d'intérêt.
- Acquisition d'une carte de l'eau : même CSI MEGA-LASER que précédemment mais sans suppression de l'eau et avec un seul moyennage. Durée d'acquisition = 19 min.

5.2.2.2 IRM Multiparamétrique

Les acquisitions d'IRM multiparamétrique ont été réalisées une semaine après l'imagerie spectroscopique, soit 5 semaines après l'injection de kaïnate. Ces acquisitions nécessitent la pose d'un cathéter pour l'administration d'agents de contraste.

La séance complète d'IRM dure environ 1 heures, en comprenant la préparation des animaux, les acquisitions et les injections d'agent de contraste. Pour toutes les acquisitions, le FOV est de $15 \times 8,16 \times 0,7 \text{ mm}^3$. La résolution est de $78 \times 78 \times 350 \text{ }\mu\text{m}^3$ pour l'image anatomique et de $136 \times 136 \times 700 \text{ }\mu\text{m}^3$ pour les cartes quantitatives. Le protocole total est basé sur Boux et al. [6], [126] et comprend 7 acquisitions :

- Après le Localizer, acquisition d'une image anatomique pondéré en T2 avec la méthode TurboRare : $TE/TR = 33/2500 \text{ ms}$.
- Carte B_0 .
- Méthode d'imagerie écho-planaire pondérée en diffusion DTI-EPI : $TE/TR = 23,17/3000 \text{ ms}$.
- Acquisition d'une image FAIR-EPI permettant de calculer une carte quantitative de relaxation T1 : $TE/TR = 15/10000 \text{ ms}$.
- Acquisition d'une image de type Multi Slice Muli Echo (MSME) permettant de calculer une carte quantitative de relaxation T2 : $TE/TR = 6/2000 \text{ ms}$ avec 30 images échos.
- Acquisition de deux images de type Multi Gradient Echo (MGE), avant et après injection de particules de Fer super paramagnétique ($200 \mu\text{mol Fe/kg}$, Synomag®-D, Guerbet, Aulnay-sous-Bois, France). Ces images permettront de calculer des cartes quantitatives de relaxation T2*.
- Acquisition d'une image avec la méthode RARE (facteur rare de 32) pour l'obtention d'images pondérées en T1 : $TE/TR = 3/1080 \text{ ms}$, 15 min d'acquisition. Après 1 minute d'acquisition, représentant 2 images, une injection d'un bolus de gadolinium (Dotarem, $200 \mu\text{mol/kg}$) est réalisée. Ces images permettront de quantifier la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique.

5.2.3 Traitement des données

5.2.3.1 CSI MEGA-LASER

Pour effectuer le traitement des données CSI MEGA-LASER selon le workflow présenté Figure 4-15, l'utilisateur doit effectuer les étapes présentées ci-dessous :

- Chargement des données brutes CSI (avec et sans suppression de l'eau) dans CSIapy, puis exportation en fichiers Nifti-MRS.

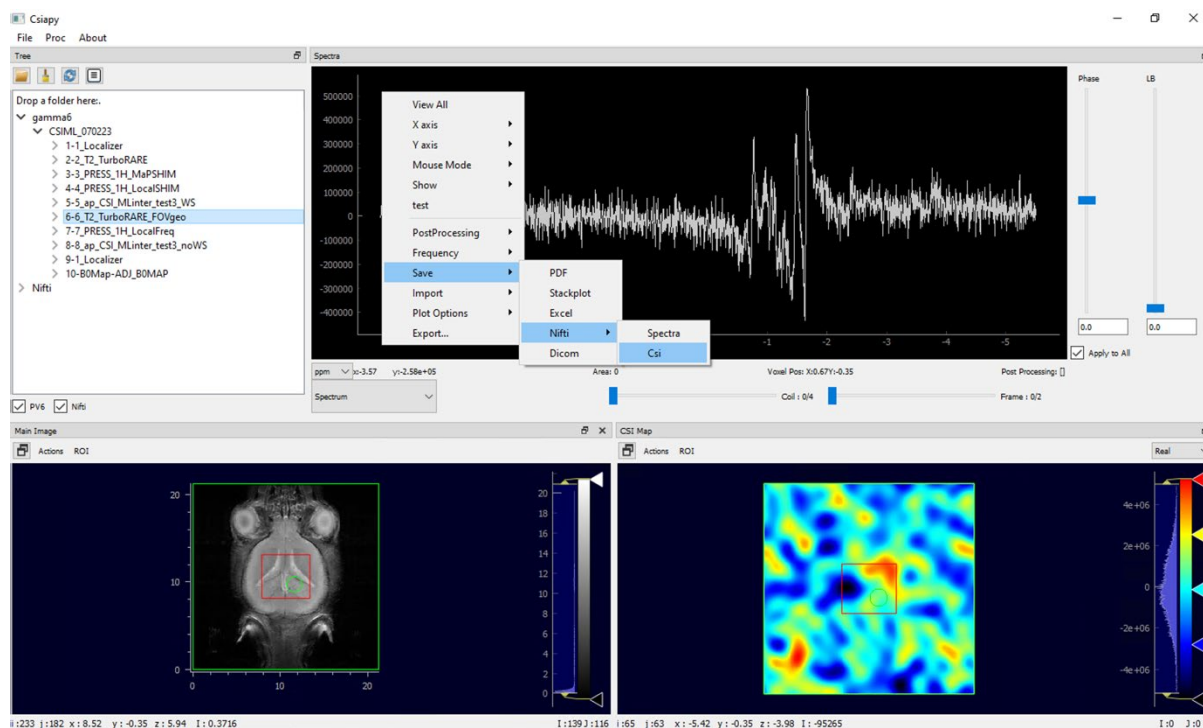


Figure 5-1. Exportation des données brutes Bruker en fichier Nifti-MRS dans CSIapy

- Prétraitement des matrices de spectres par JET dans Matlab (comme décrit partie 4.4). Les résultats sont automatiquement enregistrés en 3 fichiers Nifti-MRS différents : une matrice avec les spectres ON et OFF corrigés, une matrice avec uniquement les spectres OFF corrigés, et la matrice de spectres calculés ON-OFF appelée DIFF.

- Chargement des données corrigées obtenues avec JET dans CSIApy (un exemple de matrice de spectres CSI superposée à l'image anatomique est visible dans l'Annexe 3 Figure A3-1) puis quantification avec AMARES de la matrice de spectres DIFF : obtention des cartes métaboliques de chaque pic présent sur les spectres différences, dont le pic du GABA+ à 3 ppm et du GLX à 3,7 ppm. La quantification se fait selon la taille de la matrice de la carte CSI, puis une interpolation est effectuée pour obtenir des cartes de taille 256x256.

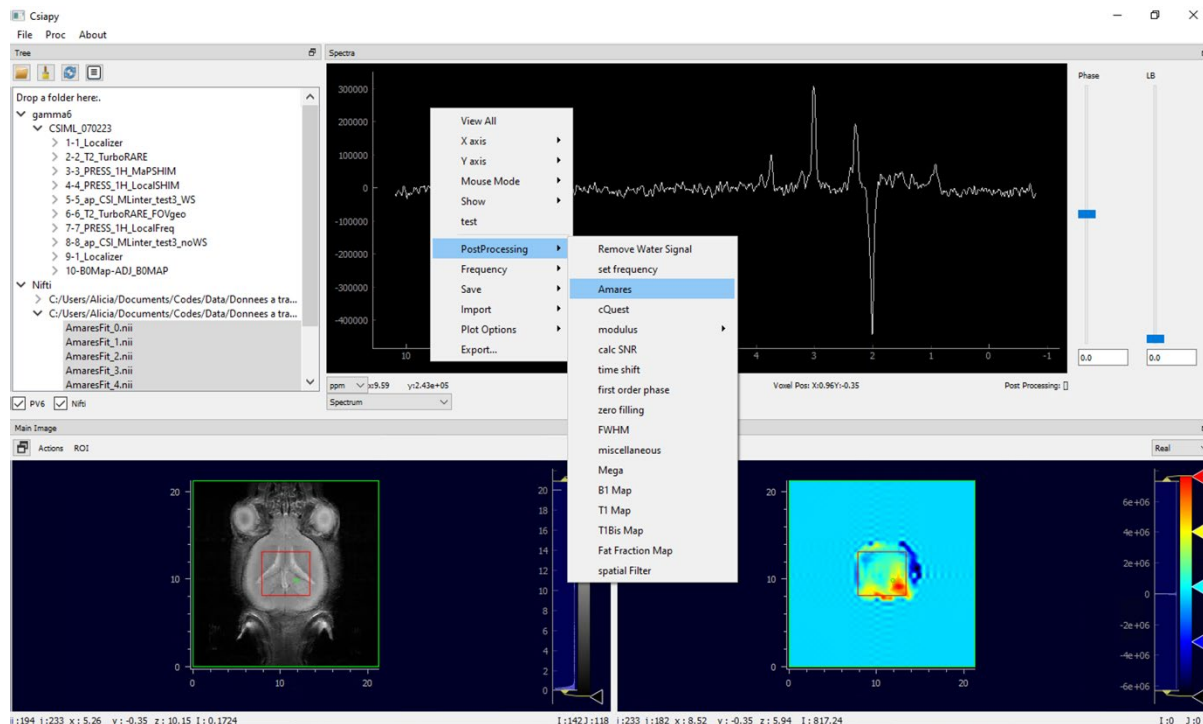


Figure 5-2. Quantification avec AMARES du GABA+ et GLX dans la matrice de spectres Différences (CSI DIFF, prétraités avec JET). Les cartes quantifiées apparaissent dans le dossier de l'acquisition en question (ici la souris gamma 6) et sont des fichiers Nifti-MRS.

- Calcul de la carte GABA+/GLX avec un programme Matlab créé spécialement pour cette fonction. Cette carte est directement enregistrée en format Nifti-MRS dans le dossier où se trouvent les cartes obtenues avec la quantification AMARES.

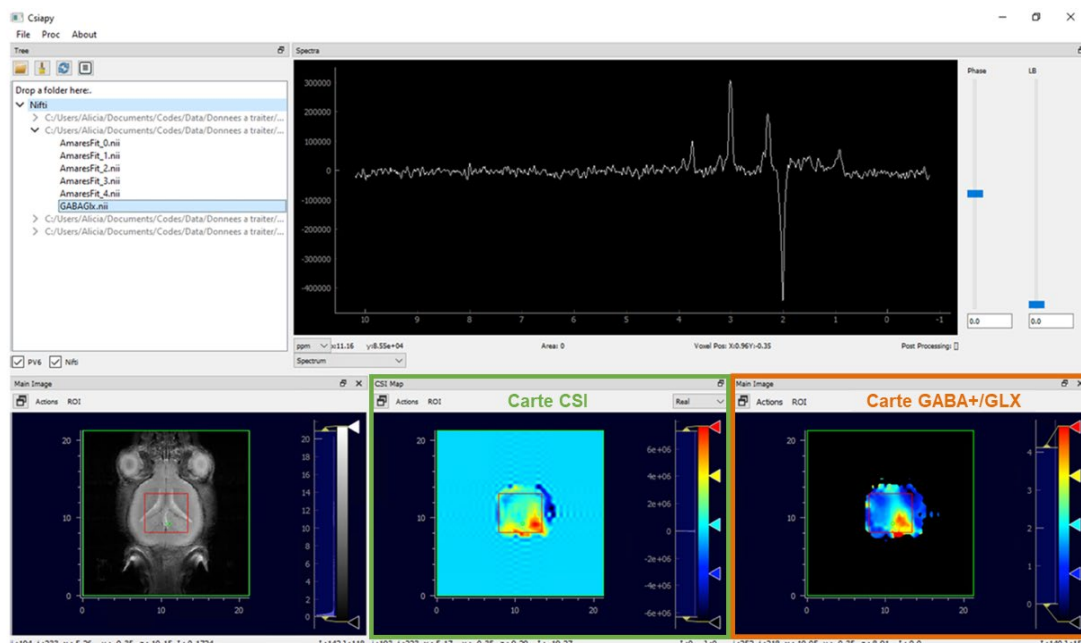


Figure 5-3. Affichage de la carte métabolique GABA+/GLX à droite, obtenue après quantification avec AMARES. En haut, spectre Différence de la zone indiquée par le rond vert sur l'image anatomique.

Après l'obtention de la carte GABA+/GLX, il est possible dans CSIapy de délimiter une région d'intérêt (ROI) (Figure 5-4) pour obtenir la valeur moyenne de la zone sélectionnée. Afin d'être comparable aux résultats publiés dans Hamelin et al., nous avons utilisé 2 ROIs qui englobent les hippocampes dorsaux controlatéral (vert) et ipsilatéral (rouge) de chaque souris. Cela représente environ 4 mm² (de 3,5 à 4,5 mm² en fonction des souris), c'est-à-dire un volume de 5 mm³ avec l'épaisseur de coupe de 1,25 mm. Pour comparaison, le volume de l'étude simple-voxel conduite par Hamelin et al était de 4 mm³ (2x1x2).

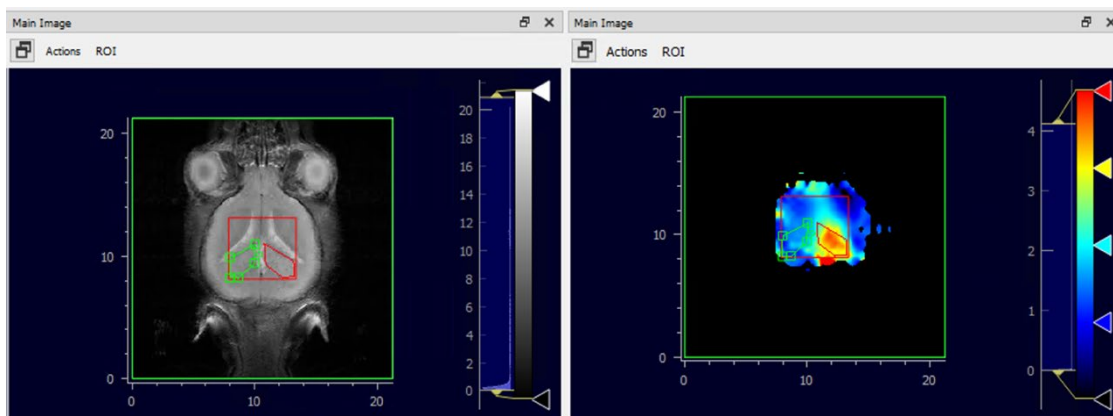


Figure 5-4. Sélection des deux hippocampes dorsaux (le controlatéral en vert et l'ipsilatéral en rouge) sur l'image anatomique, et transfert des géométries sur la carte GABA+/GLX pour obtenir les valeurs moyennes au sein de ces ROIs sélectionnées.

5.2.3.2 IRM multiparamétrique

A partir des acquisitions IRM effectuées, il est possible de calculer les 5 cartes paramétriques : carte T1, carte T2, ADC (Apparent Diffusion Coefficient), BVf (Blood Volume fraction) et BBBp (Blood-Brain Barrier permeability).

Pour l'acquisition DTI (Diffusion Tensor Imaging), la carte ADC (Apparent Diffusion Coefficient) est reconstruite directement après l'acquisition dans ParaVision. Ensuite, les autres cartes quantitatives sont calculées avec un logiciel développé dans l'équipe nommé MP3 [127] :

- Cartes T2 : un module de MP3 permet de d'ajuster automatiquement les modèles de relaxation sur les données d'acquisition multi-échocs afin d'obtenir de valeurs des temps de relaxation de T2 pour chaque voxel.
- Carte T1 : un module de MP3 permet d'ajuster automatiquement un modèle de relaxation spécifiquement pour une séquence de type inversion-récupération afin d'obtenir des temps de relaxation T1 pour chaque voxel.
- BVf : pour chaque acquisition Multi-Gradient Echo (MGE) (pré et post injection des particules de Fer), une carte T2* est calculée. A partir de ces deux cartes, la différence pré et post injection est calculée afin de calculer une carte de $\Delta R2^*$. Pour finir, en utilisant la méthode décrite par Tropès et al. [128], la carte quantitative de volume sanguin est calculée (BVf). Toutes ces analyses sont réalisées dans différents modules inclus dans MP3.
- BBBp : à partir de l'acquisition avec injection de Dotarem, l'aire sous la courbe ΔS (la différence entre le signal $S(t)$ et le signal de référence S_0) pendant 600 secondes (10 minutes) est calculé. Pour les zones où la barrière hématoencéphalique n'est pas endommagée, $S(t) = S_0$, contrairement aux zones endommagées où le signal $S(t)$ augmente au moment de l'injection.

Pour l'analyse des données, le thalamus controlatéral est utilisé pour normaliser les deux hippocampes.

5.2.4 Autres études

5.2.4.1 EEG

Après les acquisitions IRM et de spectroscopie RMN, 6 souris KA-MTLE ont été implantées sous anesthésie générale (induction avec 4% d'isoflurane puis maintien à 1-2%) avec une électrode bipolaire insérée dans l'hippocampe ipsilatéral, aux mêmes coordonnées que l'injection de kaïnate, et une électrode monopolaire placée au-dessus du cervelet. L'électrode bipolaire était constituée de deux fils d'acier inoxydable isolés par email torsadés (diam : 170 μm , distance entre les pointes : 0,4-0,8 mm) connectés à un connecteur femelle. Les électrodes et le connecteur femelle étaient fixés au crâne avec du cyanoacrylate et du ciment dentaire acrylique.

7 jours plus tard l'activité iEEG a été enregistrée (3 heures, Coherence, Deltamed ; fréquence d'échantillonnage = 1024 Hz, thèse en cours de Loan Samalens) et en parallèle les souris étaient enregistrées en vidéo. Les animaux étaient toujours placés dans la cage de test pendant 90 minutes avant l'enregistrement pour l'habituation. Les données ont été analysées en calculant par heure la durée totale des crises, la durée moyenne d'une crise, le nombre de crises et l'intervalle moyen entre les crises.

5.2.4.2 RMN ^1H HRMAS

Pour effectuer les acquisitions en RMN HRMAS, 17 souris KA-MTLE ont été euthanasiées par décapitation 1 semaine après les acquisitions IRM et de spectroscopie RMN (c'est-à-dire, 6 semaines après l'injection de kaïnate) et nous avons collecté 2 échantillons par animal dans les 4 minutes (hippocampe dorsal ipsilatéral (HDI) et controlatéral (HDC)). Ils ont été immédiatement congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C .

Tous les spectres de RMN HRMAS ^1H ont été acquis sur un spectromètre Bruker Avance III (IRMaGe, CEA-Grenoble) à 500 MHz. Les échantillons étaient mis en rotation à 4000 Hz et la température maintenue à 4°C pour toutes les expériences. Les spectres unidimensionnels ont été acquis en utilisant une séquence d'impulsion Carr-Purcell-Meiboom-Gill (TE = 30 ms, 256 scans, acquisition de 17 minutes). Le signal d'eau résiduel était présaturé pendant 1,7 seconde. Les métabolites suivants ont été quantifiés avec jMRUI selon Hamelin et al. [5] : acétate, alanine, ascorbate, choline, GABA, glutamate, glutamine, glutathion, phosphorylcholine, glycérophosphorylcholine, glycine, lactate, myo-inositol, NAA, phosphocréatine, phosphoéthanolamine, scyllo-inositol, taurine (voir Figure 5-12).

5.2.4.3 Immunohistologie

Les immunomarquages ont été réalisés comme décrit précédemment [129]. Les souris ont été anesthésiées et perfusées transcordialement avec du paraformaldéhyde à 4% dans du PBS pendant 3 minutes. Les cerveaux ont été retirés du crâne et fixés toute la nuit dans du PFA à 4% à 4°C, puis dans du saccharose à 15% (Sigma) dans du PBS à 4°C. Les cerveaux ont été coupés en sections coronales de 30 µm sur un cryostat et collectés dans du PBS. Les sections ont été utilisées pour l'immunohistochimie sur lames, avec un marquage des noyaux des cellules par DAPI, des enzymes GAD65 et GAD67, et des astrocytes grâce au GFAP :

- Fixation avec du ExCell Plus.
- Trois lavages de 5 minutes au PBS.
- Incubation des coupes avec du PBS-GTS (PBS + 0.2% gélatine + 0.5% TritonX-100 + 0.1% saponine + 0.1% sodium azide) pendant 10 minutes.
- Trois lavages de 5 minutes au PBS.
- Incubation avec les anticorps primaires pendant une nuit à température ambiante : anticorps anti-GAD65 dilués à 1/1000 (Anticorps polyclonal purifié rabbit, Synaptic Systems ; Référence 198 103), anticorps GAD67 dilués à 1/1000 (Anticorps monoclonal purifié mouse, Synaptic Systems ; Référence 198 211) et anticorps anti-GFAP dilués à 1/500 (Anticorps polyclonal purifié chicken, Synaptic Systems ; Référence 173 006).
- Trois lavages de 5 minutes au PBS.
- Incubation avec les anticorps secondaires pendant 3 heures : anticorps Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, #A21206) et Donkey anti-mouse (ThermoFisher Scientific, #A31570), et anticorps Donkey anti-chicken Alexa Fluor 647 (ThermoFisher Scientific, #A78952).
- Trois lavages de 5 minutes au PBS et DAPI.

Les lames ont ensuite été observées à l'Axioscan (x20, PIC-GIN) puis au Confocal grâce à Yasmina Saoudi (PIC-GIN) au x20 et x63. Les images acquises ont été analysées avec les logiciels Zeiss Zen 3.8 et QuPath 0.5.0.

5.2.4.4 Western Blot

L'objectif principal de cette étude est de déterminer s'il y a un changement de production des enzymes GAD65 et GAD67 dans les hippocampes sclérosés des souris KA-MTLE. Pour effectuer ce protocole, 10 souris (5 KA-MTLE et 5 SHAM) ont été euthanasié par décapitation 1 semaine après les acquisitions IRM et de spectroscopie RMN (c'est-à-dire, 6 semaines après l'injection de kaïnate) et avons collecté 2 échantillons par animal à 0-4°C dans les 4 minutes (hippocampe dorsal ipsilatéral (HDI) et controlatéral (HDC)). Ils ont été immédiatement congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C.

Puisque le nombre d'échantillons n'était pas très important nous avons fait 3 répliques.

Le protocole suivant a été réalisé par des biologistes du GIN Nacera El Bakdouri et Frédérique Vossier :

- Préparation de l'échantillon et dosage des protéines : Broyage des tissus, lyse cellulaire, et mesure de la concentration en protéines.
- Prétraitement des échantillons : Chauffage à 95°C pendant 5 minutes.
- Chargement des échantillons sur deux gels identiques, nommés A et B, préfabriqués de 15 puits (Mini Protean TGX Stain free gel, 4-15%, Biorad) selon la Figure 5-5, avec le marqueur de taille Precision Plus Protein All Blue Standarts Biorad.

