

N° D'ORDRE :

Année 2010

Mémoire présenté devant  
**L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1**  
En vue de l'obtention de  
**L'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES**

Présentée et soutenue publiquement le 18 mai 2010  
par

**Marlène Wiart**

**METHODOLOGIE EXPLORATOIRE EN IMAGERIE PAR  
RESONANCE MAGNETIQUE (IRM) :**  
**Etude des pathologies cardiovasculaires et de leurs  
conséquences tissulaires**

**JURY :**

Dr Mike Modo (rapporteur)

Pr Patrick Cozzzone (rapporteur)

Dr Claire Corot

Pr Norbert Nighoghossian

Pr Yves Berthezène

Pr Didier Revel

Pr Jean-Claude Baron (rapporteur non membre du jury)

## Table des matières

Table des illustrations.....	3
Remerciements.....	5
Préambule.....	8
Chapitre 1. Titres et travaux.....	10
Curriculum vitae.....	11
1. Thèmes de recherche : bilan et perspectives .....	12
1.1. Thèmes de recherche .....	12
1.2. Résumé des activités de recherche et des travaux effectués .....	12
1.3. Perspectives de recherche.....	13
2. Production scientifique.....	14
2.1. Synthèse .....	14
Choix de 5 publications récentes représentatives.....	14
Renseignements complémentaires .....	14
2.2. Publications dans des revues à comité de lecture.....	15
2.3. Lettres à l'éditeur .....	16
2.4. Conférences invitées .....	16
2.5. Communications dans des colloques avec comité de lecture.....	17
3. Autres activités.....	19
3.1. Activités d'enseignement .....	19
3.2. Responsabilités scientifiques et administratives .....	19
3.3. Coopération industrielle et valorisation .....	23
3.4. Information scientifique, technique et vulgarisation.....	24
3.5. Activités internationales.....	24
Chapitre 2. Mémoire de recherche.....	26
Introduction.....	27
1. Les produits de contraste en IRM .....	28
1.1. Rappels sur le magnétisme .....	28
1.1.1. Origine du magnétisme .....	28
1.1.2. Magnétisme des métaux 3d et des métaux 4f.....	29
1.1.3. Domaines magnétiques .....	29
1.1.4. Superparamagnétisme .....	31
1.1.5. Evolution de l'aimantation en fonction du champ .....	31
1.2. Les agents paramagnétiques.....	33
1.2.1. Caractéristiques physico-chimiques.....	33
1.2.2. Propriétés magnétiques .....	34
1.2.3. Pharmacocinétique et biodistribution.....	35
1.2.4. Biocompatibilité.....	35
1.3. Les agents superparamagnétiques ( <i>basé sur (Laurent et al. 2008)</i> ).....	36
1.3.1. Composition chimique .....	36
1.3.2. Propriétés magnétiques .....	37
1.3.3. Internalisation in-vitro par les macrophages .....	40
1.3.4. Pharmacocinétique et biodistribution.....	40
1.3.5. Métabolisme .....	41
1.3.6. Biocompatibilité .....	41
1.4. Les noyaux hyperpolarisés .....	42
1.5. Développements actuels et futurs.....	42
2. Quantification de la perfusion et de la perméabilité en IRM .....	43

2.1.	Analyse de la cinétique d'un agent de contraste .....	43
2.1.1.	Techniques IRM .....	43
2.1.2.	Quantification des paramètres de perfusion et de perméabilité .....	46
2.1.3.	Entrée artérielle .....	52
2.1.4.	Méthodes de déconvolution .....	53
2.2.	Travaux de recherche .....	54
2.2.1.	Perfusion pulmonaire .....	54
2.2.2.	Perfusion cérébrale .....	57
2.2.3.	Perfusion myocardique .....	61
2.2.4.	Perfusion prostatique .....	66
2.2.5.	Perfusion hépatique .....	72
2.2.6.	Perméabilité tumorale .....	75
2.3.	Perspectives .....	76
3.	IRM de la neuro-inflammation post-ischémique .....	77
3.1.	Utilisation des USPIO pour le marquage magnétique des macrophages .....	77
3.1.1.	Les phénomènes inflammatoires dans l'ischémie cérébrale .....	77
3.1.2.	Evaluation de la neuro-inflammation post-ischémique en IRM .....	79
3.2.	Travaux de recherche .....	85
3.2.1.	Rôle des récepteurs nucléaires PPAR au décours de l'ischémie cérébrale ..	85
3.2.2.	IRM de la neuroinflammation ischémique chez la souris .....	87
3.2.3.	Interprétation des signaux RM précoces liés aux USPIO .....	90
3.2.4.	Quantification du signal RM des USPIO .....	93
3.2.5.	Translation clinique de la technique IRM réhaussée avec les USPIO .....	95
3.3.	Perspectives .....	96
4.	Perspectives de recherche .....	97
5.	Conclusion .....	101
	Références .....	103
	Annexes .....	117

## Table des illustrations

Figure 1- Arrangement des moments magnétiques atomiques permettant de décrire les trois sous-familles de ferromagnétisme.....	29
Figure 2- Organisation en domaines de Weiss d'un petit cristal de Fer unique.....	30
Figure 3- Orientation des dipôles magnétiques avec et sans champ magnétique externe.....	32
Figure 4- Courbe magnétométrique de différentes nanoparticules d'oxyde de Fer.....	32
Figure 5- Structures de chélates du gadolinium linéaire et macrocyclique.....	33
Figure 6- Etat d'équilibre de la liaison de gadolinium dans les produits de contraste.....	33
Figure 7- Différentes contributions à la relaxation du proton dans le modèle simplifié pour les cristaux présentant une anisotropie élevée.....	38
Figure 8- Profil NMRD T1 de particules de magnétite colloïdales en solution.....	39
Figure 9- Modèle pharmacocinétique à deux compartiments.....	48
Figure 10- Variations de $\Delta R1$ dans le plasma et dans le tissu tumoral.....	51
Figure 11- Evolution du signal RM de l'hélium 3 dans les poumons d'un rat.....	55
Figure 12- Cartographie de volume sanguin pulmonaire chez un rat.....	56
Figure 13- Cartographie de perfusion cérébrale chez l'homme.....	58
Figure 14- Segmentation basée sur la perfusion obtenue à l'aide de cartographies de similarité et courbes de premier passage correspondantes.....	59
Figure 15- Courbes de premier passage pour la mesure de la perfusion myocardique.....	61
Figure 16- Conversion des variations de signal RM en variations de concentration en fonction du régime d'échange d'eau dans le myocarde.....	64
Figure 17- Débit sanguin régional myocardique mesuré en IRM en fonction du débit mesuré avec les microsphères radioactives.....	65
Figure 18- Courbes de premier passage pour l'étude de la perfusion prostatique : entrée artérielle, prostate et muscle.....	67
Figure 19- Courbes de premier passage pour la perfusion prostatique : glande centrale et zone périphérique.....	68
Figure 20- Cartographie de la perfusion prostatique.....	71
Figure 21- Variations de signal dans le plasma et dans le tissu hépatique.....	73
Figure 22- Distribution de deux paramètres d'ajustement indépendants.....	74
Figure 23- Chronologie des événements au cours de l'ischémie cérébrale.....	78
Figure 24- Correspondance entre la lésion détectée en IRM à J3 et la lésion détectée en histopathologie.....	86
Figure 25- IRM réhaussé avec les USPIO et immunohistologie 72h post-ischémie.....	89
Figure 26- IRM réhaussé avec les USPIO, et immunohistologie 6h et 24h post-ischémie.....	92
Figure 27- Injections stéréotaxiques d'USPIO libres et de macrophages marqués avec les USPIO dans le cerveau de la souris saine.....	94
Figure 28- IRM réhaussée avec les USPIO : étude clinique.....	95
Figure 29- IRM pondérée T2* suite à l'injection de macrophages marqués dans un modèle d'ischémie- reperfusion chez un rat.....	98
Figure 30- Microscopie électronique haute résolution d'un lysosome cellulaire contenant du Fer.....	99



## Remerciements

Je remercie chaleureusement le Professeur Didier Revel pour m'avoir accueillie sur le site hospitalier de Creatis et pour avoir suivi avec intérêt mon travail depuis le début. Je le remercie également pour sa disponibilité, sa gentillesse et son soutien, sans lesquels mes projets n'auraient pu aboutir. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance. Je remercie également Mme Isabelle Magnin pour ses contributions actives à la réussite de mes projets de recherche, en tant que directrice de l'unité.

Je suis très heureuse et honorée que le Professeur Jean-Claude Baron ait accepté d'être rapporteur de ce travail, après avoir présidé mon jury de thèse, et je l'en remercie sincèrement. Je suis très reconnaissante au Professeur Patrick Cozzone pour son soutien continu et ses conseils avisés lors de mon début de carrière au CNRS, et je suis donc particulièrement heureuse de le compter parmi les juges de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements chaleureux. Je remercie enfin vivement le Professeur Mike Modo pour avoir accepté d'examiner ce travail en tant qu'expert international.

J'exprime toute ma gratitude au Professeur Yves Berthezène, qui m'a dirigée et conseillée avec beaucoup de patience tout au long de ma carrière. Je le remercie particulièrement pour m'avoir proposé d'abord un sujet de DEA, puis un sujet de thèse, et pour m'avoir fait profiter de sa grande expérience dans le domaine de l'IRM. Je lui suis infiniment reconnaissante d'avoir organisé avec le Pr Revel mon séjour post-doctoral dans l'équipe du Pr Brash à San Francisco, puis de m'avoir permis d'intégrer l'équipe *Ischémie cérébrale* à mon retour en France. J'apprécie profondément la qualité de la recherche mais aussi des rapports humains qu'il a su instaurer dans cette équipe. Je le remercie enfin pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je salue le Professeur Norbert Nighoghossian pour le temps et l'énergie qu'il a consacrés à mes projets de recherche depuis mes travaux de thèse jusqu'à aujourd'hui. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir enseigné les notions de neurologie indispensables à la réalisation de ces projets avec beaucoup de passion, et d'avoir permis mon recrutement dans l'équipe *Ischémie cérébrale*. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude. J'apprécie particulièrement le dynamisme et l'enthousiasme qu'il sait insuffler à ses jeunes collaborateurs. Je suis très heureuse de le compter parmi les membres de mon jury, et je l'en remercie vivement.

Je remercie très sincèrement Emmanuelle Canet pour son rôle de mentor depuis mes premiers pas dans le monde de la recherche. Je lui exprime ma profonde reconnaissance pour m'avoir fait profiter de sa grande expérience dans le domaine de l'IRM couplée à l'utilisation de produits de contraste, et pour toutes les opportunités qu'elle m'a offertes, me permettant d'élargir mon domaine de recherche. Je tiens également à la remercier chaleureusement pour son soutien efficace et continu, aussi bien au niveau scientifique que personnel. Qu'elle soit ici assurée de mon estime et de mon amitié.

Je suis reconnaissante à Claire Corot du laboratoire Guerbet pour les collaborations très fructueuses engagées entre nos équipes. Je la remercie particulièrement d'avoir su me faire profiter de ses grandes connaissances dans le domaine des produits de contraste avec dynamisme et simplicité. Je suis ravie qu'elle ait acceptée de participer à ce jury et je l'en remercie chaleureusement.