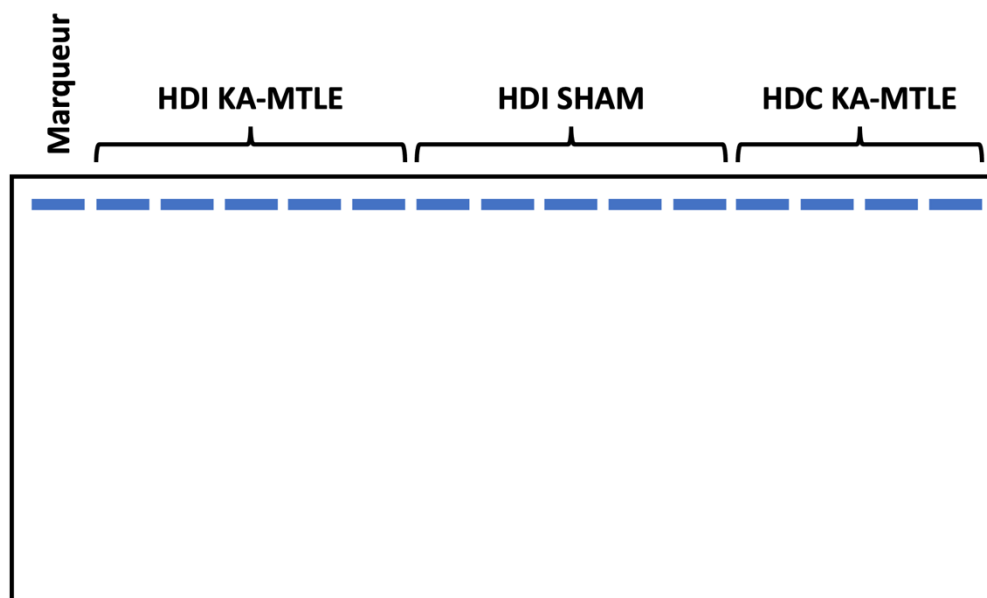


Figure 5-5. Schéma d'un gel de 15 puits avec la disposition des différents échantillons : hippocampe dorsal ipsilatéral (HDI) de souris KA-MTLE ($n = 5$), hippocampe dorsal ipsilatéral (HDI) de souris SHAM ($n = 5$), et hippocampe dorsal controlatéral (HDC) de souris KA-MTLE ($n = 4$).

- Migration électrophorétique : Réalisation à 200V pendant 40 minutes dans un appareil Biorad pour séparer les protéines par taille.
- Détection des protéines : Placement des gels dans une solution de tampon TG et visualisation par méthode Stain Free.
- Transfert sur membrane de nitrocellulose : Utilisation d'un programme spécifique (1.3A, 25V, 7 minutes) dans le même appareil que pour la migration
- Coloration au rouge ponceau : Application sur les membranes pendant 1h40 pour visualiser les protéines transférées (Figure 5-6).

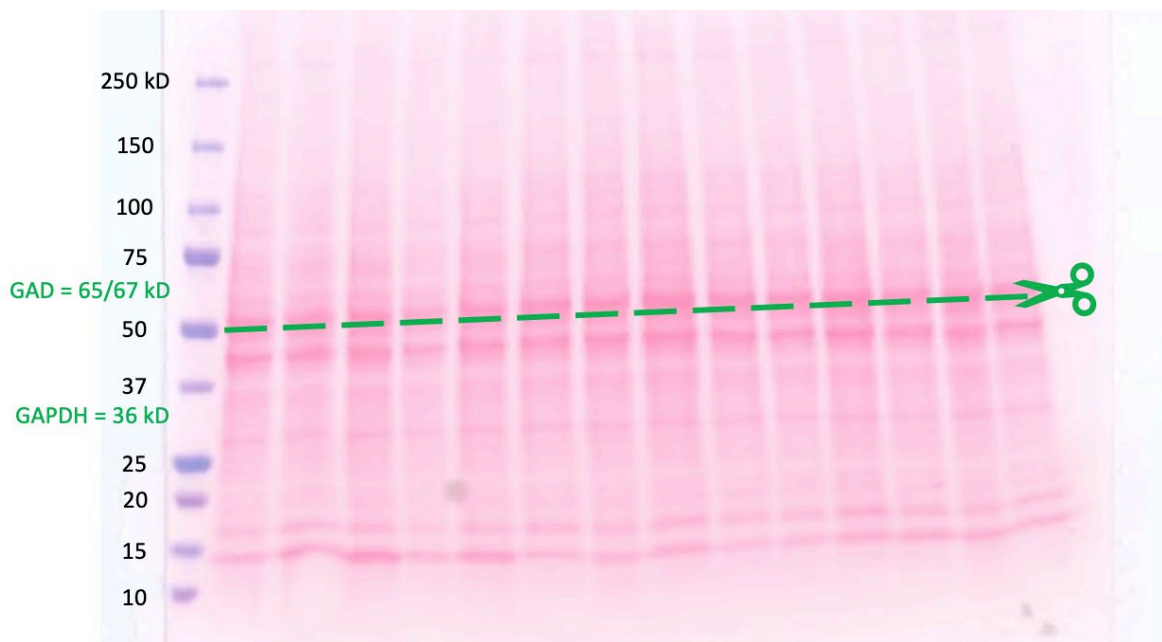


Figure 5-6. Membrane colorée au rouge ponceau. Il est indiqué en vert la limite à 50 kD où la membrane est coupée en deux pour pouvoir incuber avec les anticorps anti-GAD et anti-GAPDH par la suite.

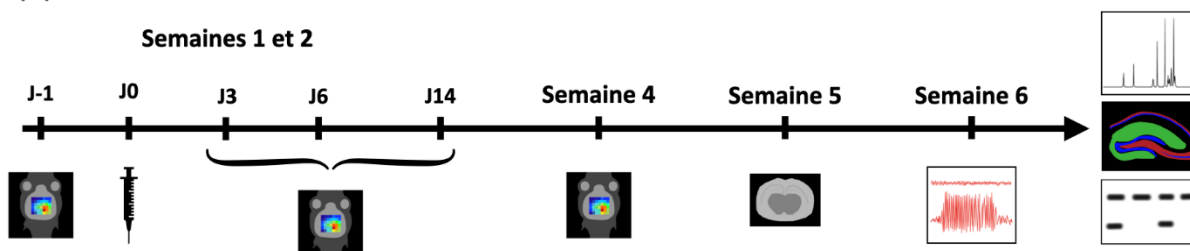
- Blocage des membranes : Incubation dans une solution de BSA (Bovine Serum Albumine) à 5% dans TBS Tween 0.1% pendant 1h05.
- Application des anticorps primaires : Après le blocage, les deux membranes ont été découpées au niveau du marqueur de poids moléculaire de 50kDa (Figure 5-6), pour pouvoir effectuer deux marquages différents. Incubation nocturne à froid avec agitation, en utilisant des anticorps spécifiques dilués dans une solution de BSA 5% dans TBS Tween 0.1 par une incubation pendant la nuit avec des anticorps primaires spécifiques. GAD65 = 65kDa, GAD67 = 67kDa, GAPDH (gène de ménage) = 37kDa.
 - Membrane A1 : Anticorps anti-GAD65 (Anticorps polyclonal purifié de lapin, Synaptic Systems ; Référence 198 103) à une dilution de 1/10 000.

- Membrane B1 : Anticorps GAD67 (Anticorps monoclonal purifié de souris, Synaptic Systems ; Référence 198 211) à une dilution de 1/10 000.
- Membranes A2 et B2 : Anticorps anti-GAPDH (Anticorps monoclonal purifié de lapin, Cell Signaling, Référence 2118) à une dilution de 1/100 000.
- Lavages des membranes : 3 cycles de 5 minutes avec du TBS Tween 0.1%, suivi d'un lavage final de 5 minutes avec du TBS.
- Application des anticorps secondaires : Incubation pendant 40 minutes avec les anticorps secondaires appropriés, dilués spécifiquement.
 - Membranes A1, A2 et B2 : Anticorps anti-Rabbit HRP (Jackson Immuno Research ; Référence 111-036-47) à une dilution de 1/40 000.
 - Membrane B1 : Anticorps anti-Mouse HRP Millipore ; Référence 12-349) à une dilution de 1/10 000 + Anticorps anti-Rabbit HRP (Jackson Immuno Research ; Référence 111-036-47) à une dilution de 1/40 000.
- Lavages des membranes : tampon TBS Tween 0.1% (au moins 3 cycles de lavage de 5 minutes chacun) puis un lavage final avec du tampon TBS pendant 5 minutes.
- Révélation des protéines : Utilisation d'un révélateur ECL ultra-sensible pendant 1 minute.
- Visualisation au Chemidoc : les images ont été capturées à intervalles de temps réguliers pour suivre la progression de la révélation.

5.2.5 Récapitulatif du protocole expérimental

Au total, 5 séries d'expériences ont été réalisées en 1 an, conduisant à un total de 64 souris : 45 KA-MTLE et 17 SHAM. Le taux de mortalité après l'injection était de 10% pour le groupe SHAM et 20% pour le groupe KA-MTLE. De plus, pour ce dernier groupe, 4 souris ont été exclues car elles ne présentaient pas de lésion hippocampique visible sur l'IRM anatomique 4 semaines après l'injection. La Figure 5-7 récapitule les effectifs pour tous les protocoles expérimentaux.

(A)



(B)


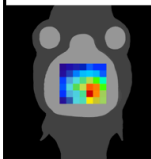

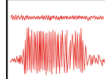
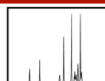
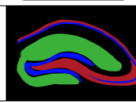
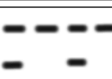
Protocole	Temps par rapport à l'injection de Kainate	Groupes	
		Sham	KA-MTLE
 Injection de KA/NaCl	0	17	34
 Imagerie Spectroscopique	1 jours avant	4/51	
	+3 jours		3/34
	+6 jours		4/34
	+14 jours		3/34
 IRM multiparamétrique	5 semaines	3/17	6/34
 EEG	6 semaines		6/34
 HRMAS		6/17	10/34
 Immunohistologie	Après euthanasie de l'animal et congélation du cerveau		2/34
 Western Blot		5/17	5/34

Figure 5-7. (A) Diagramme temporel des expérimentations in vivo et ex vivo. (B) Récapitulatif de la taille des groupes pour chaque protocole expérimental effectué.

5.3 Résultats

5.3.1 Modification morphologique de l'hippocampe après injection de kaïnate

L'imagerie anatomique haute résolution a été réalisée lors de chaque acquisition d'imagerie spectroscopique, donc 4 semaines après l'injection, mais aussi un jour avant, puis 3, 6, 14 jours après, pour quelques individus (voir Figure 5-7). La Figure 5-8 présente l'hypersignal en T2 correspondant à la lésion corticale unilatérale et l'œdème à J+3 et J+6 après l'injection, puis la lésion de l'hippocampe à partir de J+14.

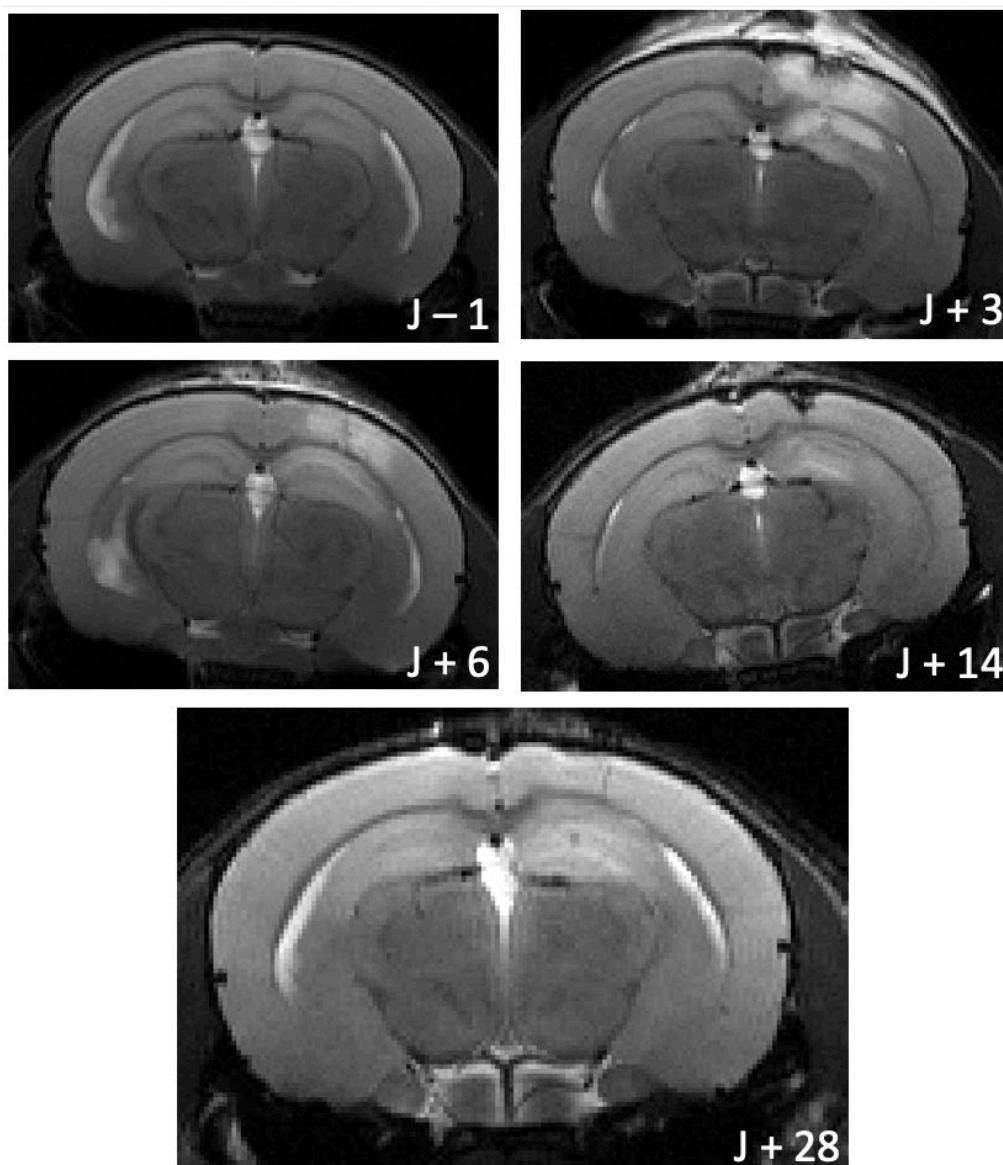


Figure 5-8. IRM montrant l'évolution des lésions hippocampiques jusqu'à 28 jours après l'injection de kaïnate. L'œdème est visible à J+3 et J+6 (hypersignal), puis la sclérose de l'hippocampe dès J+14 (perte de structuration de l'hippocampe).

5.3.2 Identification de la zone épileptogène

5.3.2.1 Variation de GABA+/GLX chez les souris KA-MTLE

Après avoir effectué le protocole de traitement des données CSI MEGA-LASER présenté précédemment (5.2.3.1), les cartes GABA+/GLX peuvent être visualisées. La Figure 5-9 regroupe ces cartes obtenues 4 semaines après l'injection, superposées à l'image anatomique, pour 12 souris KA-MTLE et 3 SHAM. Ces individus sont repartis sur les 5 séries effectuées. L'augmentation du ratio est clairement visible dans l'hippocampe droit injecté pour le groupe KA-MTLE. Cependant, en fonction des souris, ce ratio n'est pas homogène dans l'hippocampe ipsilatéral (souris 1 et 4 par exemple). Des spectres obtenus dans chaque ROI chez 8 de ces souris sont visibles dans l'Annexe 3 (Figure A3-2 et Figure A3-3). Des artefacts sont aussi observés par exemple sur la souris 4, au niveau des ventricules sur le bord supérieur du voxel d'intérêt.

Ensuite, nous avons calculé les valeurs moyennes de GABA+/GLX dans les deux hippocampes (HDI = hippocampe dorsal ipsilatéral et HDC = hippocampe dorsal controlatéral). La Figure 5-10 montre une augmentation de 56 % du ratio GABA+/GLX dans l'hippocampe ipsilatéral du groupe KA-MTLE comparé à l'hippocampe controlatéral, et 71% par rapport à l'hippocampe ipsilatéral du groupe SHAM (valeurs moyennes : KA-MTLE HDI = $2,313 \pm 0,114$, KA-MTLE HDC = $1,478 \pm 0,076$, SHAM HDI = $1,349 \pm 0,1$). Nous pouvons également observer sur cette figure la variabilité au sein des groupes, notamment pour l'hippocampe ipsilatéral des souris KA-MTLE, en accord avec les cartes métaboliques de la Figure 5-9. Cependant, cette variabilité est aussi observée pour le controlatéral et les deux hippocampes du groupe SHAM.

Parmi ces souris, une étude RMN HRMAS *ex vivo* a été réalisée sur 17 d'entre-elles (11 KA-MTLE et 6 SHAM) (voir protocole paragraphe 5.2.4.2). La biopsie analysée *ex vivo* correspond à la totalité de l'hippocampe dorsal, controlatéral et ipsilatéral. La Figure 5-11 montre la corrélation ($R^2 = 0,7926$) entre le GABA+/GLX de l'hippocampe ipsilatéral mesuré chez les mêmes animaux à la fois *in vivo* et *ex vivo*. Ces résultats sont en accord avec ceux de Hamelin et al. où la méthode MEGA-PRESS simple-voxel avait été utilisée. Dans cette figure, nous retrouvons les résultats correspondant aux cartes GABA+/GLX de 2 souris SHAM et 6 KA-MTLE présentées dans la Figure 5-9. Un exemple de deux spectres obtenus chez une souris KA-MTLE pour les deux hippocampes est visible Figure 5-12.

Dans les données *ex vivo*, nous retrouvons également la variabilité observée *in vivo*, même chez les souris SHAM. Pour réduire cet effet lors de l'analyse des données, notamment lorsque l'effectif est faible, nous avons par la suite normalisé les résultats de l'hippocampe dorsal ipsilatéral par le controlatéral.

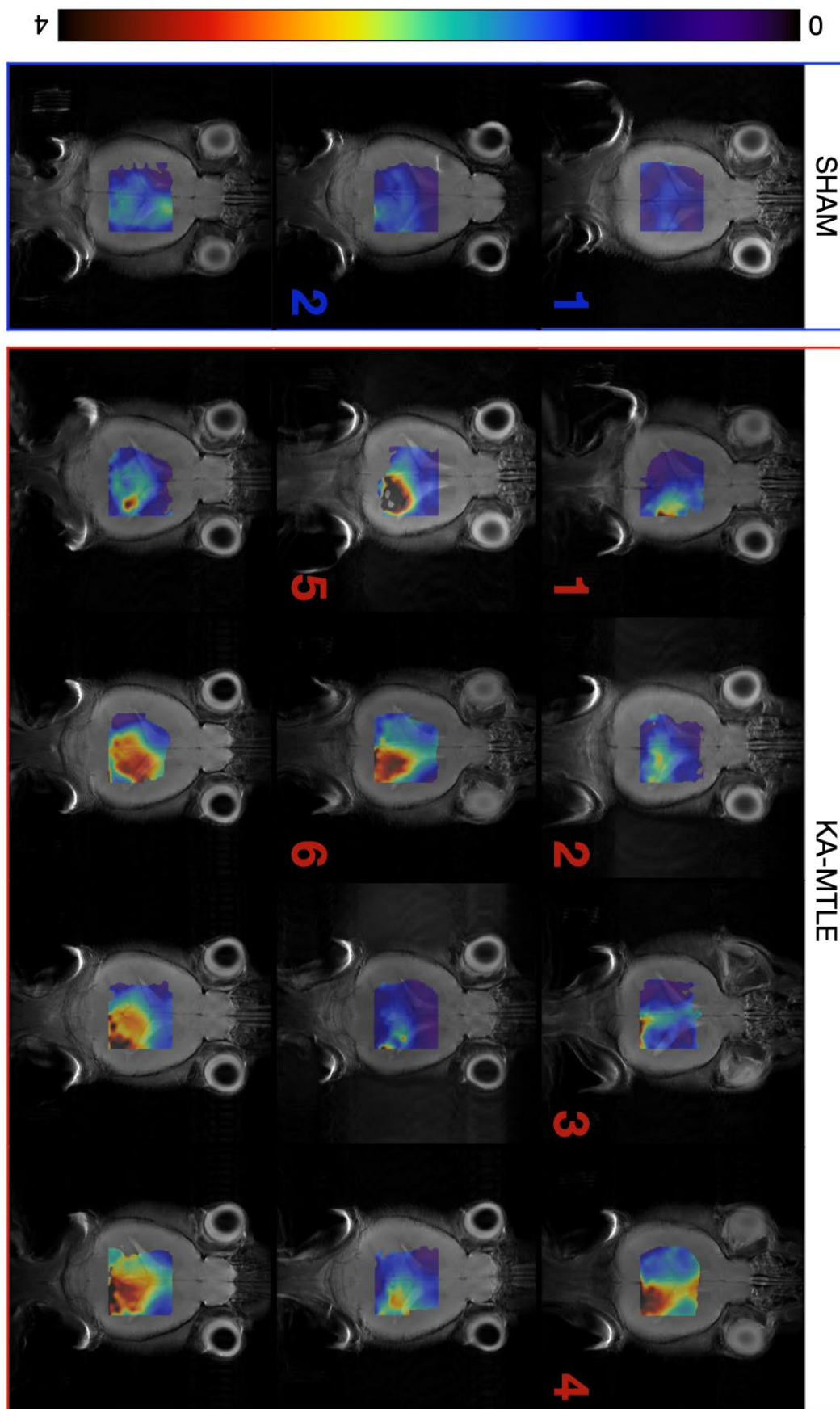


Figure 5-9. Exemples de cartes $GABA^+/GLX$ de souris KA-MTLE et SHAM, superposées à l'image anatomique. On observe que le ratio n'est pas homogène au sein de l'hippocampe ipsilatéral.

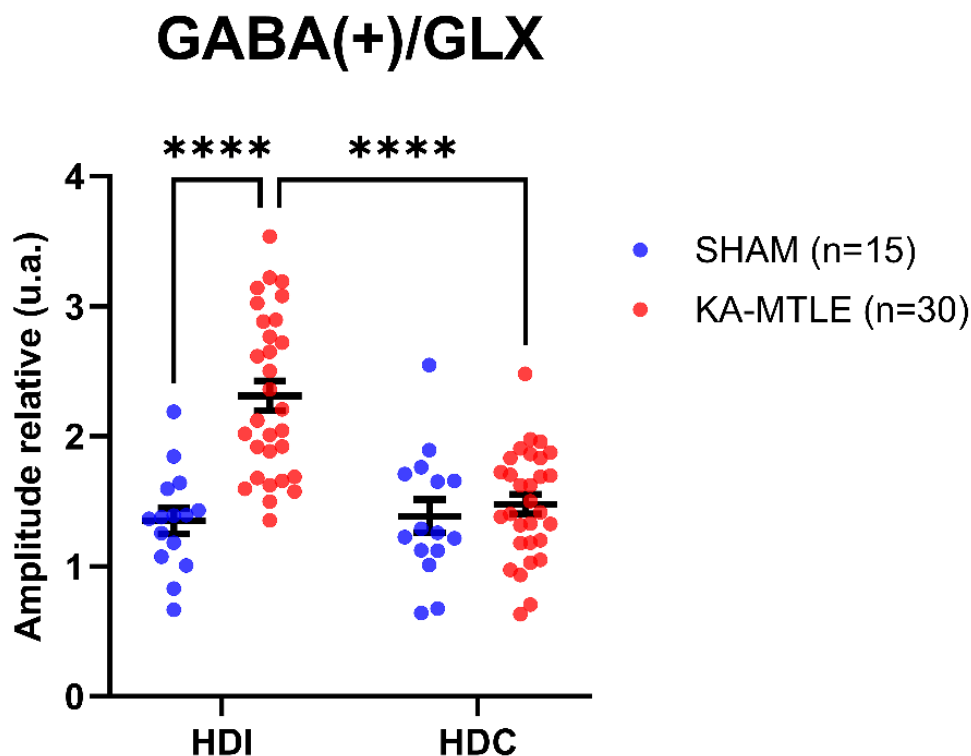


Figure 5-10. Comparaison de la valeur moyenne du GABA+/GLX dans l'hippocampe dorsal ipsilatéral (HDI) et controlatéral (HDC) des groupes KA-MTLE et SHAM. **** $P < 0,0001$. Analyse paramétrique ANOVA à deux facteurs.