Je suis particulièrement redevable à Bruno Neyran qui a la gentillesse de partager avec moi ses développements mathématiques et les algorithmes associés pour la quantification de la perfusion, et dont j'apprécie particulièrement la disponibilité et la bonne humeur. Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

Je remercie chaleureusement les secrétaires de Radiologie, Renée Hasquenoph, Véronique Ficagna, et plus récemment Delphine Couturier, pour leur gentillesse et l'aide qu'elles m'ont apportées tout au long de ces années. Je remercie également tous les personnels techniques de Creatis sans qui rien n'aurait pu ni ne pourrait se faire, et je m'excuse de ne pouvoir tous les citer. J'adresse une mention spéciale à l'équipe informatique, et en particulier à Jean-Pierre Roux et Eduardo Davila, qui ont déployé de multiples et persistants efforts pour nous permettre d'analyser les images issues des imageurs. Je les remercie pour les excellentes conditions de travail qu'ils ont su assurer, ainsi que pour les nombreuses et stimulantes discussions.

Je remercie enfin tous ceux qui m'ont soutenue et m'ont fait partager leur bonne humeur durant leur séjour au B13. Je ne peux pas tous les citer mais ils se reconnaîtront. Merci finalement à tous ceux qui d'une manière ou d'une autre, ont contribué à ce travail.

*Je dédie ce manuscrit à Anita, qui m'a accompagnée tout au long de ces quatorze années de recherche*



## Préambule

Ce mémoire représente une synthèse de quatorze années de travaux de recherche initiés en 1996, année de mon inscription en DEA de Génie Biologique et Médical. L'objectif de mon stage de DEA, réalisé au laboratoire Creatis (UMR CNRS 5515) sous la direction du Pr Yves Berthezène, était d'évaluer une nouvelle technique ultra-rapide d'IRM de perfusion pour la mise en évidence d'un déficit de perfusion pulmonaire chez des patients. Mes premiers pas dans le domaine de l'IRM ont donc coïncidé avec ma découverte du domaine des produits de contraste et de leur pharmacocinétique, domaines qui sont depuis au cœur de mes activités de recherche.

Cette première étude m'a permis de comprendre les bases de l'imagerie fonctionnelle en IRM, et plus particulièrement la méthode dite « de dilution des indicateurs colorés », qui permet d'étudier les débits sanguins dans un organe. L'approche fonctionnelle de la perfusion en IRM a également fait l'objet de ma thèse de doctorat. Celle-ci s'intégrait dans la problématique de recherche cardio-vasculaire du laboratoire, au sein d'une équipe émergente codirigée par les Pr Yves Berthezène et Norbert Nighoghossian, qui est devenue depuis l'équipe *Ischémie cérébrale*. L'objectif premier était l'évaluation des anomalies de la perfusion cérébrale au cours de l'ischémie chez des patients, par des études de cinétiques de premier passage d'agent de contraste à l'aide de techniques IRM ultra-rapides.

Les questions cliniques ont toujours orienté les objectifs méthodologiques abordés mon travail, en étroite collaboration avec les médecins. J'ai également perçu, à travers ces collaborations, l'intérêt des approches expérimentales chez l'animal comme complément des études cliniques. Par conséquent, j'ai réalisé par la suite un stage post-doctoral au Centre d'imagerie moléculaire et pharmaceutique (*Center for molecular and pharmaceutical imaging*, UCSF, Californie, Etats-Unis), dirigé par le Pr Robert C Brasch, où je me suis formée à l'expérimentation animale. En outre, j'ai pu m'initier à l'imagerie fonctionnelle de la tumeur cancéreuse, et aux méthodes permettant d'extraire des paramètres fonctionnels autres que la perfusion tissulaire, tels que la perméabilité capillaire.

De retour en France, recrutée en tant que Chargée de recherche CNRS au laboratoire Creatis, j'ai mis en place le plateau expérimental permettant l'étude de l'accident vasculaire cérébral chez le rongeur sur la plateforme d'imagerie du petit animal « Animage ». Les efforts de recherche de l'équipe *Ischémie cérébrale* s'orientaient alors sur l'étude de l'inflammation dans l'accident vasculaire cérébral. Mes travaux se sont donc poursuivis dans ces deux champs : d'une part la quantification de la perfusion (dans le cerveau mais également hors du cerveau : cœur, prostate, foie), et d'autre part le développement et la validation d'une technique IRM permettant d'évaluer l'inflammation cérébrale, à l'aide de l'administration intraveineuse de nanoparticules d'oxyde de Fer. Ces travaux ont été menés principalement dans le cadre des thèses de sciences de Jean-Baptiste Pialat (soutenue le 23 juin 2008), Virginie Desestret et Jean-Christophe Brisset (soutenances prévues en octobre 2009).

Enfin, nous avons comme perspectives de recherche l'évaluation de nouvelles stratégies de neuroprotection chez le rongeur à l'aide de l'IRM multimodale (thèse en cours de Tae-Hee Cho et post-doctorat en cours de Fabien Chauveau) et d'une stratégie de thérapie cellulaire basée sur le marquage magnétique *ex vivo* des macrophages (thèses en cours de Marilena Marinescu et Adrien Riou). Le premier projet est réalisé dans le cadre de l'ANR du Programme National de Recherche en Alimentation et nutrition humaine (PNRA)

*NEUROPROTECT*, le second est réalisé dans le cadre de l'ANR Technologie pour la Santé (TecSan) *INFLAM*, dont j'assure la coordination avec les Pr Yves Berthezène et Emmanuelle Canet-Soulas. Les objectifs généraux d'*INFLAM* (*INFLAMmation in brain and vessels with iron nanoparticles and cell trafficking: a multi-scale approach of tissue microenvironment, iron nanostructure and iron biotransformations*) reposent sur l'évaluation des interactions biologiques des nanovecteurs les plus avancés cliniquement et sur la conception et la synthèse de produits et méthodes innovants, afin de sélectionner l'agent de contraste le plus prometteur pour des études cliniques à grande échelle de l'inflammation vasculaire et cérébrale. Ce projet implique 7 partenaires académiques et 2 partenaires industriels. Il est financé depuis décembre 2007 pour une durée de 3 ans.