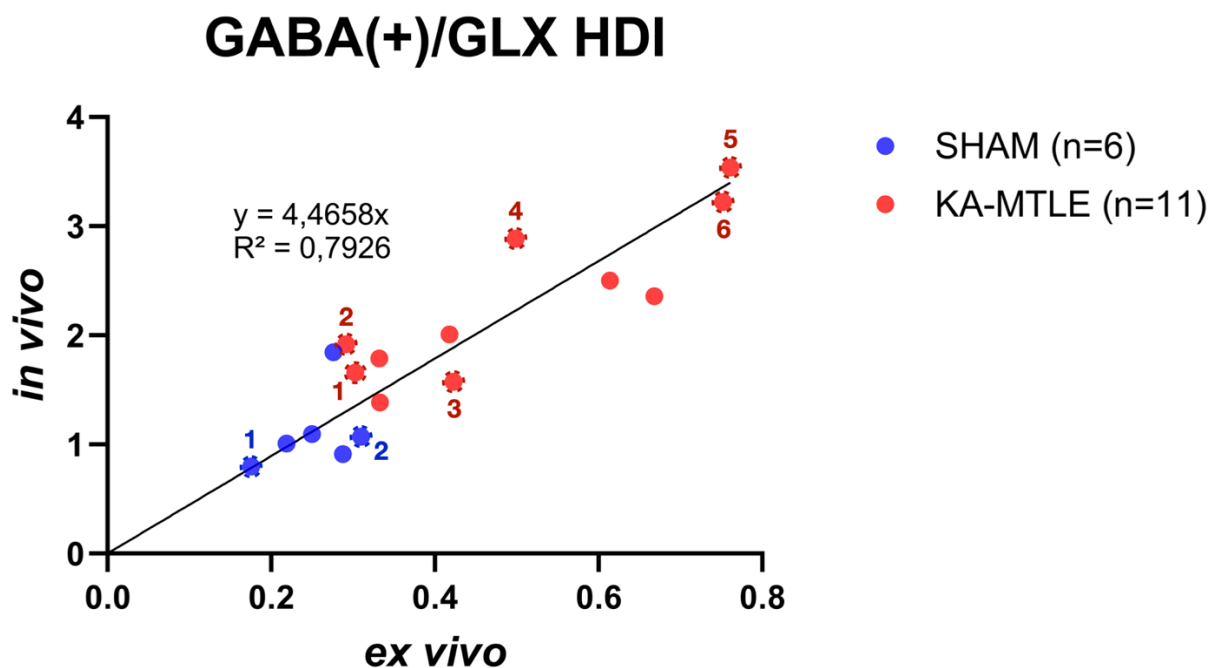


Figure 5-11. Corrélation entre le ratio GABA+/GLX du HDI mesuré *in vivo* (CSI MEGA-LASER) et *ex vivo* (HRMAS). $P < 0.0001$. Test de corrélation Spearman. Les numéros correspondent aux numéros des cartes GABA+/GLX de la Figure 5-9.

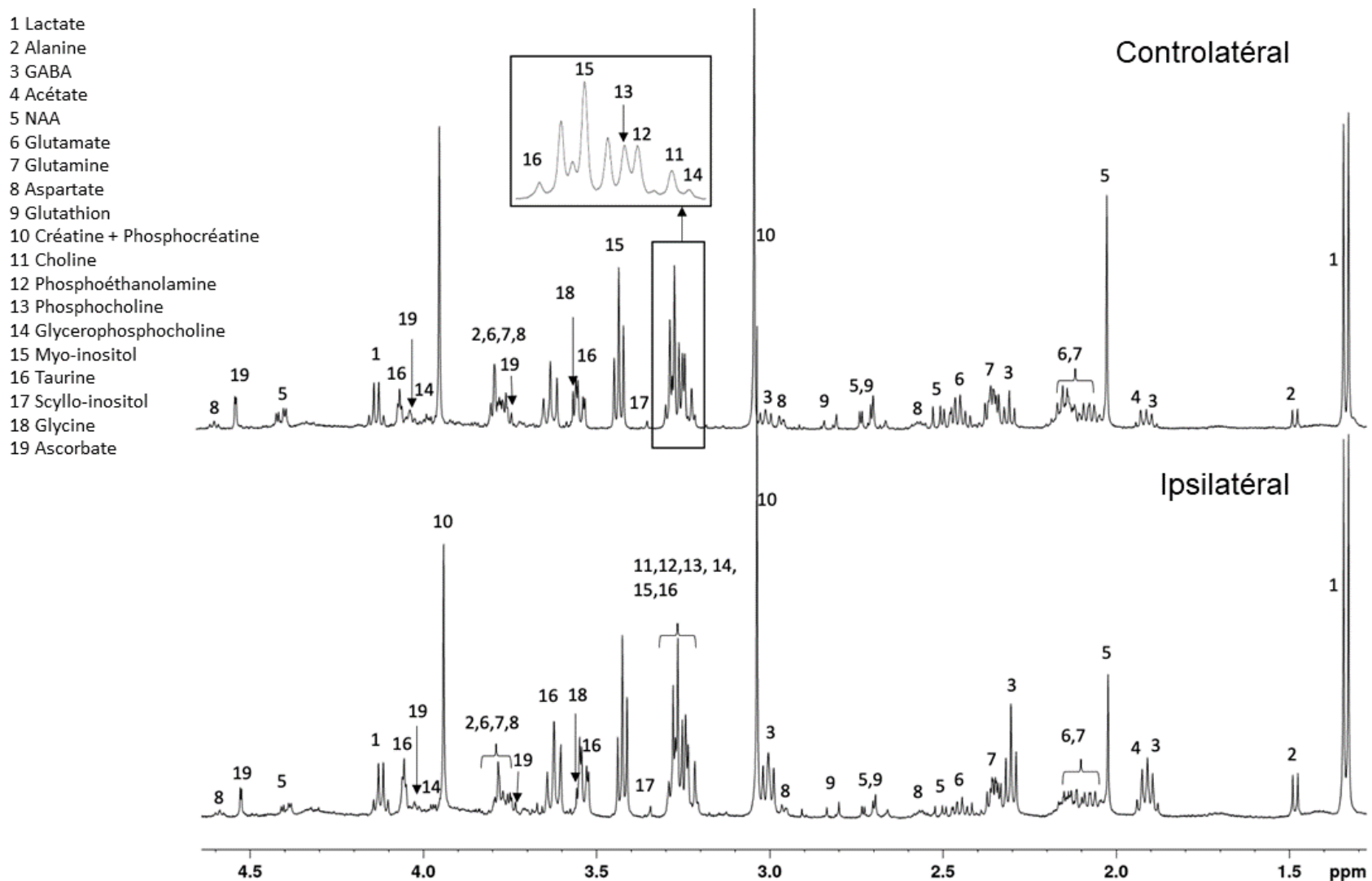


Figure 5-12. Exemple de spectres HRMAS obtenus dans les hippocampes dorsaux ipsilatéral et controlatéral chez une souris KA-MTLE [5]. On observe l'augmentation du GABA et la diminution de la Glutamine et du Glutamate.

En normalisant les données de la Figure 5-11 sur l'hippocampe controlatéral, nous pouvons observer Figure 5-13 que le ratio GABA+/GLX du groupe KA-MTLE est environ 100% plus haut que le groupe SHAM, qu'il soit mesuré *in vivo* ou *ex vivo* (respectivement 90% et 114%). De nouveau, ces résultats sont en adéquation avec les résultats de Hamelin et al.

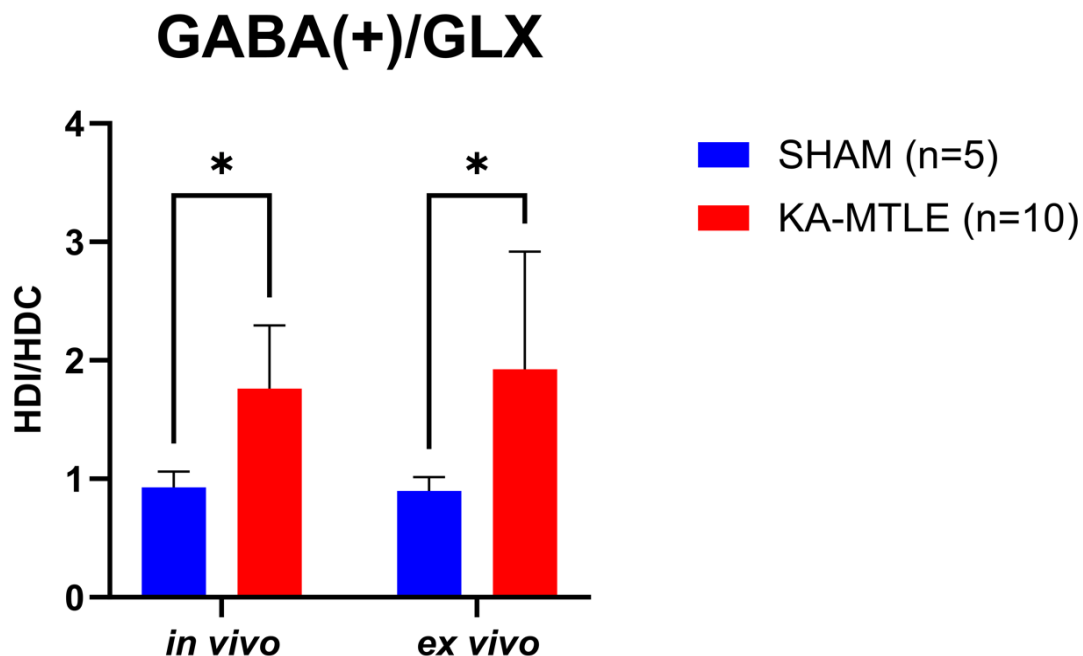


Figure 5-13. Comparaison du ratio GABA+/GLX dans l'hippocampe ipsilatéral entre souris KA-MTLE et SHAM, mesuré *in vivo* (CSI MEGA-LASER) ou *ex vivo* (HRMAS) et normalisé sur l'hippocampe controlatéral (HDI/HDC). * $P < 0,005$, Test multiple Mann-Whitney avec correction Holm-Šidák.

5.3.2.2 Variation de GABA+/GLX au cours de la période d'épileptogénèse.

Ensuite, l'objectif était d'effectuer une étude longitudinale de l'évolution du GABA sur quelques individus. Cependant, les acquisitions un jour avant l'injection, puis 3, 6 et 14 jours après, n'ont pas pu être réalisées sur les mêmes souris. La chirurgie lors de l'injection de kaïnate, suivie du status epilepticus, affaiblit les animaux. Les acquisitions d'imagerie spectroscopique proche de cette injection sont donc complexes à réaliser car l'anesthésie nécessaire pour ces acquisitions (2 heures) est souvent mal supportée par l'animal. Pour les résultats préliminaires présentés ci-dessous Figure 5-14, une seule acquisition a été faite, en plus de l'acquisition habituelle réalisée à 4 semaines (J+28), pour un total maximum de 2 acquisitions d'imagerie spectroscopique par individu. Même si l'effectif pour chaque groupe est faible, l'augmentation du GABA+/GLX montre une tendance à la progression relativement linéaire, jusqu'à 4 semaines. Des acquisitions après 4 semaines ont été réalisées par Hamelin et al. et n'ont pas montré d'augmentation supplémentaire.

Evolution temporelle du GABA(+)/GLX

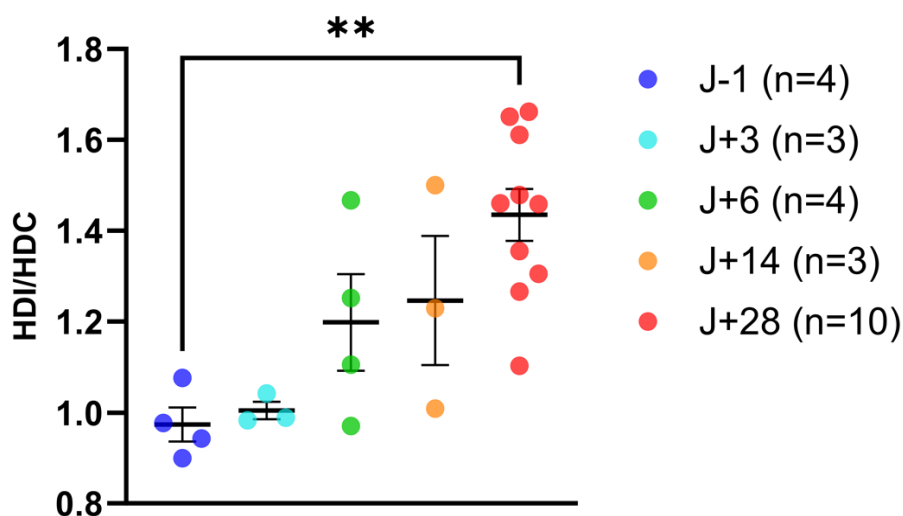


Figure 5-14. Évolution temporelle du ratio GABA+/GLX dans l'hippocampe ipsilatéral chez des souris KA-MTLE, normalisé sur l'hippocampe controlatéral (HDI/HDC). * $P < 0,01$. Test Kruskal-Wallis avec correction Dunn.

5.3.2.3 Analyse multiparamétrique

L'objectif des acquisitions IRM pour l'analyse paramétrique était de reproduire les résultats de Boux et al, qui caractérisent la perfusion et vascularisation du modèle animal KA-MTLE, et d'évaluer une éventuelle corrélation avec le ratio GABA+/GLX. Cependant, la mise en place de ce protocole a été complexe car le taux de mortalité lors des premières acquisitions était d'environ 40%. De plus, ces acquisitions requièrent la pose d'un cathéter pour l'injection des agents de contraste, une procédure délicate dont le taux de réussite n'a été que de 50%. Presque la totalité des individus de l'étude qui avaient le protocole d'imagerie spectroscopique ont également eu des acquisitions IRM multiparamétrique (21 KA-MTLE et 11 SHAM), mais à cause de ces problématiques, des résultats n'ont été obtenus que sur seulement 6 souris KA-MTLE et 3 SHAM. Malgré cela, une augmentation de 36% de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) a été mesurée entre l'hippocampe ipsilatéral et le controlatéral chez les souris KA-MTLE, et de 25% comparé à l'hippocampe ipsilatéral du groupe SHAM. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Boux et al. Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre la perméabilité de la BHE et le taux de GABA, cependant le nombre faible d'individus limite la puissance statistique et ne permet pas de conclure.

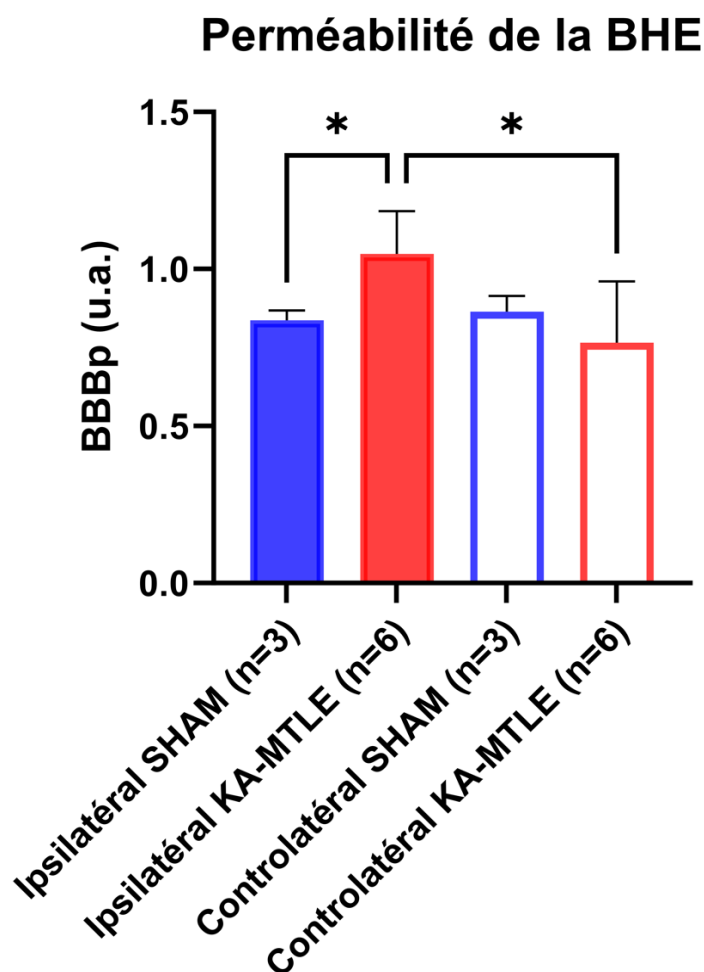


Figure 5-15. Comparaison de la perméabilité de la Barrière Hémato-encéphalique dans les hippocampes de souris KA-MTLE et SHAM. * $P \leq 0,05$ Test Kruskal-Wallis avec correction Benjamini, Krieger et Yekutieli.

5.3.2.4 EEG : validation de l'épilepsie

L'épilepsie a été validée par EEG chez 6 souris KA-MTLE : par heure, le nombre moyen de crises est de $52,8 \pm 6,2$, avec une durée moyenne de $26,7 \pm 2,7$ secondes, et un intervalle entre les crises de 79 ± 6 secondes. Le tout correspond à une durée cumulée moyenne sur une heure de 1405 ± 152 secondes. Ces résultats correspondent à ceux retrouvés dans la bibliographie pour ce modèle [38], [124]. Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre ces paramètres EEG et le taux de GABA+/GLX de ces souris, cependant le faible effectif limite l'analyse et ne permet pas de conclure.

5.3.2.5 Immunohistologie

Pour rappel, les marquages effectués selon le protocole paragraphe 5.2.4.3 sont les suivants : DAPI → noyaux ; GAD65 et GAD67 = enzymes Glutamate décarboxylase 65 et 67 ; GFAP → astrocytes.

Sur la Figure 5-17, le marquage au DAPI permet d'observer l'organisation cellulaire en couches dans l'hippocampe dorsal controlatéral. Nous avons essayé de quantifier le nombre de cellules sur 4 coupes (4 HDI et 4 HDC) à l'aide du logiciel QuPath-0.5.0. Cependant, les cellules étant regroupées dans le gyrus denté côté controlatéral, leur quantification précise n'est pas possible (Figure 5-16). Nous avons cependant observé une diminution du nombre de cellules côté ipsilatéral. Ces résultats concordent avec ceux retrouvés dans la bibliographie [37], [124].

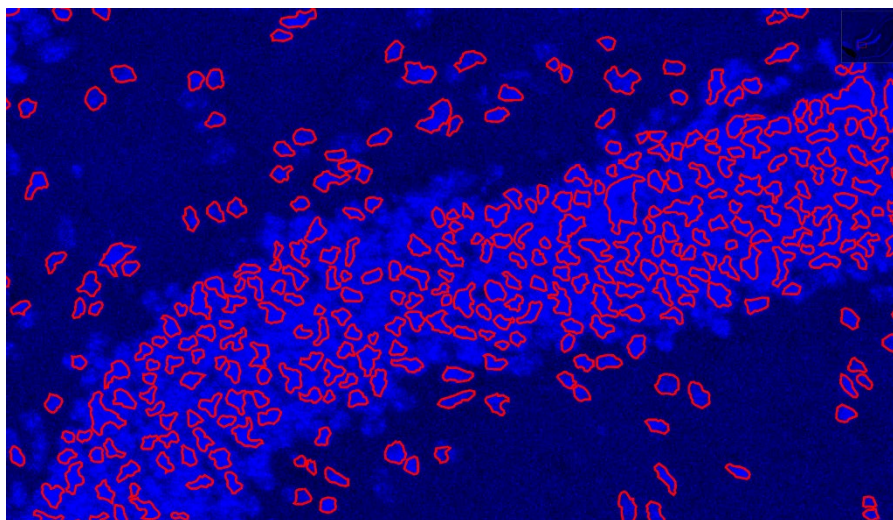


Figure 5-16. Exemple de la détection des noyaux (entourés en rouge) effectuée dans QuPath-0.5.0 pour un hippocampe controlatéral au niveau du gyrus denté.

On peut aussi observer sur les images de la Figure 5-17 avec les 3 marquages superposés (GAD65, GAD67 et DAPI) que les deux enzymes du métabolisme du GABA GAD67 et GAD65 semblent majoritairement situées dans des zones différentes comparé à l'hippocampe controlatéral :

- GAD67 dans la couche granulaire du gyrus denté et le long de la couche pyramidale de la corne d'Ammon ;
- GAD65 dans la couche moléculaire du gyrus denté et le stratum lacunosum-moleculare de la corne d'Ammon.

Dans l'hippocampe ipsilatéral, aucune organisation n'est visible sur les images, ni avec le marquage des noyaux au DAPI, ni avec les GAD65 et 67. Mais le marquage avec la GAD65 semble faire apparaître des structures astrocytaires majoritairement dans le HDI. La Figure 5-18 montre la combinaison du marquage des astrocytes au GFAP avec celui de la GAD65. Une prolifération des astrocytes est visible côté ipsilatéral, correspondant à ce qui a été rapporté dans la bibliographie [37], [124]. Le marquage de la GAD65 semble être colocalisé avec les astrocytes. Pour vérifier cela, deux images, une dans chaque hippocampe, ont été acquises avec un objectif x63.

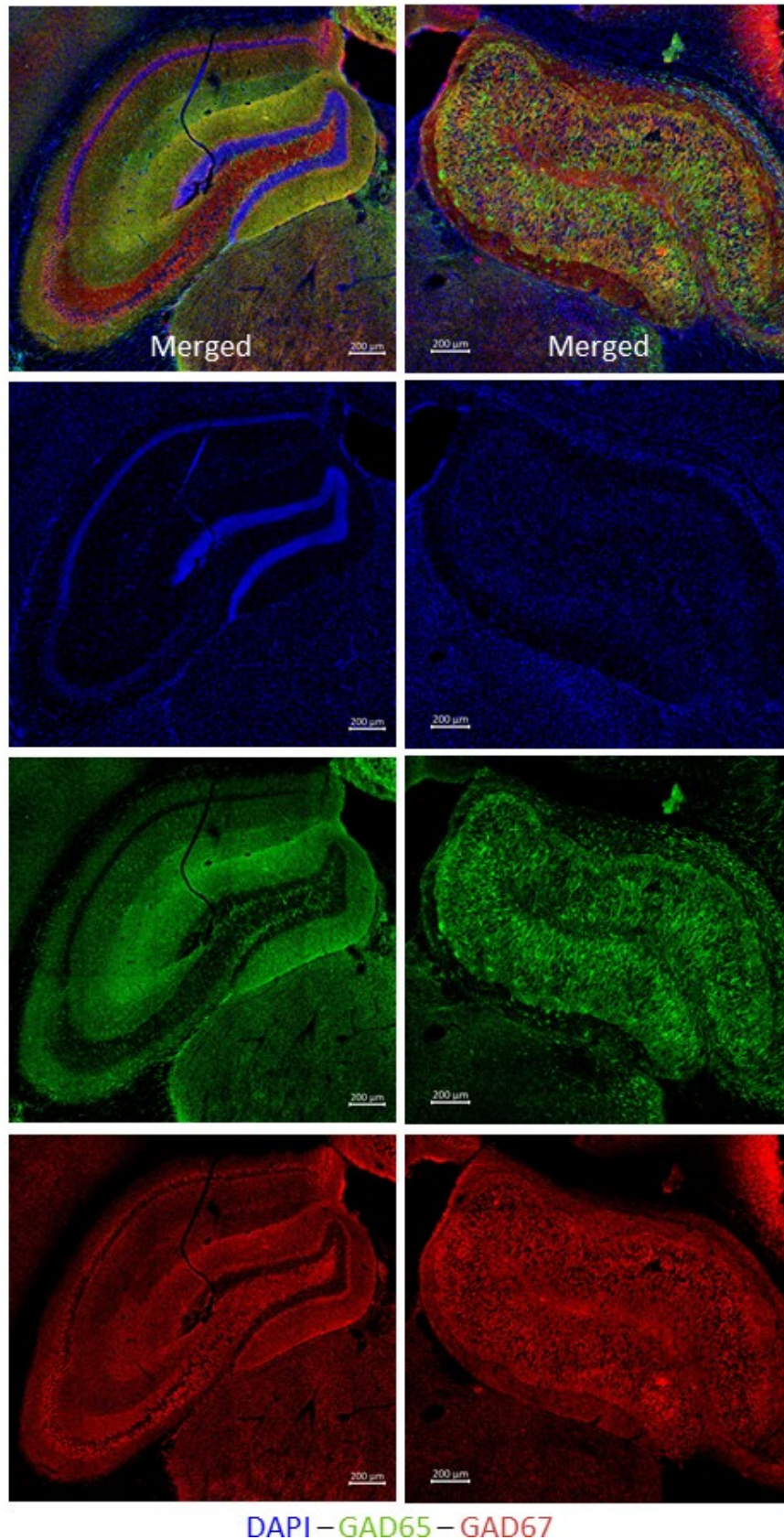


Figure 5-17. Images obtenues au microscope confocal, avec un objectif x20, des deux hippocampes (Gauche : controlatéral / Droite : ipsilatéral) d'une souris KA-MTLE en coupe coronale avec un marquage des noyaux avec le DAPI (bleu) et des enzymes GAD65 (vert) et GAD67 (rouge). On observe clairement la dispersion cellulaire dans l'hippocampe ipsilatéral avec le marquage au DAPI.

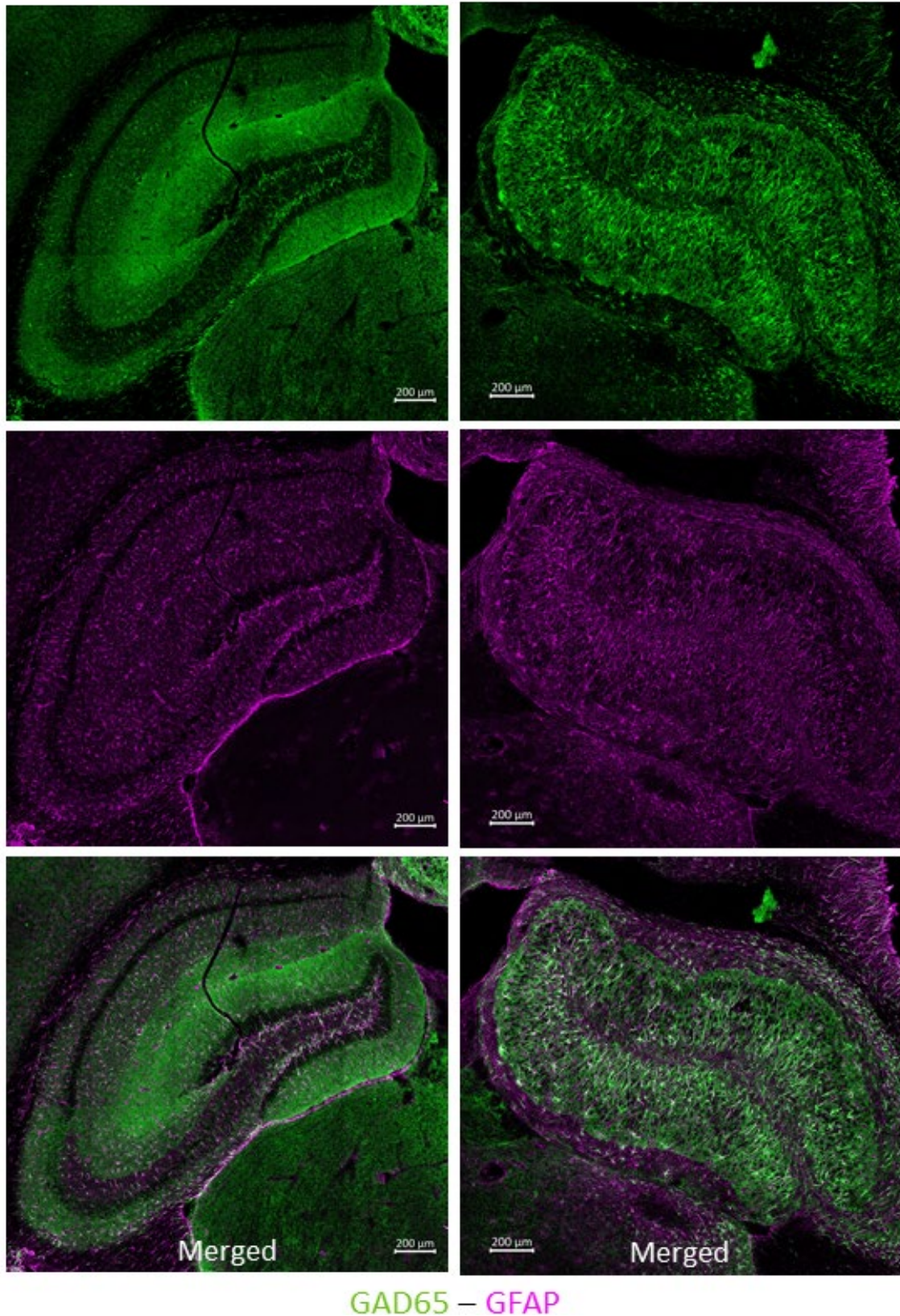


Figure 5-18. Images obtenues au microscope confocal, avec un objectif x20, des deux hippocampes (Gauche : controlatéral / Droite : ipsilatéral) d'une souris KA-MTLE en coupe coronale avec un marquage de l'enzyme GAD65 (vert) et du GFAP (magenta) pour visualiser les astrocytes.

La différence morphologique des astrocytes entre les deux hippocampes d'une souris KA-MTLE est observée sur les Figure 5-19 et Figure 5-20. Côté ipsilatéral, ils ont une forme plus large et allongée. Nous avons essayé de quantifier la surface des astrocytes (en μm^2) dans QuPath-0.5.0. Malgré le fait qu'elle soit sous-estimée par l'outil de sélection, la quantification montre une augmentation de 100% côté ipsilatéral (controlatéral : $8,9 \pm 0,7 \mu\text{m}^2$ / ipsilatéral : $16,7 \pm 3,3 \mu\text{m}^2$) (Figure 5-21). De plus, nous pouvons visualiser la colocalisation entre les astrocytes et la GAD65, cette enzyme serait donc présente majoritairement dans ces cellules notamment côté ipsilatéral.

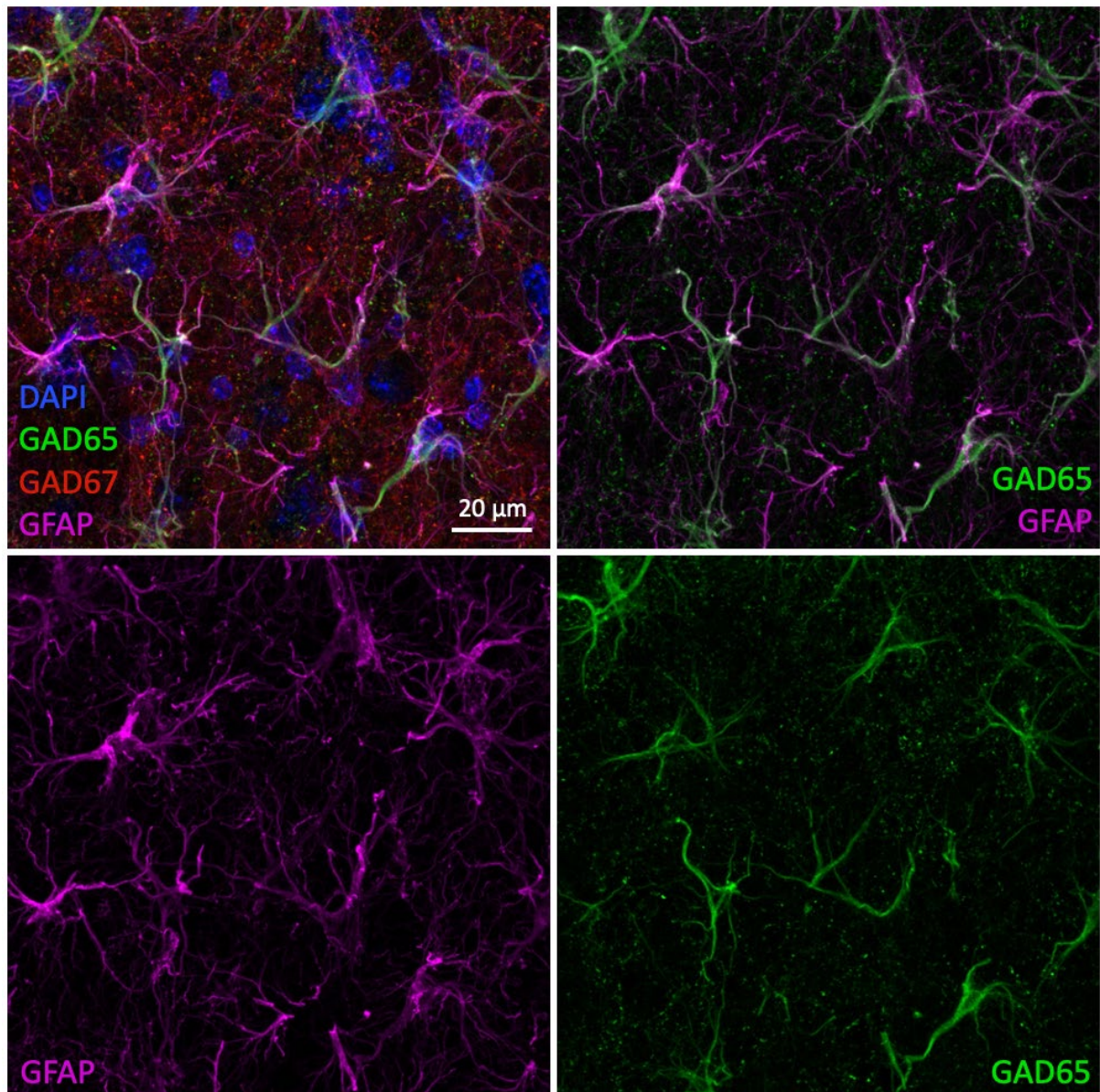


Figure 5-19. Images obtenues au microscope confocal, avec un objectif x63, de l'hippocampe controlatéral d'une souris KA-MTLE en coupe coronale avec un marquage des noyaux avec le DAPI (bleu), des enzymes GAD65 (vert) et GAD67 (rouge), et du GFAP (magenta) pour visualiser les astrocytes. On observe la colocalisation des astrocytes avec la GAD65.

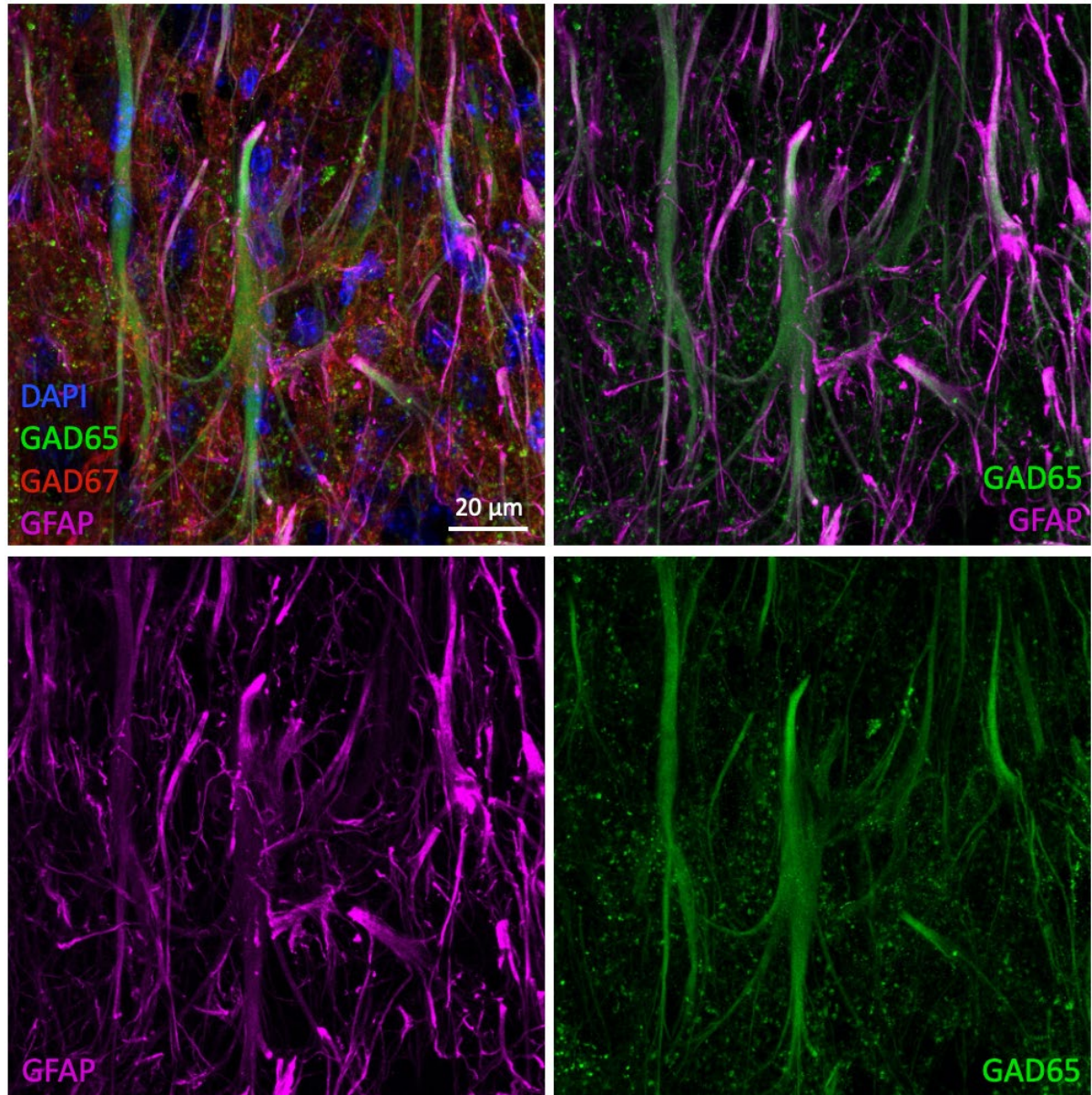


Figure 5-20. Images obtenues au microscope confocal, avec un objectif x63, de l'hippocampe ipsilatéral d'une souris KA-MTLE en coupe coronale avec un marquage des noyaux avec le DAPI (bleu), des enzymes GAD65 (vert) et GAD67 (rouge), et du GFAP (magenta) pour visualiser les astrocytes. On observe clairement la différence morphologique des astrocytes et la colocalisation avec la GAD65

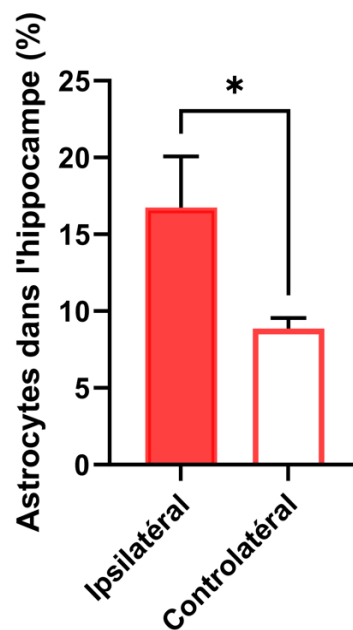


Figure 5-21. Surface des astrocytes normalisée par la surface totale de l'hippocampe pour chaque coupe. * $P < 0,05$. Test Mann-Whitney.

5.3.2.6 Western blot

L'étude des deux enzymes GAD65 et 67 par Western Blot n'a pas montré de différence significative entre les hippocampes ipsilatéraux des souris KA-MTLE et SHAM, ni entre les hippocampes ipsilatéraux et controlatéraux des souris KA-MTLE. Il ne semble donc pas y avoir surproduction de ces enzymes.

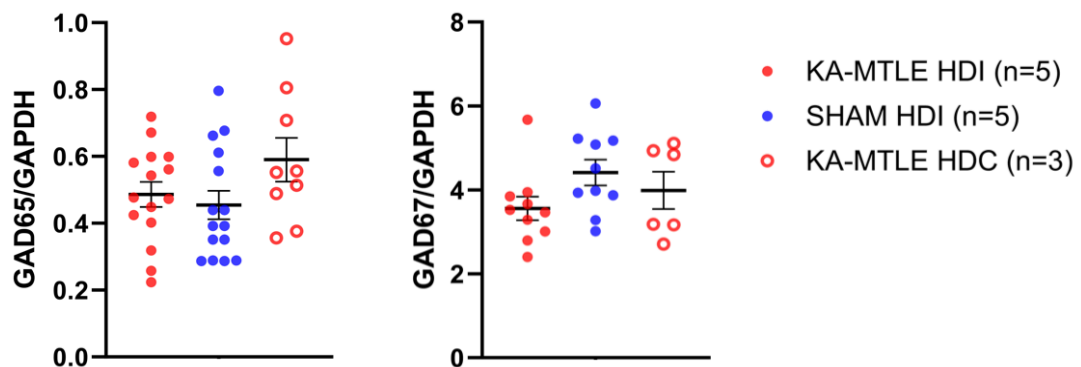


Figure 5-22. Quantification de la GAD65 (3 répliques) et de la GAD67 (2 répliques) par Western Blot, normalisée par la GAPDH.

5.4 Discussion

Acquisition et traitement des données CSI-MEGA-LASER

Dans cette étude, nous avons développé la méthode d'imagerie spectroscopique CSI MEGA-LASER et nous avons confirmé l'augmentation du ratio GABA+/GLX dans l'hippocampe ipsilatéral des souris KA-MTLE, préalablement mise en évidence par Hamelin et al. avec la MEGA-PRESS simple-voxel. De plus, les résultats corrélient avec ceux obtenus par spectroscopie RMN *ex vivo* haute résolution. En parallèle, nous avons confirmé que le modèle animal était conforme à la littérature, avec des EEG caractéristiques. Nous avons aussi reproduit en partie le protocole proposé par Boux et al. et mesuré des perturbations de la perfusion cérébrale décrites sur le même modèle animal.

Ces résultats montrent que la méthode d'imagerie spectroscopique CSI MEGA-LASER que nous avons mise en place permet le suivi du GABA *in vivo* de manière fiable. De plus, cette méthode offre des avantages supplémentaires par rapport à la méthode classique simple-voxel. Tout d'abord, elle permet d'obtenir simultanément des spectres dans les deux hippocampes dorsaux. La méthode simple-voxel nécessiterait plus de temps pour obtenir un spectre par hippocampe. En effet, pour un seul voxel, le protocole d'acquisition dure 1h35, avec 35 min uniquement pour la MEGA-PRESS. Pour obtenir un spectre dans un voxel supplémentaire, par exemple dans la zone controlatérale, les ajustements du Shim dans ce nouveau voxel sont indispensables, ce qui rajouterait 15 min aux 35 min d'acquisition du spectre. Cela signifie qu'une telle acquisition aurait une durée de 2 heures 25 min, ce qui est plus long que les 2 heures nécessaires à l'acquisition pour le protocole de la CSI MEGA-LASER. De plus, la taille des voxels utilisés par Hamelin et al. était de 4 mm³, alors que les voxels de la CSI MEGA-LASER utilisés ici sont deux fois plus petits (1,95 mm³). Cela montre qu'il y a un réel intérêt d'utiliser la CSI MEGA-LASER plutôt que la version simple voxel.

Associée à l'image anatomique, cette méthode apporte également une information fondamentale sur la localisation. La sélection des ROIs correspondant aux deux hippocampes sur l'image anatomique pondérée en T2 a été uniquement réalisée pour comparer les résultats de la méthode CSI MEGA-LASER à ceux obtenus par Hamelin et al. Ces ROIs ont un volume d'environ 5 mm³, ce qui est supérieur aux voxels de la MEGA-PRESS simple-voxel de 4 mm³. Mais ces derniers sont difficiles à placer précisément sur l'hippocampe lors de l'acquisition, et leur forme conduit obligatoirement à un volume partiel important. La CSI MEGA-LASER, offrant la possibilité de sélectionner l'hippocampe à partir de l'image anatomique, permet une quantification plus précise du ratio GABA+/GLX dans notre zone d'intérêt.