# **Chapitre 1. Titres et travaux**

## Curriculum vitae

### Marlène WIART

Creatis UMR CNRS 5220 U630 Inserm

28 avenue Doyen Lepine

69677 Bron cedex

Téléphone 33 4 72 11 90 13 Fax 33 4 72 68 49 16

E-mail [marlene.wiart@creatis.univ-lyon1.fr](mailto:marlene.wiart@creatis.univ-lyon1.fr)

Née le 9 août 1974 à Le Havre (76)

**Fonction** : Chargée de recherche CNRS à Creatis (UMR CNRS 5220 U630 Inserm)

### Thèmes de recherche :

- Biomarqueurs de l'inflammation pour l'exploration fonctionnelle par RMN du système nerveux central post-ischémique
- Modélisation de la dynamique d'un traceur pour la mesure de la perfusion et de la perméabilité capillaire en IRM

### Cursus

---

1992	<b>Baccalauréat section C</b> (Académie de Lyon, mention <b>Très Bien</b> )
1996	Maîtrise de physique fondamentale, Université Claude Bernard Lyon I (UCBL, Assez Bien) → <b>Admission sur dossier en 1994 à l'Ecole Normale supérieure de Lyon</b> , Magistère Sciences de la matière
1997	Diplôme d'Etudes Approfondies (Génie biologique et médical, option Imagerie, UCBL, Bien)
2000	<b>Doctorat</b> (Biologie Humaine, UCBL, Très honorable et félicitations) : <i>Imagerie par Résonance Magnétique de la perfusion cérébrale : modélisation de la cinétique d'un produit de contraste intravasculaire</i>
2001	<b>Post-Doctorat</b> (UCSF, Radiology, Prof. B. Brasch, San Francisco)
2002	Recrutée en tant que CR2 CNRS, Sciences pour l'ingénieur, section 30 (Creatis, UMR CNRS 5515, I. Magnin)
2006	Promotion au grade de CR1 CNRS Autorisation nominative d'expérimenter sur animaux vivants (n°69383518)

### Prix

---

1998	Prix européen de l'APERR (Association Pour l'Etude et la Recherche en Radiologie) : <i>Evaluation d'une technique rapide d'Imagerie par Résonance Magnétique pour la détection d'un déficit de perfusion pulmonaire</i>
2005	<b>Young Investigator Award</b> du symposium international Contrast Media Research : <i>Magnetic resonance imaging of cerebral ischemia with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in mice</i>
2007	<b>Prix du jeune chercheur de la ville de Lyon</b> , Sciences de la Matière et de la technologie

# **1. Thèmes de recherche : bilan et perspectives**

## **1.1. Thèmes de recherche**

Les objectifs généraux de mon projet de recherche portent sur le développement de techniques innovantes en IRM ainsi que de méthodes de post-traitement des images, chez l'homme et sur des modèles animaux. Mes actions de recherche sont centrées sur des problématiques médicales liées pour l'essentiel aux pathologies cardiovasculaires (représentées principalement, mais pas exclusivement, par l'accident ischémique cérébral et ses conséquences tissulaires). Ces pathologies sont des enjeux majeurs de santé publique (une des premières causes de mortalité et de handicap en France). Spécifiquement, deux axes ont émergé : d'une part, la quantification de la perfusion et de la perméabilité capillaire, d'autre part et plus récemment, l'imagerie cellulaire, avec le suivi de l'inflammation post-ischémique.

## **1.2. Résumé des activités de recherche et des travaux effectués**

### ***Vers la quantification de la perfusion et de la perméabilité en IRM***

Mon premier travail a été la validation des outils méthodologiques permettant de mesurer la perfusion et la perméabilité avec les agents de contraste IRM. Au cours de la thèse, nous avons pu mettre en évidence des anomalies de perfusion dans les zones de jonction des territoires vasculaires chez les patients présentant une sténose serrée de la carotide interne, en traquant le premier passage d'un bolus de produit de contraste et en proposant une analyse quantitative des données. Ces travaux ont permis par la suite la quantification de la perfusion dans d'autres organes : poumon (travail de thèse de Magalie Viallon), myocarde (travail de thèse de Sabin Carme), prostate (en collaboration avec Olivier Rouvière), foie (travail de thèse de Siraj Abdallah)... Par ailleurs, lors du post-doctorat, nous avons utilisé un produit de contraste macromoléculaire pour quantifier la perméabilité capillaire dans un modèle de tumeur du sein xénogreffée chez le rat et suivre les effets d'un traitement anti-cancéreux.