D'autre part la méthode LASER produisant moins d'erreur de localisation que la PRESS, notre méthode d'imagerie spectroscopique est tout à fait adaptée à la localisation spatiale d'une zone avec un profil métabolique distinct comme la ZE. En effet, les cartes GABA+/GLX, superposées à l'image anatomique, permettent de visualiser l'augmentation dans l'hippocampe ipsilatéral. De plus, nous avons observé que celle-ci n'était pas toujours homogène en fonction des animaux, ce qui nous donne une information supplémentaire sur la localisation de cette ZE au sein de l'hippocampe dorsal. Cela montre que cette méthode pourrait être utilisée dans d'autres formes d'épilepsie focale, comme la FCD (Focal Cortical Dysplasia) où la position de la ZE n'est pas connue préalablement. Cependant, il ne faut pas oublier que l'interprétation de ces résultats (c'est-à-dire à partir de la carte GABA+/GLX) doit prendre en compte la résolution de la matrice CSI à l'acquisition. D'autres parts, des artéfacts ont parfois été observés sur ces cartes, ce qui pointe du doigt la nécessité d'avoir accès à la matrice de spectres pour vérifier les quantifications, ainsi que l'évaluation de la qualité du fit obtenu avec AMARES.

Variabilité inter-individuelle du ratio GABA+/GLX

Une variabilité notable du ratio GABA+/GLX de l'hippocampe ipsilatéral a été constatée chez les souris KA-MTLE. Aussi, on peut remarquer que pour une partie de ces individus, nous retrouvons les mêmes résultats obtenus lors d'injection de demi-doses de KA par Hamelin et al. (voir par exemple Figure 5-11 et Figure 5E dans [5]). Plusieurs facteurs pourraient expliquer cela, avec tout d'abord le fait que le volume des ROIs choisi est plus grand que le volume des voxels utilisés par Hamelin et al. (5 mm^3 VS 4 mm^3), et que l'on a observé une dispersion des valeurs du ratio au sein même de l'hippocampe dorsal ipsilatéral. Ensuite, il est possible qu'il y ait une différence du niveau initial (avant l'injection de KA ou NaCl) du GABA et GLX entre les individus, car cette variabilité est retrouvée chez les souris SHAM. Nous avons minimisé cette variabilité en normalisant le ratio GABA+/GLX ipsilatéral avec le controlatéral. Il est possible que la souche de souris C57BL/6J utilisée ait évolué, conduisant à une différence métabolique entre les groupes d'individus utilisés dans nos deux études. Il est en effet connu que les souches d'animaux peuvent dériver, et il a été observé que le métabolisme cérébral pouvait refléter cela (données personnelles). Pour les souris KA-MTLE, le volume de KA injecté étant très petit (50 nL), il n'est également pas exclu qu'il y ait des fluctuations dans le volume réellement injecté dans l'hippocampe, notamment car le système d'injection a été modifié pendant ma thèse. Enfin, il a été observé qu'il y a une augmentation du GABA lors de l'anesthésie par isoflurane [130], cette variabilité pourrait donc être liée à la sensibilité de chaque animal à l'anesthésie. Il serait intéressant de mesurer le GABA+/GLX avant l'injection (KA ou NaCl) également, afin d'avoir des valeurs contrôles pour chaque animal.

Coédition du GLX

Dans cette étude, notre choix s'est porté sur une impulsion d'édition du GABA de 146 Hz, pour permettre de comparer directement nos résultats avec ceux de Hamelin et al., où cette bande fréquentielle a été utilisée, et ainsi valider notre méthode. Avec cette impulsion, le GLX est coédité, ce qui nous permet de calculer directement le ratio GABA+/GLX. Néanmoins, il serait intéressant d'évaluer exactement dans quelle proportion le GLX est édité par l'impulsion MEGA choisie (objet du stage de M2 qui a été arrêté précocement). Dans la bibliographie, on retrouve plusieurs études mises en place afin de minimiser la contamination des macromolécules sur le pic du GABA à 3 ppm par le biais d'une impulsion d'édition plus sélective [98], [114], mais cela a forcément pour conséquence de réduire la coédition du GLX. Dans le contexte de notre étude sur l'épilepsie, où le ratio GABA+/GLX nous intéresse particulièrement, élargir la bande passante de l'impulsion d'édition pourrait être envisagé pour que le GLX soit coédité de manière plus intégrale.

Vers une caractérisation de l'épileptogénèse dans le modèle KA-MTLE

Dans notre étude, nous avons réalisé un suivi du ratio GABA+/GLX au cours du temps post-injection de KA, et les résultats présentés, bien que préliminaires, semblent montrer une augmentation progressive et linéaire du GABA jusqu'à quatre semaines. Dans l'étude Hamelin et al., les mesures *in vivo* ont été réalisées entre 4 et 7 semaines après l'injection, et le taux de GABA semblait stable. L'augmentation de ce métabolite pourrait être liée à l'épileptogénèse : via une augmentation de l'expression des récepteurs GABA_A ; ou encore via une augmentation de l'activité des interneurons GABAergiques facilitant l'hyper synchronisation neuronale dans la ZE. L'hypothèse du GABA excitateur a aussi été évoquée dans la littérature [131], [132]. Cependant, la présence accrue de GABA, neurotransmetteur inhibiteur, pourrait aussi correspondre à un effet compensatoire développé lors de l'épileptogénèse. Afin de comprendre cette évolution progressive du GABA, il serait intéressant d'acquérir des EEG sur un nombre plus important d'individus, afin d'évaluer s'il y a une corrélation avec le taux de GABA. De plus, il serait pertinent d'étendre cette évolution temporelle à quelques mois post-injection. Une étude EEG longitudinale (8 mois) est en cours dans l'équipe (thèse de Loan Samalens), il serait intéressant de la coupler avec l'étude du GABA.

L'étude immuno-histologique préliminaire a montré la colocalisation de la GAD65 avec les astrocytes dans l'hippocampe de souris KA-MTLE. Il a été montré par Müller et al. [133] que l'on retrouve une accumulation de GABA dans ces cellules de l'hippocampe ipsilatéral des souris KA-MTLE. Ils ont également effectué un marquage GAD65/67, et ont remarqué que dans l'hippocampe controlatéral était majoritairement présent dans les neurones. En revanche, côté ipsilatéral, ce marquage GAD65/67 était plus important dans les astrocytes. Comme décrit dans la section 2.2.3.3, il est connu que la GAD65 est présente majoritairement dans les terminaisons nerveuses pour la synthétisation du GABA vésiculaire [76], tandis qu'il a été observé que la GAD67 est produite dans les astrocytes dans le cerveau sain [134]. Nos résultats montrent donc une modification de la localisation de la GAD65, des neurones vers les astrocytes, dans l'hippocampe sclérosé. L'accumulation du GABA dans les astrocytes, observée par Müller et al. et mesurée en spectroscopie RMN *in vivo*, serait donc liée uniquement à cet isoforme. Pour compléter ces résultats, il serait intéressant de faire un marquage des neurones, en plus des marquages GAD65 et GAD67, pour comparer la répartition de ces enzymes chez des souris SHAM et KA-MTLE.

Nos analyses Western Blot n'ont pas montré de surproduction de la GAD65, mais une étude avec un nombre d'échantillons plus important est nécessaire pour confirmer ou non ces résultats, qui sont très préliminaires. Il serait également pertinent d'évaluer l'activité enzymatique de la GAD65 ainsi que son expression génique par qPCR pour mieux comprendre la régulation du GABA par cette enzyme dans notre modèle animal. La transformation morphologique des astrocytes dans l'hippocampe sclérosé signifie qu'il y a un changement dans leur rôle et leur fonctionnement, et mérite une investigation approfondie.

IRM multiparamétrique

Pour l'IRM multiparamétrique, bien que sa mise en place ait été complexe et chronophage, notamment à cause de problèmes de pose de cathéters chez la souris (geste très technique), nous avons pu confirmer la modification de la perméabilité de la BHE, en accord avec Boux et al. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre la perfusion et le taux de GABA, mais le peu de données dont nous disposons ne permettait pas de réaliser des analyses statistiques robustes. Ce protocole est actuellement utilisé dans le projet Epicatcher dans l'équipe (thèse de David Minloubou), qui vise à combiner l'IRM multiparamétrique et la CSI MEGA-LASER, pour développer la super résolution. Cette étude permettra aussi d'acquérir un grand nombre de données et donc d'évaluer si les paramètres d'IRM multiparamétrique corréleront avec le taux de GABA.

6. Conclusion et perspectives

Dans le cadre de cette thèse, une nouvelle méthode d'imagerie spectroscopique pour le préclinique a été développée, la CSI MEGA-LASER, avec l'ensemble du protocole d'acquisition et du traitement des données. Cette méthode a d'abord été validée sur fantômes, avant d'être appliquée sur le modèle souris KA-MTLE d'épilepsie du lobe méso-temporal, induit par injection de kaïnate intra-hippocampique.

Les données générées sont plus complexes à traiter, en raison de leur taille mais également des spécificités de l'imagerie spectroscopique, comme le décalage du demi-voxel par exemple, et la nécessité de conserver l'information de localisation pour permettre ensuite une superposition correcte avec l'image anatomique. Néanmoins, les outils que nous avons développés permettent aujourd'hui le traitement de ces données de manière robuste et semi-automatisé. Notre objectif est d'améliorer l'automatisation du traitement, la problématique principale étant l'utilisation des deux programmes dans deux langages différents. Une solution que nous souhaitons mettre en place est l'utilisation d'une version compilée de JET directement dans CSIApy. Cela permettrait également de faciliter la distribution de la méthode.

La quantification des spectres Différence est aujourd'hui réalisée avec AMARES dans CSIApy. Nous sommes en train d'implémenter le contrôle de la qualité et fiabilité du fit (notamment quand le SNR du pic est trop faible pour la quantification, calcul des bornes de Cramér-Rao, etc.). D'autres part, la quantification du spectre OFF n'est pas encore mise en place, or il serait intéressant d'évaluer la normalisation du GABA+ par d'autres métabolites. La normalisation sur la créatine (CR) est couramment retrouvée dans la littérature, et la CR est aussi utilisée comme référence pour le calcul de concentrations absolues. Il a été montré dans Hamelin et al. par spectroscopie *ex vivo* HRMAS que la CR ne variait pas dans la ZE, alors que le NAA diminuait significativement. Il pourrait être utilisé pour normaliser le GABA. En effet, bien que la diminution du NAA ne soit pas spécifique à l'épilepsie, le ratio GABA+/NAA pourrait cependant l'être. Néanmoins, l'intérêt premier de normaliser avec le GLX est qu'il est quantifié dans le spectre Différence comme le GABA+, ce qui permet de minimiser les possibles erreurs produites lors de la soustraction des spectres ON et OFF.

Dans la littérature, la quantification du GABA est souvent réalisée dans les spectres non édités. Si l'édition du GABA doit, théoriquement, générer des données beaucoup plus robustes à bas champ, notamment en clinique à 1,5 T ou à 3 T, étant donné la faible résolution fréquentielle à ces champs magnétiques, cela reste à évaluer à plus haut champ où la résolution spectrale augmente. Il a déjà été montré en clinique à 7 T l'intérêt de l'édition sur le GABA et le glutathion en simple-voxel [77], [78]. Il serait intéressant de réaliser une comparaison à haut champ, comme dans notre cas à 9,4 T, afin de déterminer l'apport de l'édition dans l'évaluation de la quantité de GABA dans le cerveau.

Conclusion et perspectives

Concernant l'utilisation de notre méthode, les paramètres actuellement utilisés dans notre protocole d'acquisition ont été optimisés pour le modèle de souris KA-MTLE et nos conditions expérimentales. Cependant, il est possible de les modifier afin d'adapter l'édition, pour réduire la contamination des macromolécules, ou en choisissant un TE et une fréquence d'édition spécifique à un autre métabolite, même si les possibilités ne sont pas infinies. Il pourrait être intéressant par exemple d'éditer l'alanine, qui est le second métabolite le plus augmenté dans la ZE par rapport aux SHAM, et est aussi très discriminant spatialement pour la ZE. Il est faiblement concentré, comme le GABA, et résonne à 1,47 ppm pour le CH₃ et 3,77 ppm pour le CH, superposé au glutamate, glutamine et glutathion. En positionnant l'impulsion d'édition à cette fréquence, on pourrait éditer le CH₃. Le GLX serait aussi édité, ce qui présente un intérêt pour notre modèle animal. Une approche intéressante serait d'utiliser la méthode d'édition HERMES pour éditer simultanément l'alanine et le GABA.

Il existe de nombreux modèles animaux de pathologies cérébrales, notamment au Grenoble Institut des Neurosciences, et notre méthode pourrait aider à la compréhension de l'implication souvent mal connue du système GABAergique. Ce constat a été fait pour la maladie d'Alzheimer dans une récente méta-analyse publiée dans Nature [135], relevant cependant une diminution du GABA chez les patients (spectroscopie RMN *in vivo* simple voxel). Il serait intéressant d'évaluer si cette diminution est retrouvée dans un modèle murin de cette pathologie, et dans quelles zones du cerveau. D'autres part, une étude préclinique en cours dans notre équipe étudie les conséquences de l'hypoxie intermittente sur la récupération post-accident vasculaire cérébral (AVC), en explorant son interaction avec le syndrome d'apnée du sommeil (SAS) qui affecte 30% des patients AVC. Le modèle animal utilisé consiste en l'injection de malonate dans le striatum, suivi de l'exposition à l'hypoxie intermittente, et une augmentation du GABA de 100% a été mesurée par spectroscopie RMN *ex vivo* chez certains animaux avec AVC sous normoxie, mais aussi sous hypoxie, ainsi que des variations de glutamine, glutamate et de NAA. De plus, il a été mesuré une diminution du GABA chez les patients, mais une diminution supplémentaire du GABA est associée à une meilleure récupération post-AVC [136]. Réaliser un suivi longitudinal du GABA+/GLX de ces animaux au cours de l'expérimentation pourrait permettre d'évaluer si ce ratio peut constituer un biomarqueur permettant de prédire l'évolution des patients et leur récupération.

La méthode CSI MEGA-LASER a été développée sur un modèle animal de MTLE qui présente une lésion, visible sur les images IRM, donc dont la localisation est connue. Cela a permis de la valider *in vivo*. Pour les patients MTLE, la sclérose est souvent visible sur l'IRM, mais se pose la question de la délimitation précise de la ZE afin d'éviter une réimplantation d'électrodes EEG intracrânienne par exemple, ou une rechute post-chirurgie. De plus, environ 10% des patients MTLE ont une IRM négative, ce qui complique encore plus la délimitation de la ZE, et notre méthode pourrait aider le chirurgien dans ce cas-là. D'autres parts, notre méthode pourrait être appliquée à l'étude d'autres modèles d'épilepsie focale, comme la dysplasie corticale focale (FCD pour Focal Cortical Dysplasia en anglais). En effet, la FCD est une épilepsie focale pharmacorésistante caractérisée par une désorganisation focale du cortex, mais elle est non lésionnelle contrairement à la MTLE, ce qui complexifie la localisation de la ZE. Ainsi, la CSI MEGA-LASER pourrait être envisagée pour la localisation de la ZE dans cette épilepsie, et un projet de développement du modèle animal de FCD a été initié dans l'équipe par Antoine Depaulis. Mais dans ce cas, reste à évaluer la faisabilité de la CSI MEGA-LASER dans une zone cérébrale superficielle comme le cortex, pour laquelle l'ajustement des shims est complexe, et où il peut y avoir une forte contamination des lipides provenant de la graisse sous-cutanée.

Lors de cette thèse, d'autres méthodes de spectroscopie ont été développées : sLASER simple-voxel, MEGA-LASER simple-voxel, MEGA-sLASER simple-voxel et CSI LASER. La méthode de localisation sLASER présente certains avantages par rapport à la LASER, notamment un TE minimum plus court, permettant l'utilisation d'une impulsion d'édition MEGA plus précise. Quant à la CSI LASER, elle ne permet pas d'édition mais est plus facile à mettre en place, car le temps d'acquisition est réduit de moitié par rapport à la MEGA-LASER pour un même nombre de moyennage, et le traitement des données est plus simple (pas de différence à calculer, plusieurs outils disponibles). La MEGA-sLASER simple voxel ainsi que la CSI LASER ont été partagées avec Jia Guo (Université de Columbia, NY, USA), avec qui nous collaborons pour le programme JET, et la MEGA-LASER simple-voxel a été partagée avec le laboratoire Bio Imaging Lab (Antwerp, Belgique) et Georgios Batsios de l'Université de Californie San Francisco.

Sur le plan clinique, la méthode CSI MEGA-LASER a déjà été développée sur IRM 3 T Siemens par Bogner et al., et les auteurs ont montré qu'elle fournit des données robustes avec un temps d'acquisition réalisable en clinique [97]. Cependant, cette séquence n'a, jusqu'à maintenant, jamais été utilisée sur patients épileptiques. Le projet EpiCatcher, en plus de la partie préclinique sur le modèle KA-MTLE, vise à réaliser un essai clinique sur volontaires sains. Des tests ont débuté sur fantômes, et je participe à la mise en place du traitement des données avec le logiciel Osprey [116]. Les résultats de cet essai clinique seront néanmoins fondamentaux pour évaluer la pertinence de l'édition du GABA par spectroscopie RMN *in vivo* dans la localisation de la ZE chez les patients MTLE lors du bilan pré-chirurgical. Les pièces de résection pourraient aussi être analysées par RMN HRMAS, afin d'appuyer et compléter les résultats *in vivo*.

7. Références

- [1] World Health Organization, “Epilepsy: a public health imperative: summary,” 2019. [Online]. Available: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325440/WHO-MSD-MER-19.2-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [2] K. Malmgren and S. Baxendale, *Long-Term Outcomes of Epilepsy Surgery in Adults and Children*.
- [3] A. T. Berg and S. Shinnar, “The risk of seizure recurrence following a first unprovoked seizure: A quantitative review,” *Neurology*, vol. 41, no. 7, pp. 965–965, Jul. 1991, doi: 10.1212/WNL.41.7.965.
- [4] E. Beghi *et al.*, “Recommendation for a definition of acute symptomatic seizure,” *Epilepsia*, vol. 51, no. 4, pp. 671–675, Apr. 2010, doi: 10.1111/j.1528-1167.2009.02285.x.
- [5] S. Hamelin *et al.*, “In vivo γ -aminobutyric acid increase as a biomarker of the epileptogenic zone: An unbiased metabolomics approach,” *Epilepsia*, vol. 62, no. 1, pp. 163–175, Jan. 2021, doi: 10.1111/epi.16768.
- [6] F. Boux *et al.*, “Neurovascular multiparametric MRI defines epileptogenic and seizure propagation regions in experimental mesiotemporal lobe epilepsy,” *Epilepsia*, vol. 62, no. 5, pp. 1244–1255, May 2021, doi: 10.1111/epi.16886.
- [7] J. Engel, “A Proposed Diagnostic Scheme for People with Epileptic Seizures and with Epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology,” *Epilepsia*, vol. 42, no. 6, pp. 796–803, Dec. 2001, doi: 10.1046/j.1528-1157.2001.10401.x.
- [8] C. Herrmann and T. Demiralp, “Human EEG gamma oscillations in neuropsychiatric disorders,” *Clin. Neurophysiol.*, vol. 116, no. 12, pp. 2719–2733, Dec. 2005, doi: 10.1016/j.clinph.2005.07.007.
- [9] FFRE Fondation Française pour la Recherche sur l’Épilepsie, “Comprendre l’épilepsie.” [Online]. Available: <https://www.fondation-epilepsie.fr/comprendre-epilepsie/>
- [10] C. E. Stafstrom and L. Carmant, “Seizures and Epilepsy: An Overview for Neuroscientists,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 5, no. 6, pp. a022426–a022426, Jun. 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a022426.
- [11] M. F. Bear, B. W. Connors, M. A. Paradiso, and A. Nieoullon, *Neurosciences: à la découverte du cerveau*, 4e éd. Montrouge: Éditions Pradel [John Libbey Eurotext], 2016.
- [12] P. A. Schwartzkroin, *Encyclopedia of basic epilepsy research*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2009.
- [13] F. Cendes *et al.*, “Atrophy of mesial structures in patients with temporal lobe epilepsy: cause or consequence of repeated seizures?,” *Ann. Neurol.*, vol. 34, no. 6, pp. 795–801, Dec. 1993, doi: 10.1002/ana.410340607.

Références

- [14] J. Engel, T. A. Pedley, and J. Aicardi, *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998.
- [15] P. Jayakar *et al.*, “Diagnostic utility of invasive EEG for epilepsy surgery: Indications, modalities, and techniques,” *Epilepsia*, vol. 57, no. 11, pp. 1735–1747, Nov. 2016, doi: 10.1111/epi.13515.
- [16] M. Javidan, “Electroencephalography in Mesial Temporal Lobe Epilepsy: A Review,” *Epilepsy Res. Treat.*, vol. 2012, pp. 1–17, Jun. 2012, doi: 10.1155/2012/637430.
- [17] A. R. Wyler, G. A. Ojemann, E. Lettich, and A. A. Ward, “Subdural strip electrodes for localizing epileptogenic foci,” *J. Neurosurg.*, vol. 60, no. 6, pp. 1195–1200, Jun. 1984, doi: 10.3171/jns.1984.60.6.1195.
- [18] J. C. Bulacio *et al.*, “Long-term seizure outcome after resective surgery in patients evaluated with intracranial electrodes: *Patients Evaluated with Intracranial Electrodes*,” *Epilepsia*, vol. 53, no. 10, pp. 1722–1730, Oct. 2012, doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03633.x.
- [19] W. J. Hader *et al.*, “Complications of epilepsy surgery—A systematic review of focal surgical resections and invasive EEG monitoring,” *Epilepsia*, vol. 54, no. 5, pp. 840–847, May 2013, doi: 10.1111/epi.12161.
- [20] M. O. Krucoff *et al.*, “Rates and predictors of success and failure in repeat epilepsy surgery: A meta-analysis and systematic review,” *Epilepsia*, vol. 58, no. 12, pp. 2133–2142, Dec. 2017, doi: 10.1111/epi.13920.
- [21] A. Pinto *et al.*, “Teaching NeuroImages: Mesial temporal sclerosis after a prolonged unprovoked seizure in an infant,” *Neurology*, vol. 77, no. 19, pp. e112–e113, Nov. 2011, doi: 10.1212/WNL.0b013e318236ef34.
- [22] M. A. Falconer, E. A. Serafetinides, and J. A. Corsellis, “ETIOLOGY AND PATHOGENESIS OF TEMPORAL LOBE EPILEPSY,” *Arch. Neurol.*, vol. 10, pp. 233–248, Mar. 1964, doi: 10.1001/archneur.1964.00460150003001.
- [23] T. L. Babb, J. P. Lieb, W. J. Brown, J. Pretorius, and P. H. Crandall, “Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampal formation,” *Epilepsia*, vol. 25, no. 6, pp. 721–728, Dec. 1984, doi: 10.1111/j.1528-1157.1984.tb03483.x.
- [24] H. K. Wolf *et al.*, “Surgical pathology of temporal lobe epilepsy. Experience with 216 cases,” *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 52, no. 5, pp. 499–506, Sep. 1993, doi: 10.1097/00005072-199309000-00008.
- [25] N. C. de Lanerolle, J. H. Kim, R. J. Robbins, and D. D. Spencer, “Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy,” *Brain Res.*, vol. 495, no. 2, pp. 387–395, Aug. 1989, doi: 10.1016/0006-8993(89)90234-5.
- [26] C. R. Houser, “Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy,” *Brain Res.*, vol. 535, no. 2, pp. 195–204, Dec. 1990, doi: 10.1016/0006-8993(90)91601-c.

Références

- [27] A. Crespel *et al.*, “Immature-like astrocytes are associated with dentate granule cell migration in human temporal lobe epilepsy,” *Neurosci. Lett.*, vol. 330, no. 1, pp. 114–118, Sep. 2002, doi: 10.1016/s0304-3940(02)00718-8.
- [28] C. A. Haas *et al.*, “Role for reelin in the development of granule cell dispersion in temporal lobe epilepsy,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 22, no. 14, pp. 5797–5802, Jul. 2002, doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-14-05797.2002.
- [29] D. Lurton, B. El Bahh, L. Sundstrom, and A. Rougier, “Granule cell dispersion is correlated with early epileptic events in human temporal lobe epilepsy,” *J. Neurol. Sci.*, vol. 154, no. 2, pp. 133–136, Feb. 1998, doi: 10.1016/s0022-510x(97)00220-7.
- [30] W. B. Barr, M. Ashtari, and N. Schaul, “Bilateral reductions in hippocampal volume in adults with epilepsy and a history of febrile seizures,” *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 63, no. 4, pp. 461–467, Oct. 1997, doi: 10.1136/jnnp.63.4.461.
- [31] V. Rigau *et al.*, “Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy,” *Brain J. Neurol.*, vol. 130, no. Pt 7, pp. 1942–1956, Jul. 2007, doi: 10.1093/brain/awm118.
- [32] S. Hamelin and A. Depaulis, “Revisiting hippocampal sclerosis in mesial temporal lobe epilepsy according to the ‘two-hit’ hypothesis,” *Rev. Neurol. (Paris)*, vol. 171, no. 3, pp. 227–235, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.neurol.2015.01.560.
- [33] P. Vincent and C. Mulle, “Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity,” *Neuroscience*, vol. 158, no. 1, pp. 309–323, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.02.066.
- [34] E. A. Cavalheiro, D. A. Riche, and G. Le Gal La Salle, “Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures,” *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, vol. 53, no. 6, pp. 581–589, Jun. 1982, doi: 10.1016/0013-4694(82)90134-1.
- [35] R. Schwarcz, R. Zaczek, and J. T. Coyle, “Microinjection of kainic acid into the rat hippocampus,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 50, no. 3, pp. 209–220, Aug. 1978, doi: 10.1016/0014-2999(78)90353-9.
- [36] F. Suzuki, M. P. Junier, D. Guilhem, J. C. Sørensen, and B. Onteniente, “Morphogenetic effect of kainate on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor,” *Neuroscience*, vol. 64, no. 3, pp. 665–674, Feb. 1995, doi: 10.1016/0306-4522(94)00463-f.
- [37] V. Bouilleret, V. Ridoux, A. Depaulis, C. Marescaux, A. Nehlig, and G. Le Gal La Salle, “Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy,” *Neuroscience*, vol. 89, no. 3, pp. 717–729, Mar. 1999, doi: 10.1016/S0306-4522(98)00401-1.
- [38] V. Riban, V. Bouilleret, B. T. Pham-Lê, J.-M. Fritschy, C. Marescaux, and A. Depaulis, “Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal

- sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy,” *Neuroscience*, vol. 112, no. 1, pp. 101–111, Jun. 2002, doi: 10.1016/S0306-4522(02)00064-7.
- [39] V. Bouilleret, A. Nehlig, C. Marescaux, and I. J. Namer, “Magnetic Resonance Imaging Follow-up of Progressive Hippocampal Changes in a Mouse Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy,” *Epilepsia*, vol. 41, no. 6, pp. 642–650, Jun. 2000, doi: 10.1111/j.1528-1157.2000.tb00223.x.
- [40] V. Bouilleret, F. Loup, T. Kiener, C. Marescaux, and J.-M. Fritschy, “Early loss of interneurons and delayed subunit-specific changes in GABAA-receptor expression in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy,” *Hippocampus*, vol. 10, no. 3, pp. 305–324, 2000, doi: 10.1002/1098-1063(2000)10:3<305::AID-HIPO11>3.0.CO;2-I.
- [41] V. Duveau, A. Madhusudan, M. Caleo, I. Knuesel, and J.-M. Fritschy, “Impaired reelin processing and secretion by Cajal-Retzius cells contributes to granule cell dispersion in a mouse model of temporal lobe epilepsy,” *Hippocampus*, vol. 21, no. 9, pp. 935–944, Sep. 2011, doi: 10.1002/hipo.20793.
- [42] V. Duveau *et al.*, “Differential Effects of Antiepileptic Drugs on Focal Seizures in the Intrahippocampal Kainate Mouse Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy,” *CNS Neurosci. Ther.*, vol. 22, no. 6, pp. 497–506, Jun. 2016, doi: 10.1111/cns.12523.
- [43] R. A. de Graaf, *In vivo NMR spectroscopy: principles and techniques*, 2nd ed. Chichester: Wiley, 2007.
- [44] G. H. Glover and J. M. Pauly, “Projection Reconstruction Techniques for Reduction of Motion Effects in MRI,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 28, no. 2, pp. 275–289, Dec. 1992, doi: 10.1002/mrm.1910280209.
- [45] M. M. Zeineh, S. A. Engel, and S. Y. Bookheimer, “Application of cortical unfolding techniques to functional MRI of the human hippocampal region,” *NeuroImage*, vol. 11, no. 6 Pt 1, pp. 668–683, Jun. 2000, doi: 10.1006/nimg.2000.0561.
- [46] Y.-H. Hsu, W.-T. Lee, and C. Chang, “Multiparametric MRI evaluation of kainic acid-induced neuronal activation in rat hippocampus,” *Brain J. Neurol.*, vol. 130, no. Pt 12, pp. 3124–3134, Dec. 2007, doi: 10.1093/brain/awm207.
- [47] C. Pierpaoli, “Quantitative brain MRI,” *Top. Magn. Reson. Imaging TMRI*, vol. 21, no. 2, p. 63, Apr. 2010, doi: 10.1097/RMR.0b013e31821e56f8.
- [48] O. Wu, R. M. Dijkhuizen, and A. G. Sorensen, “Multiparametric magnetic resonance imaging of brain disorders,” *Top. Magn. Reson. Imaging TMRI*, vol. 21, no. 2, pp. 129–138, Apr. 2010, doi: 10.1097/RMR.0b013e31821e56c2.
- [49] E. A. Van Vliet, E. Aronica, and J. A. Gorter, “Blood–brain barrier dysfunction, seizures and epilepsy,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 38, pp. 26–34, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.semcdb.2014.10.003.
- [50] N. Marchi, W. Tierney, A. V. Alexopoulos, V. Puvenna, T. Granata, and D. Janigro, “The Etiological Role of Blood-Brain Barrier Dysfunction in Seizure Disorders,” *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.*, vol. 2011, pp. 1–9, Mar. 2011, doi: 10.1155/2011/482415.

Références

- [51] A. Vezzani, S. Balosso, and T. Ravizza, “Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy,” *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 15, no. 8, pp. 459–472, Aug. 2019, doi: 10.1038/s41582-019-0217-x.
- [52] Y. Wang *et al.*, “Postictal Alteration of Sodium Content and Apparent Diffusion Coefficient in Epileptic Rat Brain Induced by Kainic Acid,” *Epilepsia*, vol. 37, no. 10, pp. 1000–1006, Oct. 1996, doi: 10.1111/j.1528-1157.1996.tb00539.x.
- [53] B. C. Bernhardt *et al.*, “Preferential susceptibility of limbic cortices to microstructural damage in temporal lobe epilepsy: A quantitative T1 mapping study,” *NeuroImage*, vol. 182, pp. 294–303, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.06.002.
- [54] T. Engelhorn, J. Weise, T. Hammen, I. Bluemcke, A. Hufnagel, and A. Doerfler, “Early diffusion-weighted MRI predicts regional neuronal damage in generalized status epilepticus in rats treated with diazepam,” *Neurosci. Lett.*, vol. 417, no. 3, pp. 275–280, May 2007, doi: 10.1016/j.neulet.2007.02.072.
- [55] G. Bar-Klein *et al.*, “Imaging blood–brain barrier dysfunction as a biomarker for epileptogenesis,” *Brain*, vol. 140, no. 6, pp. 1692–1705, Jun. 2017, doi: 10.1093/brain/awx073.
- [56] F. Boux *et al.*, “Neurovascular multiparametric MRI defines epileptogenic and seizure propagation regions in experimental mesiotemporal lobe epilepsy,” *Epilepsia*, vol. 62, no. 5, pp. 1244–1255, May 2021, doi: 10.1111/epi.16886.
- [57] I. Tkáč, Z. Starcuk, I. Y. Choi, and R. Gruetter, “In vivo ¹H NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 41, no. 4, pp. 649–656, Apr. 1999, doi: 10.1002/(sici)1522-2594(199904)41:4<649::aid-mrm2>3.0.co;2-g.
- [58] D. G. Gadian *et al.*, “H magnetic resonance spectroscopy in the investigation of intractable epilepsy,” *Acta Neurol. Scand.*, vol. 89, no. S152, pp. 116–121, Mar. 1994, doi: 10.1111/j.1600-0404.1994.tb05202.x.
- [59] H. Hetherington *et al.*, “Proton nuclear magnetic resonance spectroscopic imaging of human temporal lobe epilepsy at 4.1 T,” *Ann. Neurol.*, vol. 38, no. 3, pp. 396–404, Sep. 1995, doi: 10.1002/ana.410380309.
- [60] J. W. Hugg, K. D. Laxer, G. B. Matson, A. A. Maudsley, and M. W. Weiner, “Neuron loss localizes human temporal lobe epilepsy by in vivo proton magnetic resonance spectroscopic imaging,” *Ann. Neurol.*, vol. 34, no. 6, pp. 788–794, Dec. 1993, doi: 10.1002/ana.410340606.
- [61] A. A. Maudsley, C. Domenig, R. E. Ramsay, and B. C. Bowen, “Application of volumetric MR spectroscopic imaging for localization of neocortical epilepsy,” *Epilepsy Res.*, vol. 88, no. 2–3, pp. 127–138, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.eplepsyres.2009.10.009.
- [62] O. A. C. Petroff, L. A. Pleban, and D. D. Spencer, “Symbiosis between in vivo and in vitro NMR spectroscopy: The creatine, N-acetylaspartate, glutamate, and GABA content of the epileptic human brain,” *Magn. Reson. Imaging*, vol. 13, no. 8, pp. 1197–1211, 1995, doi: 10.1016/0730-725X(95)02033-P.

Références

- [63] R. J. Simister, M. A. McLean, G. J. Barker, and J. S. Duncan, "Proton MR spectroscopy of metabolite concentrations in temporal lobe epilepsy and effect of temporal lobe resection," *Epilepsy Res.*, vol. 83, no. 2–3, pp. 168–176, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.eplepsyres.2008.11.006.
- [64] I. Çavuş *et al.*, "Elevated basal glutamate and unchanged glutamine and GABA in refractory epilepsy: Microdialysis study of 79 patients at the yale epilepsy surgery program," *Ann. Neurol.*, vol. 80, no. 1, pp. 35–45, Jul. 2016, doi: 10.1002/ana.24673.
- [65] C. G. Ting Wong, T. Bottiglieri, and O. C. Snead, "GABA, γ -hydroxybutyric acid, and neurological disease," *Ann. Neurol.*, vol. 54, no. S6, pp. S3–S12, 2003, doi: 10.1002/ana.10696.
- [66] M. J. Schmidt and K. Mirnics, "Neurodevelopment, GABA System Dysfunction, and Schizophrenia," *Neuropsychopharmacology*, vol. 40, no. 1, pp. 190–206, Jan. 2015, doi: 10.1038/npp.2014.95.
- [67] H. He and H. T. Cline, "What Is Excitation/Inhibition and How Is It Regulated? A Case of the Elephant and the Wisemen," *J. Exp. Neurosci.*, vol. 13, p. 117906951985937, Jan. 2019, doi: 10.1177/1179069519859371.
- [68] D. L. Kaufman, C. R. Houser, and A. J. Tobin, "Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions," *J. Neurochem.*, vol. 56, no. 2, pp. 720–723, Feb. 1991, doi: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb08211.x.
- [69] M. G. Erlander, N. J. Tillakaratne, S. Feldblum, N. Patel, and A. J. Tobin, "Two genes encode distinct glutamate decarboxylases," *Neuron*, vol. 7, no. 1, pp. 91–100, Jul. 1991, doi: 10.1016/0896-6273(91)90077-d.
- [70] Y. Shi, B. Veit, and S. Baekkeskov, "Amino acid residues 24–31 but not palmitoylation of cysteines 30 and 45 are required for membrane anchoring of glutamic acid decarboxylase, GAD65," *J. Cell Biol.*, vol. 124, no. 6, pp. 927–934, Mar. 1994, doi: 10.1083/jcb.124.6.927.
- [71] R. Dirkx *et al.*, "Targeting of the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase to intracellular organelles is mediated by its interaction with the NH₂-terminal region of the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 5, pp. 2241–2246, Feb. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.5.2241.
- [72] M. Namchuk, L. Lindsay, C. W. Turck, J. Kanaani, and S. Baekkeskov, "Phosphorylation of Serine Residues 3, 6, 10, and 13 Distinguishes Membrane Anchored from Soluble Glutamic Acid Decarboxylase 65 and Is Restricted to Glutamic Acid Decarboxylase 65 α ," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 3, pp. 1548–1557, Jan. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.3.1548.
- [73] M. Solimena, R. Dirkx, M. Radzynski, O. Mundigl, and P. De Camilli, "A signal located within amino acids 1–27 of GAD65 is required for its targeting to the Golgi complex region," *J. Cell Biol.*, vol. 126, no. 2, pp. 331–341, Jul. 1994, doi: 10.1083/jcb.126.2.331.

Références

- [74] M. Esclapez, N. J. Tillakaratne, D. L. Kaufman, A. J. Tobin, and C. R. Houser, “Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 14, no. 3 Pt 2, pp. 1834–1855, Mar. 1994, doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-03-01834.1994.
- [75] A. Reetz, M. Solimena, M. Matteoli, F. Folli, K. Takei, and P. De Camilli, “GABA and pancreatic beta-cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion,” *EMBO J.*, vol. 10, no. 5, pp. 1275–1284, May 1991, doi: 10.1002/j.1460-2075.1991.tb08069.x.
- [76] J. J. Soghomonian and D. L. Martin, “Two isoforms of glutamate decarboxylase: why?,” *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 19, no. 12, pp. 500–505, Dec. 1998, doi: 10.1016/s0165-6147(98)01270-x.
- [77] D. Hong, S. Rohani Rankouhi, J.-W. Thielen, J. J. A. van Asten, and D. G. Norris, “A comparison of sLASER and MEGA-sLASER using simultaneous interleaved acquisition for measuring GABA in the human brain at 7T,” *PLOS ONE*, vol. 14, no. 10, p. e0223702, Oct. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0223702.
- [78] Z. Shams *et al.*, “Comparison of 2-Hydroxyglutarate Detection With sLASER and MEGA-sLASER at 7T,” *Front. Neurol.*, vol. 12, p. 718423, Sep. 2021, doi: 10.3389/fneur.2021.718423.
- [79] I.-Y. Choi, S.-P. Lee, H. Merkle, and J. Shen, “In vivo detection of gray and white matter differences in GABA concentration in the human brain,” *NeuroImage*, vol. 33, no. 1, pp. 85–93, Oct. 2006, doi: 10.1016/j.neuroimage.2006.06.016.
- [80] C. C. Hanstock, N. J. Coupland, and P. S. Allen, “GABA X2 multiplet measured pre- and post-administration of vigabatrin in human brain,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 48, no. 4, pp. 617–623, Oct. 2002, doi: 10.1002/mrm.10265.
- [81] P. G. Henry, C. Dautry, P. Hantraye, and G. Bloch, “Brain GABA editing without macromolecule contamination,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 45, no. 3, pp. 517–520, Mar. 2001, doi: 10.1002/1522-2594(200103)45:3<517::aid-mrm1068>3.0.co;2-6.
- [82] J. Shen, D. C. Shungu, and D. L. Rothman, “In vivo chemical shift imaging of gamma-aminobutyric acid in the human brain,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 41, no. 1, pp. 35–42, Jan. 1999, doi: 10.1002/(sici)1522-2594(199901)41:1<35::aid-mrm7>3.0.co;2-c.
- [83] M. Mescher, H. Merkle, J. Kirsch, M. Garwood, and R. Gruetter, “Simultaneous in vivo spectral editing and water suppression,” *NMR Biomed.*, vol. 11, p. 7, 1998.
- [84] P. G. Mullins *et al.*, “Current practice in the use of MEGA-PRESS spectroscopy for the detection of GABA,” *NeuroImage*, vol. 86, pp. 43–52, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.neuroimage.2012.12.004.
- [85] A. D. Harris, M. G. Saleh, and R. A. E. Edden, “Edited ¹H magnetic resonance spectroscopy in vivo: Methods and metabolites: Edited ¹H MRS,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 77, no. 4, pp. 1377–1389, Apr. 2017, doi: 10.1002/mrm.26619.

Références

- [86] R. A. De Graaf, "Spectral Editing and 2D NMR," in *Magnetic Resonance Spectroscopy*, Elsevier, 2014, pp. 40–48. doi: 10.1016/B978-0-12-401688-0.00004-5.
- [87] D. L. Rothman, O. A. Petroff, K. L. Behar, and R. H. Mattson, "Localized ^1H NMR measurements of gamma-aminobutyric acid in human brain in vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. 12, pp. 5662–5666, Jun. 1993, doi: 10.1073/pnas.90.12.5662.
- [88] Bottomley P. A., "Selective volume method for performing localized NMR spectroscopy ;," US Patent #4 480/228, 1984
- [89] C. J. Stagg and D. L. Rothman, *Magnetic resonance spectroscopy: tools for neuroscience research and emerging clinical applications*. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2014.
- [90] V. Mlynárik, G. Gambarota, H. Frenkel, and R. Gruetter, "Localized short-echo-time proton MR spectroscopy with full signal-intensity acquisition," *Magn. Reson. Med.*, vol. 56, no. 5, pp. 965–970, Nov. 2006, doi: 10.1002/mrm.21043.
- [91] M. Gu *et al.*, "GABA editing with macromolecule suppression using an improved MEGA-SPECIAL sequence: GABA Editing With Robust Macromolecule Suppression," *Magn. Reson. Med.*, vol. 79, no. 1, pp. 41–47, Jan. 2018, doi: 10.1002/mrm.26691.
- [92] M. Garwood and L. DelaBarre, "The return of the frequency sweep: designing adiabatic pulses for contemporary NMR," *J. Magn. Reson. San Diego Calif 1997*, vol. 153, no. 2, pp. 155–177, Dec. 2001, doi: 10.1006/jmre.2001.2340.
- [93] M. Lin, A. Kumar, and S. Yang, "Two-dimensional J-resolved LASER and semi-LASER spectroscopy of human brain: 2D J-Resolved LASER and sLASER Spectroscopy," *Magn. Reson. Med.*, vol. 71, no. 3, pp. 911–920, Mar. 2014, doi: 10.1002/mrm.24732.
- [94] T. W. J. Scheenen, D. W. J. Klomp, J. P. Wijnen, and A. Heerschap, "Short echo time ^1H -MRSI of the human brain at 3T with minimal chemical shift displacement errors using adiabatic refocusing pulses," *Magn. Reson. Med.*, vol. 59, no. 1, pp. 1–6, Jan. 2008, doi: 10.1002/mrm.21302.
- [95] R. J. Ordidge, A. Connelly, and J. A. B. Lohman, "Image-selected in Vivo spectroscopy (ISIS). A new technique for spatially selective nmr spectroscopy," *J. Magn. Reson. 1969*, vol. 66, no. 2, pp. 283–294, Feb. 1986, doi: 10.1016/0022-2364(86)90031-4.
- [96] J. Near, R. Simpson, P. Cowen, and P. Jezzard, "Efficient γ -aminobutyric acid editing at 3T without macromolecule contamination: MEGA-SPECIAL: γ -AMINO BUTYRIC ACID EDITING USING MEGA-SPECIAL," *NMR Biomed.*, vol. 24, no. 10, pp. 1277–1285, Dec. 2011, doi: 10.1002/nbm.1688.
- [97] W. Bogner *et al.*, "3D GABA imaging with real-time motion correction, shim update and reacquisition of adiabatic spiral MRSI," *NeuroImage*, vol. 103, pp. 290–302, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.neuroimage.2014.09.032.
- [98] A. Andreychenko, V. O. Boer, C. S. Arteaga de Castro, P. R. Luijten, and D. W. J. Klomp, "Efficient spectral editing at 7 T: GABA detection with MEGA-sLASER: Spectral

- Editing With MEGA-sLASER at 7 T,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 68, no. 4, pp. 1018–1025, Oct. 2012, doi: 10.1002/mrm.24131.
- [99] M. G. Saleh *et al.*, “Simultaneous editing of GABA and glutathione at 7T using semi-LASER localization: Simultaneous Editing of GABA and GSH at 7T,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 80, no. 2, pp. 474–479, Aug. 2018, doi: 10.1002/mrm.27044.
- [100] O. C. Andronesi, S. Ramadan, E.-M. Ratai, D. Jennings, C. E. Mountford, and A. G. Sorensen, “Spectroscopic imaging with improved gradient modulated constant adiabaticity pulses on high-field clinical scanners,” *J. Magn. Reson.*, vol. 203, no. 2, pp. 283–293, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.jmr.2010.01.010.
- [101] R. A. E. Edden and P. B. Barker, “Spatial effects in the detection of γ -aminobutyric acid: Improved sensitivity at high fields using inner volume saturation,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 58, no. 6, pp. 1276–1282, Dec. 2007, doi: 10.1002/mrm.21383.
- [102] H. Zhu, R. A. E. Edden, R. Ouwerkerk, and P. B. Barker, “High resolution spectroscopic imaging of GABA at 3 Tesla: High Resolution GABA-MRSI,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 65, no. 3, pp. 603–609, Mar. 2011, doi: 10.1002/mrm.22671.
- [103] P. Hnilicová *et al.*, “Spatial variability and reproducibility of GABA-edited MEGA-LASER 3D-MRSI in the brain at 3 T: Reproducibility of GABA-edited 3D-MRSI in the brain at 3T,” *NMR Biomed.*, vol. 29, no. 11, pp. 1656–1665, Nov. 2016, doi: 10.1002/nbm.3613.
- [104] K. L. Chan and P. B. Barker, “Retrospective motion compensation for edited MR spectroscopic imaging,” *NeuroImage*, vol. 202, p. 116141, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.neuroimage.2019.116141.
- [105] P. O. Magnusson, V. O. Boer, A. Marsman, O. B. Paulson, L. G. Hanson, and E. T. Petersen, “Gamma-aminobutyric acid edited echo-planar spectroscopic imaging (EPSI) with MEGA-sLASER at 7T,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 81, no. 2, pp. 773–780, Feb. 2019, doi: 10.1002/mrm.27450.
- [106] P. Moser *et al.*, “Whole-slice mapping of GABA and GABA+ at 7T via adiabatic MEGA-editing, real-time instability correction, and concentric circle readout,” *NeuroImage*, vol. 184, pp. 475–489, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.neuroimage.2018.09.039.
- [107] L. R. Silberbauer *et al.*, “Effect of Ketamine on Limbic GABA and Glutamate: A Human In Vivo Multivoxel Magnetic Resonance Spectroscopy Study,” *Front. Psychiatry*, vol. 11, p. 549903, Sep. 2020, doi: 10.3389/fpsy.2020.549903.
- [108] R. E. Ma, J. B. Murdoch, W. Bogner, O. Andronesi, and U. Dydak, “Atlas-based GABA mapping with 3D MEGA-MRSI: Cross-correlation to single-voxel MRS,” *NMR Biomed.*, vol. 34, no. 5, May 2021, doi: 10.1002/nbm.4275.
- [109] M. Wilson *et al.*, “Methodological consensus on clinical proton MRS of the brain: Review and recommendations,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 82, no. 2, pp. 527–550, Aug. 2019, doi: 10.1002/mrm.27742.