### ***IRM de l'inflammation au décours de l'ischémie cérébrale***

A mon retour de post-doctorat, nous avons développé et validé une méthode IRM d'évaluation de la neuroinflammation post-ischémique chez la souris, en utilisant le marquage magnétique des macrophages à l'aide de nanoparticules d'oxyde de Fer superparamagnétiques injectées par voie intraveineuse. Cette méthode a été transférée à l'homme dans notre équipe (travaux du Pr Nighoghossian, travail de thèse de Tae-Hee Cho). Les difficultés d'interprétation des images aux stades aigu et subaigu nous ont amené à explorer spécifiquement cette fenêtre, et à démontrer que dans notre modèle chez la souris, une partie des nanoparticules d'oxyde de Fer n'était prise en charge par les macrophages que secondairement à une rupture de la barrière hématoencéphalique (travail de thèse de Virginie Desestret). Enfin, nous avons caractérisé les propriétés de relaxation de deux nanoparticules d'oxyde de Fer utilisées pour l'IRM cellulaire (Ferumoxtran-10 et NPMA) à haut champ, en fonction de leur concentration et de leur compartimentalisation (travail de thèse de Jean-Christophe Brisset).

### 1.3. Perspectives de recherche

#### *Evaluation de stratégies de neuroprotection à l'aide de l'IRM multimodale*

L'objet du projet est l'évaluation pré-clinique par IRM haute résolution, de trois stratégies innovantes de neuroprotection destinées au traitement de l'accident vasculaire cérébral (AVC), ce qui représente un axe de recherche nouveau pour notre équipe : (1) l'AceDoPC, une nouvelle forme d'Omega 3 permettant une meilleure accréation au cerveau (thèse de Tae-Hee Cho) ; (2) le post-conditionnement pharmacologique par la Cyclosporine A (post-doctorat de Fabien Chauveau) ; et (3) l'administration de macrophages activés M2 (anti-inflammatoires) (thèse d'Adrien Riou). L'ischémie sera caractérisée pendant l'occlusion et après la reperfusion par IRM haute résolution multimodale, afin d'appréhender les paramètres hémodynamiques associés au déficit de perfusion, l'œdème cytotoxique, l'œdème vasogénique, les microhémorragies et la rupture de la barrière hémato-encéphalique. Les données d'imagerie *in vivo* seront complétées par une évaluation comportementale et confrontées aux analyses immunohistochimiques *post-mortem*, réalisées en collaboration avec l'U842 Inserm « Neurooncologie et Neuroinflammation » (dirigée par le Pr Honnorat, équipe de Serge Nataf). Elles seront complétées par une évaluation comportementale. En IRM, notre action spécifique sera d'optimiser les séquences et les protocoles d'imagerie adaptés au stade aigu de l'ischémie, en particulier pour la définition de la zone à risque de nécrose et la quantification de la perfusion chez le rongeur.

#### *Développement de l'IRM cellulaire pour l'étude de la neuroinflammation*

Notre objectif est développer une méthodologie permettant d'évaluer en IRM les phénomènes d'inflammation qui interviennent lors de la cascade ischémique dans le cerveau. Le suivi en IRM de ces phénomènes inflammatoires permettrait d'évaluer de manière non invasive le bénéfice des actes thérapeutiques évoqués ci-dessus et de les moduler en fonction de l'évolution du processus. Dans cette optique, nous travaillons sur deux axes :

- La validation de séquences dédiées à la détection spécifiques des cellules marquées, produisant un contraste positif et/ou permettant la quantification du Fer (thèse de Jean-Christophe Brisset et d'Adrien Riou) ;
- L'évaluation de la biotransformation des nanoparticules de Fer suite à leur ingestion par les macrophages (thèse de Marilena Marinescu).

Ces études sont réalisées en collaboration avec l'U842 Inserm (équipe de Serge Nataf) et l'UMR CNRS 5586 du Laboratoire de physique de la matière condensée et nanostructures (LPMCN, équipe de Marie-Geneviève Blanchin).

## 2. Production scientifique

### 2.1. Synthèse

***Intitulé de la thèse : Imagerie par résonance magnétique de la perfusion cérébrale : modélisation de la cinétique d'un produit de contraste intravasculaire***

- Publications dans des revues avec comité de lecture : 27
- Communications dans des colloques avec comité de lecture : 28
- Conférences invitées : 5
- Lettre à l'éditeur : 1

#### ***Choix de 5 publications récentes représentatives***

1. Brisset JC, Desestret V, Devillard E, Marcellino S, Chauveau F, Lagarde F, Nataf S, Honnorat J, Nighoghossian N, Berthezene Y, **Wuart M**. Quantitative effects of cell internalization of two types of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles at 4.7T and 7T. *European Radiology*, 2010, 20(2):275-285.
2. Desestret V, Brisset JC, Devillard E, Moucharrafié S, Nataf S, Honnorat J, Nighoghossian N, Berthezene Y, **Wuart M**. Early stage investigations of USPIO-induced signal changes after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*, 40:1834-1841, 2009.
3. **Wuart M**, Davoust N, Pialat JB, Desestret V, Moucharrafié S, Cho TH, Mutin M, Langlois JB, Beuf O, Honnorat J, Nighoghossian N, Berthezene Y. MRI monitoring of neuro-inflammation in mouse focal ischemia. *Stroke*, 2007;38(1):131-137.
4. Nighoghossian N, **Wuart M**, S. Cakmak, Berthezene Y, Derex L, Cho TH, Nemoz C, Chappuis F, Tisserand JL, Pialat JB, Trouillas P, Froment JC, Hermier M. Inflammatory response after ischemic stroke: a USPIO-enhanced MRI study in patients. *Stroke*, 2007;38(2):303-307.
5. **Wuart M**, Curiel L, Gelet A, Lyonnet D, Chapelon JY, Rouviere O. Influence of perfusion on high-intensity focused ultrasound prostate ablation: a first-pass MRI study, *Magn Reson Med*, 58(1):119-127, 2007.