- [110] S. W. Provencher, “Estimation of metabolite concentrations from localized *in vivo* proton NMR spectra,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 30, no. 6, pp. 672–679, Dec. 1993, doi: 10.1002/mrm.1910300604.
- [111] L. Vanhamme, null van den Boogaart A, and null Van Huffel S, “Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge,” *J. Magn. Reson. San Diego Calif 1997*, vol. 129, no. 1, pp. 35–43, Nov. 1997, doi: 10.1006/jmre.1997.1244.
- [112] H. Ratiney, M. Sdika, Y. Coenradie, S. Cavassila, D. van Ormondt, and D. Graveron-Demilly, “Time-domain semi-parametric estimation based on a metabolite basis set,” *NMR Biomed.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–13, Feb. 2005, doi: 10.1002/nbm.895.
- [113] M. Wilson, G. Reynolds, R. A. Kauppinen, T. N. Arvanitis, and A. C. Peet, “A constrained least-squares approach to the automated quantitation of *in vivo* ^1H magnetic resonance spectroscopy data: Automated Quantitation of *In Vivo* ^1H MRS Data,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 65, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2011, doi: 10.1002/mrm.22579.
- [114] Y. Völzke, E. D. Pracht, E. Hattingen, D. H. Y Tse, and T. Stöcker, “On the reproducibility of hippocampal MEGA-sLASER GABA MRS at 7T using an optimized analysis pipeline,” *Magma N. Y. N.*, Aug. 2020, doi: 10.1007/s10334-020-00879-9.
- [115] R. A. E. Edden, N. A. J. Puts, A. D. Harris, P. B. Barker, and C. J. Evans, “Gannet: A batch-processing tool for the quantitative analysis of gamma-aminobutyric acid-edited MR spectroscopy spectra: Gannet: GABA Analysis Toolkit,” *J. Magn. Reson. Imaging*, vol. 40, no. 6, pp. 1445–1452, Dec. 2014, doi: 10.1002/jmri.24478.
- [116] G. Oeltzschner *et al.*, “Osprey: Open-source processing, reconstruction & estimation of magnetic resonance spectroscopy data,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 343, p. 108827, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.jneumeth.2020.108827.
- [117] J. Guo, Z. Gang, Y. Sun, A. Laine, S. A. Small, and D. L. Rothman, “*In vivo* detection and automatic analysis of GABA in the mouse brain with MEGA-PRESS at 9.4 T,” *NMR Biomed.*, vol. 31, no. 1, p. e3837, Jan. 2018, doi: 10.1002/nbm.3837.
- [118] Y. Le Fur, F. Nicoli, M. Guye, S. Confort-Gouny, P. J. Cozzone, and F. Kober, “Grid-free interactive and automated data processing for MR chemical shift imaging data,” *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.*, vol. 23, no. 1, pp. 23–30, Feb. 2010, doi: 10.1007/s10334-009-0186-y.
- [119] Y. Le Fur, “Développements méthodologiques en imagerie spectroscopique : application à l’étude de modèles pathologiques chez le rat,” 1993.
- [120] W. T. Clarke *et al.*, “NifTI-MRS: A standard data format for magnetic resonance spectroscopy,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 88, no. 6, pp. 2358–2370, Dec. 2022, doi: 10.1002/mrm.29418.
- [121] L. Chen, Z. Weng, L. Goh, and M. Garland, “An efficient algorithm for automatic phase correction of NMR spectra based on entropy minimization,” *J. Magn. Reson.*, vol. 158, no. 1–2, pp. 164–168, Sep. 2002, doi: 10.1016/S1090-7807(02)00069-1.

Références

- [122] F. Savorani, G. Tomasi, and S. B. Engelsens, “icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra,” *J. Magn. Reson.*, vol. 202, no. 2, pp. 190–202, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.jmr.2009.11.012.
- [123] R. Simpson, G. A. Devenyi, P. Jezzard, T. J. Hennessy, and J. Near, “Advanced processing and simulation of MRS data using the FID appliance (FID-A)—An open source, MATLAB -based toolkit,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 77, no. 1, pp. 23–33, Jan. 2017, doi: 10.1002/mrm.26091.
- [124] C. Heinrich *et al.*, “Reelin deficiency and displacement of mature neurons, but not neurogenesis, underlie the formation of granule cell dispersion in the epileptic hippocampus,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 26, no. 17, pp. 4701–4713, Apr. 2006, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5516-05.2006.
- [125] W. Klement *et al.*, “A pericyte-glia scarring develops at the leaky capillaries in the hippocampus during seizure activity,” *Epilepsia*, vol. 60, no. 7, pp. 1399–1411, Jul. 2019, doi: 10.1111/epi.16019.
- [126] F. Boux, “Statistical methods for vascular magnetic resonance fingerprinting: application to the epileptic brain.,” 2020.
- [127] C. Brossard *et al.*, “MP3: Medical Software for Processing Multi-Parametric Images Pipelines,” *Front. Neuroinformatics*, vol. 14, p. 594799, 2020, doi: 10.3389/fninf.2020.594799.
- [128] I. Troprès *et al.*, “Imaging the microvessel caliber and density: Principles and applications of microvascular MRI,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 73, no. 1, pp. 325–341, Jan. 2015, doi: 10.1002/mrm.25396.
- [129] C. Heinrich *et al.*, “Increase in BDNF-mediated TrkB signaling promotes epileptogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy,” *Neurobiol. Dis.*, vol. 42, no. 1, pp. 35–47, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.nbd.2011.01.001.
- [130] J. Guo, Z. Gang, Y. Sun, A. Laine, S. A. Small, and D. L. Rothman, “*In vivo* detection and automatic analysis of GABA in the mouse brain with MEGA-PRESS at 9.4 T,” *NMR Biomed.*, vol. 31, no. 1, p. e3837, Jan. 2018, doi: 10.1002/nbm.3837.
- [131] J. Haam *et al.*, “GABA Is Excitatory in Adult Vasopressinergic Neuroendocrine Cells,” *J. Neurosci.*, vol. 32, no. 2, pp. 572–582, Jan. 2012, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3826-11.2012.
- [132] H. Ye and S. Kaszuba, “Inhibitory or excitatory? Optogenetic interrogation of the functional roles of GABAergic interneurons in epileptogenesis,” *J. Biomed. Sci.*, vol. 24, no. 1, p. 93, Dec. 2017, doi: 10.1186/s12929-017-0399-8.
- [133] J. Müller, A. Timmermann, L. Henning, H. Müller, C. Steinhäuser, and P. Bedner, “Astrocytic GABA Accumulation in Experimental Temporal Lobe Epilepsy,” *Front. Neurol.*, vol. 11, p. 614923, 2020, doi: 10.3389/fneur.2020.614923.
- [134] M. Lee, C. Schwab, and P. L. McGeer, “Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity,” *Glia*, vol. 59, no. 1, pp. 152–165, Jan. 2011, doi: 10.1002/glia.21087.

Références

- [135] G. Carello-Collar *et al.*, “The GABAergic system in Alzheimer’s disease: a systematic review with meta-analysis,” *Mol. Psychiatry*, vol. 28, no. 12, pp. 5025–5036, Dec. 2023, doi: 10.1038/s41380-023-02140-w.
- [136] J. U. Blicher *et al.*, “GABA levels are decreased after stroke and GABA changes during rehabilitation correlate with motor improvement,” *Neurorehabil. Neural Repair*, vol. 29, no. 3, pp. 278–286, 2015, doi: 10.1177/1545968314543652.

8. Annexes

8.1 Curriculum vitae



Alicia PLAINDOUX

📍 28 rue Aimé Requet, 38000 Grenoble

☎ +33 6 50 24 32 85

✉ alicia.plaindoux@univ-grenoble-alpes.fr

FORMATIONS

- ▶ **Formation en Expérimentation Animale niveau Concepteur**
2021, UGA
- ▶ **DIPLÔME INGÉNIEUR en Ingénierie Biomédicale, spécialisé en Imagerie médicale**
2020, GRENOBLE-INP PHELMA
- ▶ **MASTER en Nanomédecine et Biologie Structurale**
2020, GRENOBLE-INP PHELMA

COMPÉTENCES

- **Programmation Matlab, Python et C**
- **Acquisition de données sur IRM préclinique Bruker**
- **Développement de méthodes de SRM préclinique (conventionnelles et d'édition) sous Paravision**
- **Optimisation de protocoles IRM et SRM**
- **Traitement et analyse de données IRM et SRM**

LANGUES

- ▶ **Français : langue maternelle**
- ▶ **Anglais : C2**
- ▶ **Espagnol : A2**

EXPÉRIENCES PROFESSIONNELLES

- **Octobre 2020 - Mai 2024 | DOCTORAT Grenoble Institut des Neurosciences**
Spectroscopie RMN (SRM) *in vivo* éditée, couplée à de l'IRM multiparamétrique pour localiser la zone épileptogène dans un modèle animal d'épilepsie focale :
 - Développement de méthodes de SRM *in vivo* mono-voxel et CSI pour l'édition du GABA (Bruker Paravision).
 - Développement de fantômes multicompartiments pour l'évaluation des méthodes.
 - Mise en place du protocole d'acquisition CSI d'édition du GABA.
 - Développement des outils de traitement des données (Matlab et Python).
 - Acquisitions IRM multiparamétrique.
 - Immunohistologie.

Valorisations scientifiques :

 - 2021 : SFRMBM (Power Pitch et Poster), ISMRM (Présentation vidéo)
 - 2023 : ISMRM (Poster Digital), EMIM (Présentation orale), Symposium for GABA and Advanced MRS (Présentation orale)
 - Publication scientifique en cours de publication.
- **2021-2024 | Enseignements UGA et Grenoble-INP**
 - TP IRM Grenoble-INP Phelma (2021 à 2024).
 - TD UFR Chimie Biologie, L2, Module Question d'actualité en Biologie (2021 à 2023).
 - TD UFR Chimie Biologie, L1, Constituants biomoléculaires de la cellule (2022).
- **Février-Juillet 2020 | STAGE Grenoble Institut des Neurosciences**
Edition sélective de métabolites cérébraux par SRM *in vivo* :
 - Programmation d'une séquence de SRM *in vivo* (Bruker Paravision).
 - Adaptation d'un programme de traitement des données SRM (Matlab).
 - Acquisitions sur un modèle de souris.
- **Mai-Août 2019 | STAGE Clinical Imagine Sciences Center, Université du Sussex**
 - IRM fonctionnel (ASL & qBOLD) : développer et valider des techniques non invasives pour quantifier le métabolisme cérébral.
 - Utilisation de SPM12 et développement de codes de traitement des images (Matlab).
 - Participation au congrès BC ISMRM 2019 : 2 abstracts acceptés (1er et 2ème auteur), présentation d'un poster.
 - Abstract accepté au congrès ISMRM 2020 (2ème auteur).
- **Juin 2018 | STAGE Unité d'expertise Pharmaceutique et de recherche Biomédicale - Hôpital de La Timone**
 - Rédaction d'un protocole d'essai clinique de phase II, portant sur les effets d'un glycoside cardiaque sur les glioblastomes.

8.2 Communications scientifiques

- **SFRMBM 2021 – Poster et Power Pitch** : Florence FAUVELLE, Vasile STUPAR, Lucile MAZIERE, Alicia PLAINDOUX, Sophie HAMELIN, Emmanuel BARBIER, Antoine DEPAULIS. *Augmentation in vivo de GABA comme biomarqueur de la zone épileptogène dans un modèle animal d'épilepsie focale.*
- **ISMRM 2021 – Présentation vidéo** : Florence FAUVELLE, Vasile STUPAR, Jia GUO, Wafae LABRIJI, Chen LIU, Alicia PLAINDOUX, Emmanuel Luc BARBIER, Sophie HAMELIN, and Antoine DEPAULIS. *In vivo GABA increase as a biomarker of the epileptogenic zone: an unbiased metabolomics approach.*
- **EMIM 2023 – Présentation orale** : Alicia PLAINDOUX, Yann LE FUR, Jia GUO, Clothilde COURIVAUD, Julien VALETTE, Vasile STUPAR, Florence FAUVELLE. *GABA spectroscopic imaging for the localization of the epileptogenic zone in an animal model of focal epilepsy.*
- **ISMRM 2023 – Poster digital** : Alicia PLAINDOUX, Yann LE FUR, Jia GUO, Clothilde COURIVAUD, Julien VALETTE, Vasile STUPAR, Florence FAUVELLE. *GABA spectroscopic imaging at 9.4T to localize the epileptogenic zone in an animal model of focal epilepsy.*
- **SFRMBM 2023 – Poster** : Alicia PLAINDOUX, Yann LE FUR, Jia GUO, Clothilde COURIVAUD, Julien VALETTE, Vasile STUPAR, Florence FAUVELLE. *Imagerie spectroscopique du GABA pour la localisation de la zone épileptogène dans un modèle animal d'épilepsie focale.*
- **Symposium for GABA and Advanced MRS 2023 – Présentation orale** : Alicia PLAINDOUX, Yann LE FUR, Jia GUO, Clothilde COURIVAUD, Julien VALETTE, Vasile STUPAR, Florence FAUVELLE. *Development of the MEGA-LASER CSI pulse sequence at 9.4T and of an automated processing pipeline, to localize the epileptogenic zone in an animal model of focal epilepsy.*

8.3 Annexe 3 : Données supplémentaires du Chapitre 5

8.3.1 Illustrations supplémentaires

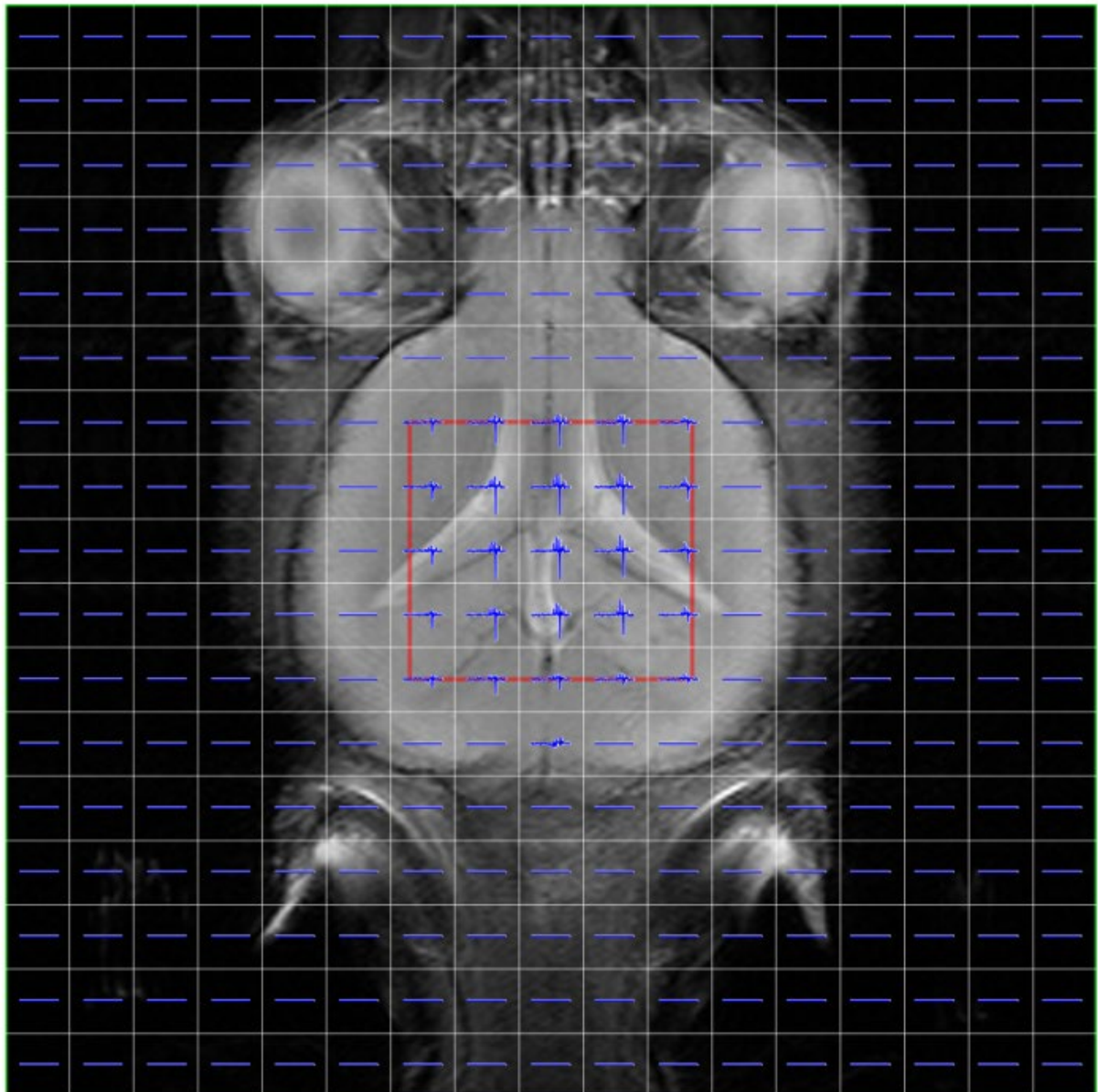
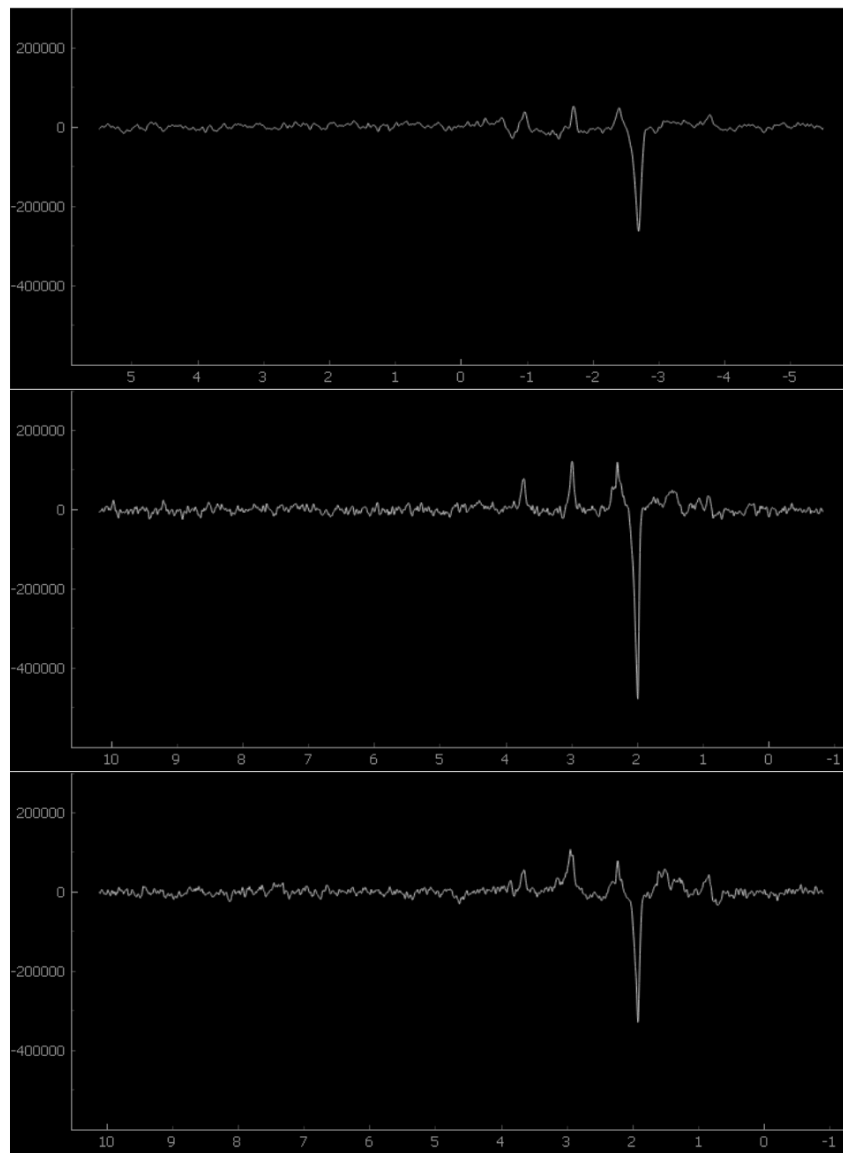
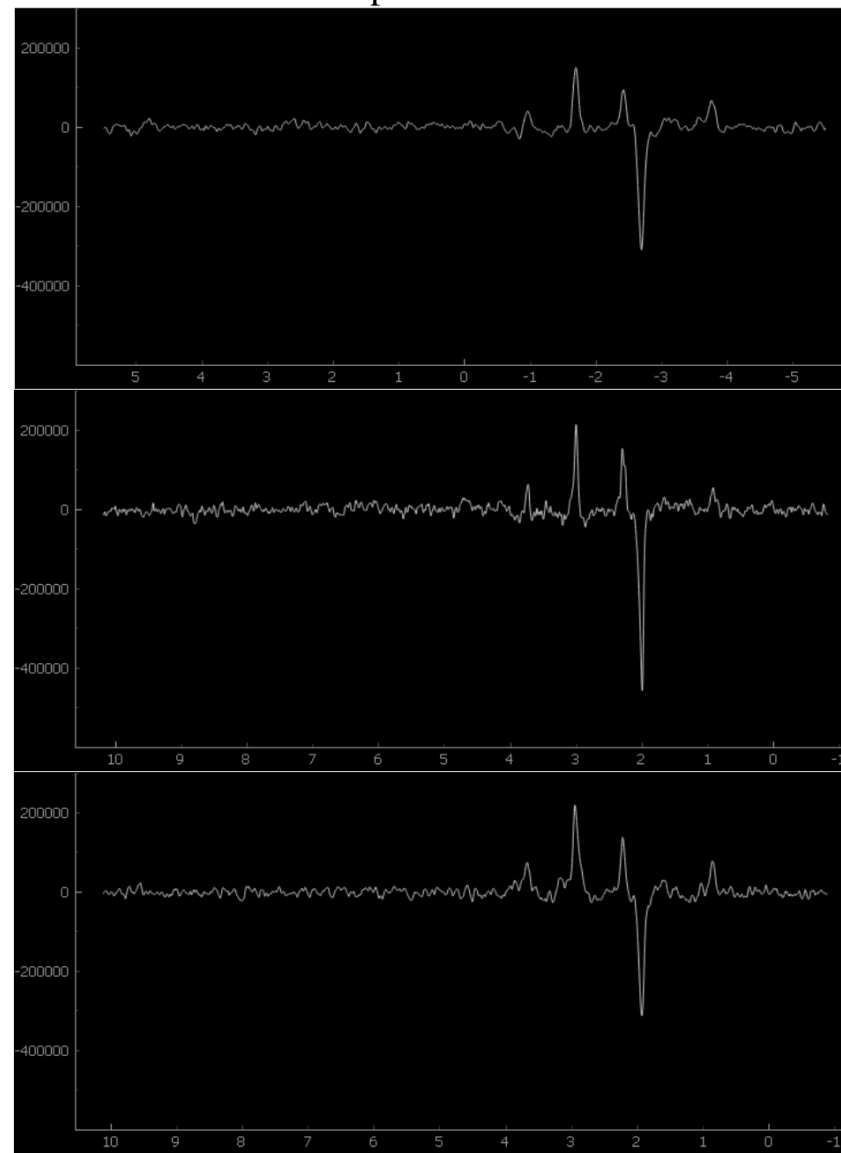