#### ***Renseignements complémentaires***

- **Encadrement d'étudiants :**
  - Post-doctorat (1)
  - Thèse de doctorat de 3<sup>ème</sup> cycle (6 en co-direction, dont 3 soutenues et 3 en cours)
  - DEA / Master 2 Recherche (7)
  - Maîtrise / Master 1 / Projet de fin d'étude d'école d'ingénieur (6)
- **Coordination de projets financés sur Appel d'offres :**
  - Imagerie du Petit Animal 2004 (IPA CEA-CNRS, 1 an)
  - Programme d'Action Intégrée Germaine de Staël 2005 (PAI Egide, 2 ans)
  - Bonus Qualité Recherche 2007 (BQR INSA, 1 an)
  - Technologie pour la Santé 2007 (Agence Nationale de la Recherche, 3 ans, en co-coordination avec le Pr Berthezene)
- **Coopération industrielle et valorisation :**
  - Partenariat avec le laboratoire Guerbet (contrat industriel)
  - Responsable du *work package* « Aide au diagnostic clinique et à la décision thérapeutique des accidents ischémiques cérébraux en urgence » du projet Plamaivic (Réseau National des Technologies pour la Santé RNTS 2002, 2 ans)
- **Représentante élue des chercheurs et enseignant-chercheurs au Conseil d'Unité de Creatis-LRMN (2007-2011)**

## 2.2. Publications dans des revues à comité de lecture

- 1) Brisset JC, Desestret V, Devillard E, Marcellino S, Chauveau F, Lagarde F, Nataf S, Honnorat J, Nighoghossian N, Berthezène Y, and **Wuart M**. Quantitative effects of cell internalization of two types of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles at 4.7T and 7T. *Eur Radiol*, 20(2):275-285, 2010.
- 2) Desestret V, Brisset JC, Devillard E, Moucharrafié S, Nataf S, Honnorat J, Nighoghossian N, Berthezène Y, and **Wuart M**. Early stage investigations of USPIO-induced signal changes after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*, 40:1834-1841, 2009.
- 3) Abdullah S, Pialat JB, **Wuart M**, Duboeuf F, Mabrut JF, Bancel B, Rode A, Ducerf C, Baulieux J, and Berthezène Y. Characterization of hepatocellular carcinoma and colorectal liver metastasis by means of perfusion MRI. *J Magn Reson Imaging*, 28(2):544-546, 2008.
- 4) Nighoghossian N, **Wuart M**, and Berthezène Y. Novel Applications of Magnetic Resonance Imaging to Image Tissue Inflammation after Stroke. *J Neuroimaging*, 28(2):390-395, 2008.
- 5) Cho TH, Nighoghossian N, **Wuart M**, Desestret V, Cakmak S, Berthezène Y, Derex L, Louis-Tisserand GL, Trouillas P, Honnorat J, Froment JC, and Hermier M. USPIO-enhanced MRI of neuroinflammation at the sub-acute stage of ischemic stroke, preliminary data. *Cerebrovasc Dis*, 24(6):544-546, 2007.
- 6) **Wuart M**, Curiel L, Gelet A, Lyonnet D, Chapelon JY, Rouviere O. Influence of perfusion on high-intensity focused ultrasound prostate ablation: a first-pass MRI study, *Magn Reson Med*, 58(1):119-127, 2007
- 7) Pialat JB, Cho TH, Beuf O, Moucharrafié S, Langlois JB, Nemoz C, Janier M, Berthezene Y, Nighoghossian N, Desvergne B, **Wuart M**. MRI monitoring of focal cerebral ischemia in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-deficient mice. *NMR in biomedicine*, 2007;20(3):335-342.
- 8) **Wuart M**, Davoust N, Pialat JB, Desestret V, Moucharrafié S, Cho TH, Mutin M, Langlois JB, Beuf O, Honnorat J, Nighoghossian N, Berthezene Y. MRI monitoring of neuro-inflammation in mouse focal ischemia. *Stroke*, 2007;38(1) :131-137.
- 9) Nighoghossian N, **Wuart M**, S. Cakmak, Berthezene Y, Derex L, Cho TH, Nemoz C, Chappuis F, Tisserand JL, Pialat JB, Trouillas P, Froment JC, Hermier M. Inflammatory response after ischemic stroke: a USPIO-enhanced MRI study in patients. *Stroke*, 2007;38(2):303-307.
- 10) **Wuart M**, Carme S, Mai W, Larsson H, Neyran B, Canet-Soulas E. In vivo quantification of regional myocardial blood flow: Validity of the fast exchange approximation for intravascular T1 contrast agent and long inversion time. *Magn Reson Med* 2006;56(2):340-347.
- 11) Carme S, Mai W, Mazzadi A, Janier M, Revel D, Magnin I, **Wuart M**, Neyran B, Canet Soulas E. Importance of parametric mapping and deconvolution in analyzing MR myocardial perfusion images. *Invest Radiol* 2006;41(4):374-383.
- 12) Hermier M, Nighoghossian N, Derex L, **Wuart M**, Nemoz C, Berthezene Y, Froment JC. Hypointense leptomeningeal vessels at T2\*-weighted MRI in acute ischemic stroke. *Neurology* 2005;65(4):652-653.
- 13) Pialat JB, **Wuart M**, Nighoghossian N, Adeleine P, Derex L, Hermier M, Froment JC, Berthezene Y. Evolution of Lesion Volume in Acute Stroke Treated by Intravenous t-PA. *J Magn Reson Imaging* 2005;22(1):23-8.
- 14) Derex L, Hermier M, Adeleine P, Pialat JB, **Wuart M**, Berthezene Y, Philippeau F, Honnorat J, Froment JC, Trouillas P, Nighoghossian N. Clinical and imaging predictors of intracerebral haemorrhage in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005 ;76:70-5.
- 15) **Wuart M**, Fournier L, Novikov V, Shames D, Fu YJ, Roberts T, Shalinsky D, Brasch R. Magnetic Resonance Imaging detects early changes in tumor microvascular permeability after treatment with the matrix metalloprotease inhibitor Prinomastat. *Technol Cancer Res Treat* 2004; 3: 377-82.