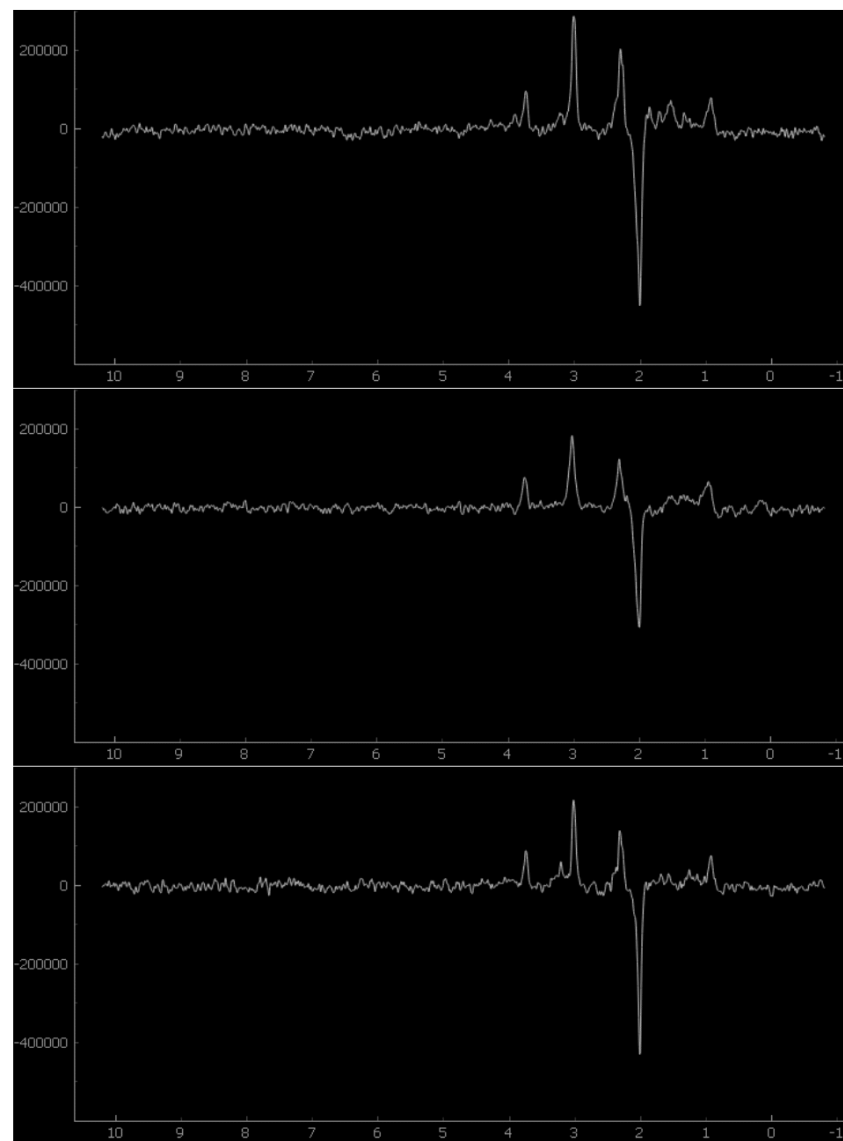
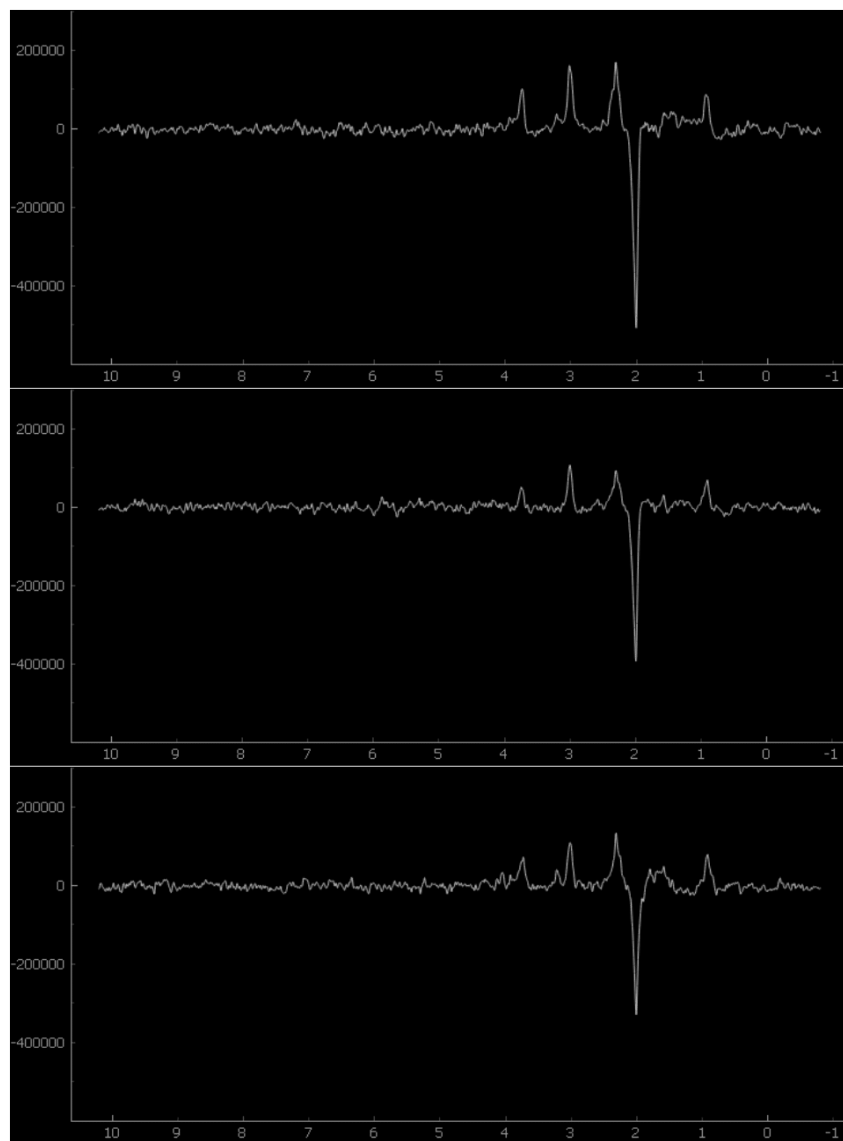
Figure A3-1. Exemple d'une matrice de spectres Différence, après prétraitement par JET, obtenue avec la CSI MEGA-LASER sur une souris présentée Figure 5-9 et superposée à l'image anatomique T2 possédant le même FOV.

Controlatéral



Ipsilatéral





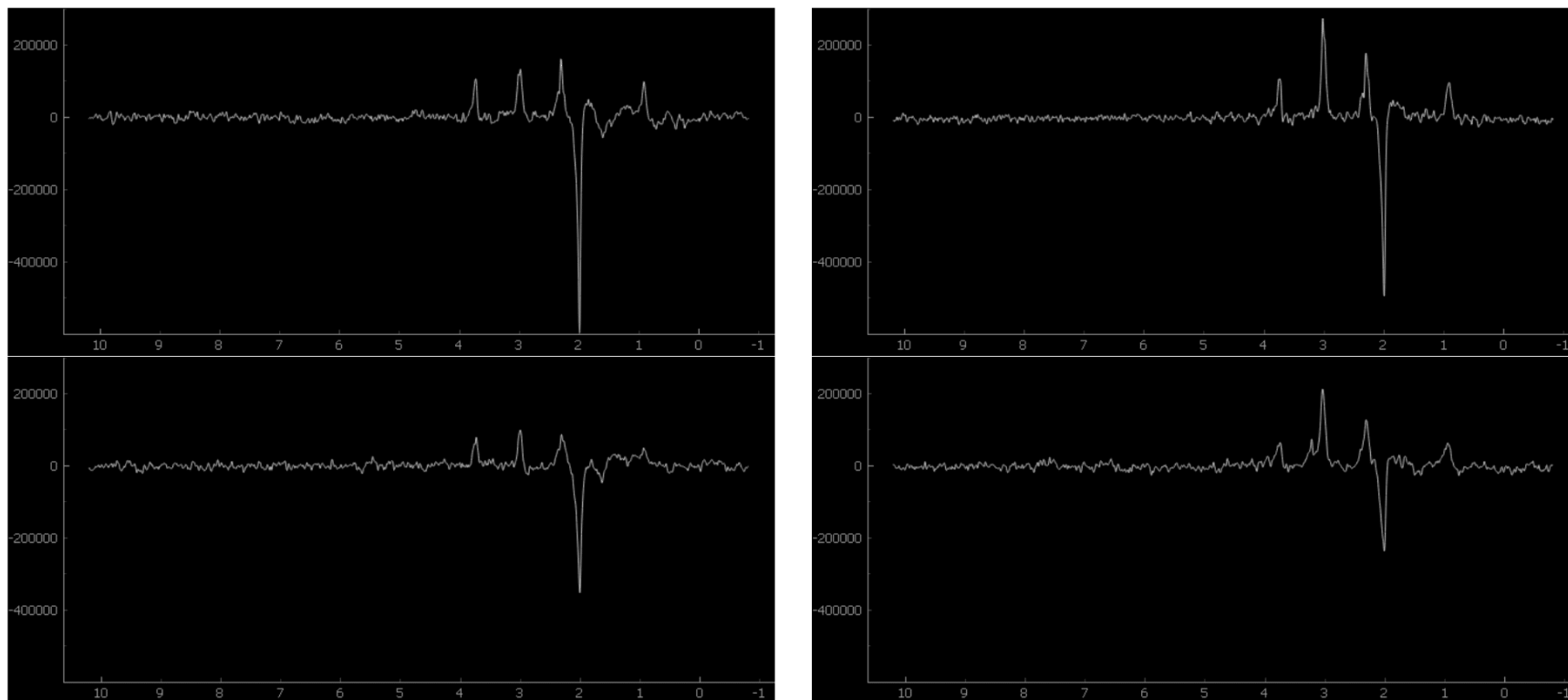


Figure A3-2. Exemples de spectres dans l'hippocampe controlatéral (colonne de gauche) et ipsilatéral (colonne de droite), visualisés dans CSIapy après prétraitement par JET, obtenus avec la CSI MEGA-LASER chez 8 souris KA-MTLE.

Position du spectre

Spectre associé

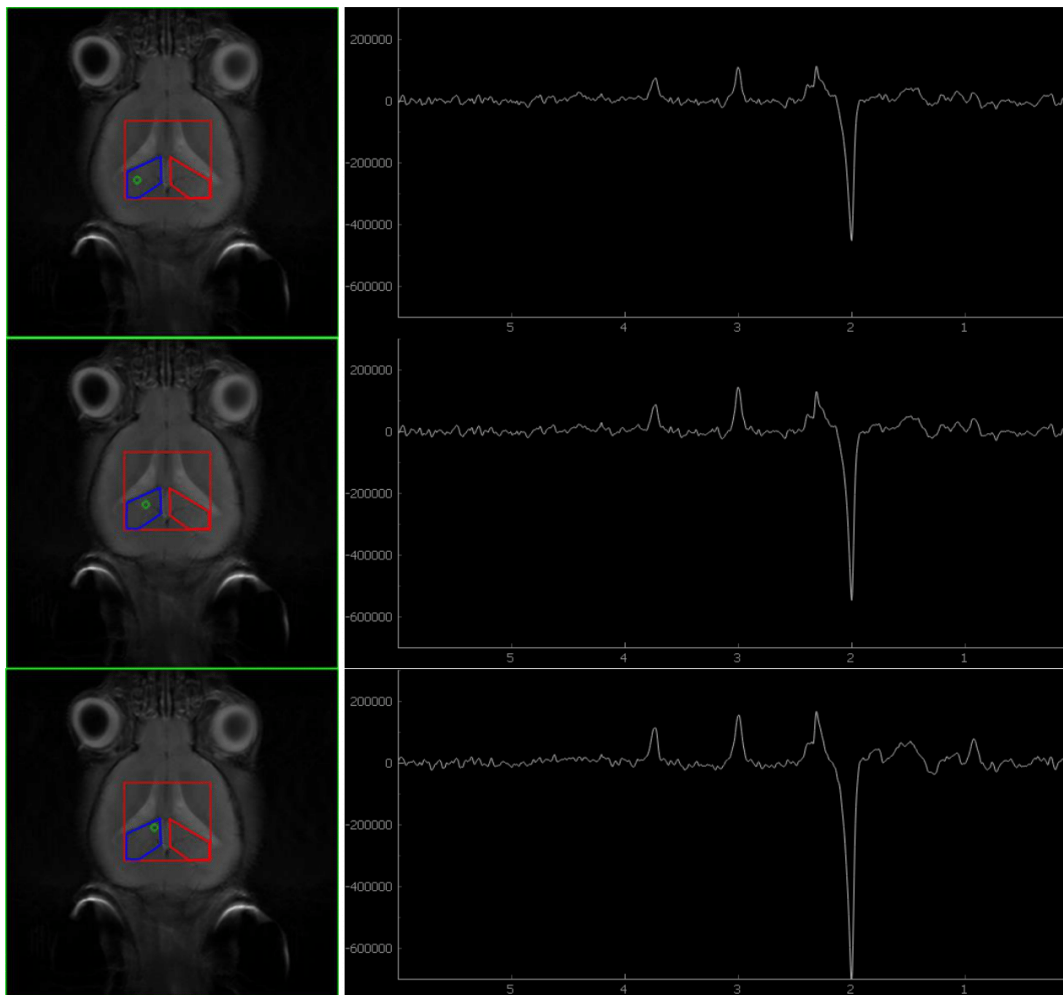




Figure A3-3. Exemple de 6 spectres obtenus dans les deux hippocampes ipsilatéral et controlatéral d'une souris KA-MTLE. Le voxel d'intérêt est représenté par le carré rouge. La ROI sélectionnée pour la quantification de la carte GABA+/GLX, présentée Figure 5-4, est représentée en bleu pour l'hippocampe controlatéral, et en rouge pour l'ipsilatéral. Le rond vert indique la position du spectre par rapport à la carte anatomique.

8.3.2 Variation du GABA+/GLX dans l'hippocampe ipsilatéral

Ci-dessous, la Figure A3-4 illustre trois ROIs sélectionnées, de chacune $0,25 \text{ mm}^2$ (ce qui correspond à un volume de $0,3125 \text{ mm}^3$), correspondant environ à la taille d'un voxel après le zero-filling de 17×17 à 51×51 (représenté par le rond vert dans l'image de droite). Les ROIs 1 et 2 sont localisés dans l'hippocampe ipsilatéral, au centre de celui-ci (2) et à la limite de l'hippocampe controlatéral (1). La troisième ROI est localisée au centre de l'hippocampe controlatéral.

Il est important de noter que la sélection d'une ROI aussi petite ne donne pas d'information sur la limite de détection de la méthode, puisque la quantification est déjà réalisée sur l'ensemble de la carte CSI. Les ROIs servent uniquement à la délimitation d'une zone pour calculer la valeur moyenne de la carte métabolique, en l'occurrence du GABA+/GLX. Cependant, on peut clairement voir sur les cartes présentées Figure 5-9 que l'augmentation du ratio n'est pas homogène sur l'ensemble de l'hippocampe. On peut s'attendre à ce que le GABA+/GLX soit le plus élevé au centre de l'hippocampe dorsal (ROI 2), correspondant au point d'injection du KA. La Figure A3-5 présente les résultats obtenus dans les 3 ROIs, et on peut constater que le ratio GABA+/GLX est significativement plus élevé dans les 2 ROIs de l'hippocampe ipsilatéral par rapport à l'hippocampe controlatéral.

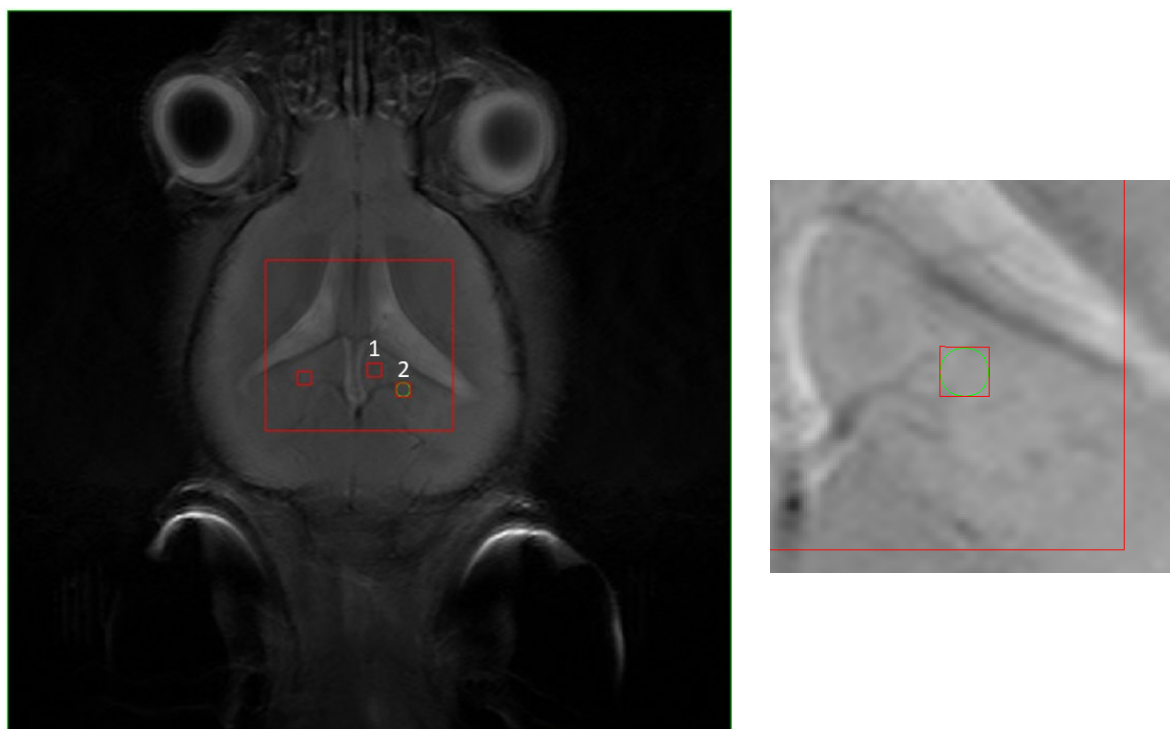


Figure A3-4. Image anatomique T2 avec le même FOV que la CSI MEGA-LASER d'une souris présentée Figure 5-9. Le voxel d'intérêt est représenté en rouge, ainsi que les trois ROIs sélectionnées : une dans l'hippocampe controlatéral et deux l'hippocampe ipsilatéral. La taille du voxel est représentée en vert. Les ROIs ont une taille de $0,25 \text{ mm}^2$, ce qui correspond à un volume de $0,3125 \text{ mm}^3$ en considérant l'épaisseur de coupe de $1,25 \text{ mm}$.

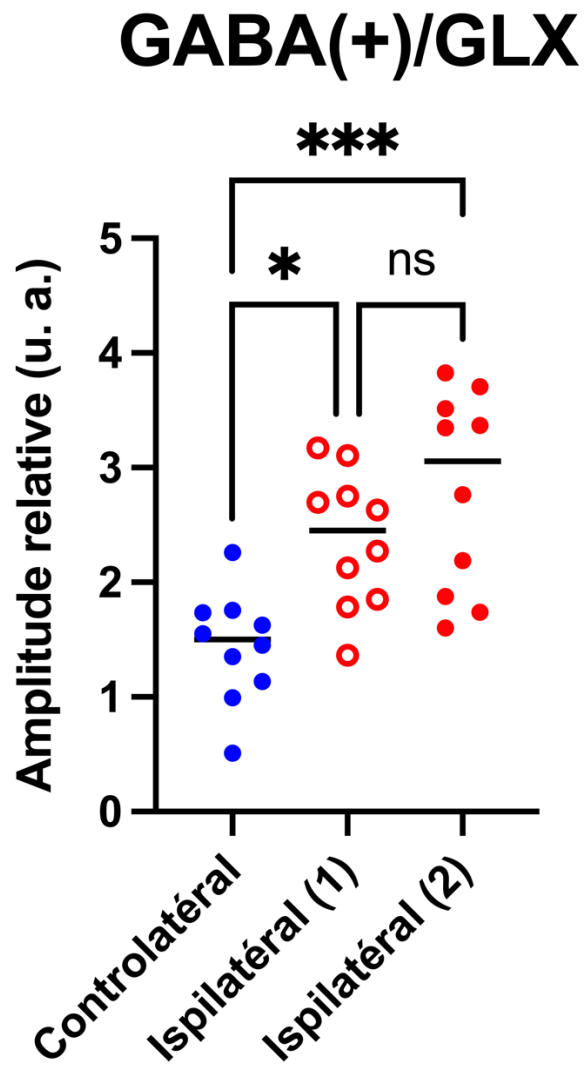


Figure A3-5. Comparaison de la valeur moyenne du GABA+/GLX dans une ROI de $0,25 \text{ m}^2$ (soit un volume de $0,3125 \text{ mm}^3$ pour l'épaisseur de coupe de $1,25 \text{ mm}$) dans l'hippocampe dorsal ipsilatéral et controlatéral chez 10 souris KA-MTLE présentées Figure 5-9. La position des ROIs est visible sur la 8.3.2. Test Kruskal-Wallis avec correction Dunn : Ipsilatéral (1) VS Controlatéral, $P < 0,05$; Ipsilatéral (2) VS Controlatéral, $P < 0,001$.