- 16) Derex L, Nighoghossian N, Hermier M, Pialat JB, **Wiart M**, Philippeau F, Adeleine P, Honnorat J, Froment JC, Berthezene Y, Trouillas P, Magnetic Resonance Imaging: Significance of Early Ischemic Changes on Computed Tomography. *Cerebrovasc Dis*. 2004;18:232-235.
- 17) Derex L, Hermier M, Adeleine P, Pialat JB, **Wiart M**, Berthezene Y, Froment JC, Trouillas P, Nighoghossian N. Influence of the site of arterial occlusion on multiple baseline hemodynamic MRI parameters and post-thrombolytic recanalization in acute stroke. *Neuroradiology* 2004;46:883-7.
- 18) Hermier M, Ibrahim A, **Wiart M**, Adeleine P, Cotton F, Dardel P, Derex L, Berthezene Y, Nighoghossian N, Froment JC. The delayed perfusion sign at MRI. *J Neuroradiol* 2003;30:172-9.
- 19) Hermier M, Nighoghossian N, Derex L, Adeleine P, **Wiart M**, Berthezene Y, Cotton F, Pialat JB, Dardel P, Honnorat J, Trouillas P, Froment JC. Hypointense transcerebral veins at T2\*-weighted MRI: a marker of hemorrhagic transformation risk in patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23:1362-70.
- 20) Berthezene Y, **Wiart M**, Corot C, Violas X, Canet E. CT pulmonary angiography and perfusion: an experimental study using blood pool and nonspecific contrast agent. *Acad Radiol* 2002 Aug;9 Suppl 2:S359-60.
- 21) **Wiart M**, Corot C, Berthezene Y, Violas X, Canet E. Ct pulmonary angiography with a macromolecular contrast medium: a comparative study versus iobitridol in rabbits. *Invest Radiol* 2001 Sep;36(9):547-553.
- 22) **Wiart M**, Rognin N, Baskurt A, Nighoghossian N, Froment JC, Berthezène Y. Perfusion-based segmentation of the human brain using similarity mapping. *Magn Reson Med* 2001;45(2):261-268.
- 23) Nighoghossian N, Hermier M, Berthezène Y, **Wiart M**, Derex L, Honnorat MD, Trouillas P, Turjman F, Froment JC. Early diagnosis of hemorrhagic transformation. Diffusion / perfusion weighted MRI versus CT-scans. *Cerebrovasc Dis* 2001;11(3):151-156.
- 24) **Wiart M**, Berthezène Y, Adeleine P, Baskurt A, Feugier P, Trouillas P, Froment JC, Nighoghossian N. Vasodilatory response of border zones to Acetazolamide before and after endarterectomy: an echo planar imaging-dynamic susceptibility contrast enhanced MRI study in patients with high-grade unilateral internal carotid artery stenosis. *Stroke* 2000;31(7):1561-1565.
- 25) Viallon M, Berthezène Y, Décorps M, **Wiart M**, Callot V, Bourgeois M, Humblot H, Briguet A, Crémillieux Y. Laser-polarized <sup>3</sup>He as a probe for dynamic regional measurements of lung perfusion and ventilation using magnetic resonance. *Magn Reson Med* 2000;44(1):1-4.
- 26) Berthezène Y, Croisille P, **Wiart M**, Howarth N, Houzard C, Faure O, Douek Ph, Amiel M, Revel D. Prospective comparaison of MR lung perfusion and lung scintigraphy. *J Magn Reson Imaging* 1999;9(1):61-68.
- 27) Nighoghossian N, Berthezène Y, Adeleine P, **Wiart M**, Damien J, Derex L, Itti R, Froment JC, Trouillas P. Effects of subcortical cerebrovascular lesions on cortical hemodynamic parameters assessed by perfusion Magnetic Resonance Imaging. *Cerebrovasc Dis* 1999;9:136-141.

### 2.3. Lettres à l'éditeur

**Wiart M**, Davoust N, Desestret V, Nighoghossian N, and Berthezène Y. Response to Letter by Bendszus, Kleinschnitz and Stoll: Iron-enhanced MRI in ischemic stroke: intravascular trapping vs cellular imaging. *Stroke*, 38:13, 2007.

### 2.4. Conférences invitées

- 1) **Wiart M**, Nighoghossian, N. Imaging inflammation in stroke using MRI. In *British Pharmaceutical Society*, Edinburgh, United Kingdom, 8-10 juillet 2009.
- 2) **Wiart M**. Iron oxide contrast agents. In *International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, Honolulu, Hawaii, USA, 18-24 avril 2009.
- 3) **Wiart M**, Cho TH, et Nighoghossian N. *Apport de l'IRM multimodale pour le diagnostic des AVC*. Journées Françaises de Radiologie (JFR), Paris (France), 24-27 octobre 2008.

- 4) **Wuart M.** *Magnetic resonance imaging (MRI) using cell labeling in small animal models.* 25th annual meeting of the European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology (ESMRMB), Valencia (Espagne), 2-4 octobre 2008.
- 5) **Wuart M.** *Magnetic resonance imaging (MRI) of inflammation in stroke.* 29th annual international conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (IEEE-EMBS), Lyon (France), 23-26 août 2007.

## 2.5. Communications dans des colloques avec comité de lecture

- 1) Brisset JC, Sigovan M, Chauveau F, Riou A, Nighoghossian N, Berthezène Y., and **Wuart M.** Relaxometry vs artifact volume for estimating the number of iron-labeled macrophages: in vivo testing in the mouse brain. In *International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, Stockholm, Sweden, 1-7 may 2010.
- 2) Riou A, Chauveau F, Cho TH, Marinescu M, Nataf S, Berthezène Y., Nighoghossian N, and **Wuart M.** MRI study of intra-arterial bone marrow-derived macrophage administration after acute focal ischemic stroke in rats. In *5th European Molecular Imaging Meeting*, Warsaw, Poland, 26-29 may 2010.
- 3) Chauveau F, Cho TH, Riou A, Aguetaz P, Picq M, Lagarde M, Berthezène Y, Nighoghossian N, **Wuart M.** MRI evaluation of the neuroprotective effect of docosahexanoic acid after stroke. 26nd Annual Meeting of the European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology – Antalya (Turkey), 1-3 octobre 2009.
- 4) Chauveau F, Cho TH, Riou A, Aguetaz P, Picq M, Lagarde M, Berthezène Y, Nighoghossian N, **Wuart M.** MRI evaluation of the neuroprotective effect of docosahexanoic acid after stroke. World Molecular Imaging Congress – Montreal, Canada, 23-26 septembre 2009.
- 5) Brisset JC, Desestret V, Marcellino S, Devillard E, Chauveau F, F. Lagarde F, Nataf S, Nighoghossian N, Berthezene Y, **Wuart M.** In vivo assessment of the number of iron-labeled cells using T2 quantification. 17<sup>th</sup> annual meeting of the International Society for Magnetic Resonance in Medecine – Honolulu (Hawaii, USA), 18-24 avril 2009.
- 6) Desestret V, Brisset JC, Devillard E, Moucharraffie S, Nataf S, Honnorat J, Nighoghossian N, Berthezene Y, **Wuart M.** Early stage investigations of USPIO-induced signal changes after focal cerebral ischemia in mice. 16<sup>th</sup> annual meeting of the International Society for Magnetic Resonance in Medecine – Toronto (Canada), 3-9 mai 2008.
- 7) Brisset JC, Desestret V, Marcellino S, Devillard E, Lagarde F, Nataf S, Nighoghossian N, Berthezene Y, **Wuart M.** T1 and T2 quantification of free USPIO and USPIO-labeled macrophages at 4.7T and 7T. 16<sup>th</sup> annual meeting of the International Society for Magnetic Resonance in Medecine – Toronto (Canada), 3-9 mai 2008
- 8) Desestret V, Brisset JC, Devillard E, Moucharraffie S, Nataf S, Honnorat J, Nighoghossian N, Berthezene Y, **Wuart M.** Interprétation des changements précoces de signal en IRM après injection d'USPIO dans un modèle murin d'ischémie cérébrale. 12<sup>ème</sup> congrès du GRAMM, Lyon (France), 26-28 mars 2008.
- 9) Brisset JC, Desestret V, Devillard E, Moucharraffie S, Nataf S, Honnorat J, Nighoghossian N, Berthezene Y, **Wuart M.** Quantification T1 et T2 des USPIO libres et macrophages marqués en IRM à 4,7T et 7T. 12<sup>ème</sup> congrès du GRAMM, Lyon (France), 26-28 mars 2008.
- 10) **Wuart M,** Davoust N, Pialat JB, Berthezene Y, Nighoghossian N. Magnetic resonance imaging (MRI) of inflammation in stroke. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2007;1:4316-9
- 11) Davoust N, Pialat JB, Moucharraffie S, Cho TH, Mutin M, Langlois JB, Beuf O, Honnorat J, Nighoghossian N, Berthezene Y, **Wuart M.** MR-tracking of in vivo magnetically labeled macrophages detects remote inflammation in focal ischemia of the mouse brain. *Journal of neuroimmunology* 2006 ;178 :250.
- 12) **Wuart M,** Curiel L, Gelet A, Lyonnet D, Chapelon JY, Rouviere O. Influence of prostate perfusion on high-intensity focused ultrasound cancer ablation: a first-pass MRI study. 14<sup>th</sup> annual meeting of the International Society for Magnetic Resonance in Medecine – Seattle (USA), May 6-12, 2006.
- 13) Pialat JB, **Wuart M,** Cho TH, Moucharraffie S, Langlois JB, Beuf O, Nighoghossian N, Berthezene Y. USPIO-enhanced MRI at 7T in a mouse model of focal cerebral ischemia. 14<sup>th</sup> annual meeting of the International Society for Magnetic Resonance in Medecine – Seattle (Washington, USA), May 6-12, 2006.
- 14) **Wuart M,** Cho TH, Pialat JB, Moucharraffie S, Langlois JB, Beuf O, Nighoghossian N, Berthezene Y. Magnetic resonance imaging of cerebral ischemia with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in mice. *Contrast Med. Mol. Imaging* (2006);1:55.
- 15) **Wuart M,** Pialat JB, Cho TH, Beuf O, Langlois JB, Joye E, Desvergne B, Nighoghossian N, Berthezene Y. Neuroprotective effects of PPAR-alpha demonstrated in vivo by high-resolution MRI in ischemic stroke. 22nd

- Annual Meeting of the European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology, Sept 15-18 – Basel (Schweizerland), Sept 15-18, 2005(331).
- 16) Neyran B, Carme S, **Wuart M**, Robini M, and Canet-Soulas E. Mapping myocardial perfusion with an intravascular MR contrast agent, a robust estimation by a spatially constrained approach. Computers in Cardiology, Lyon (France), Sept 25-28, 2005.
  - 17) **Wuart M**, Carme S, Larsson H, Neyran B, Canet–Soulas E. Effects of water exchange on MR quantification of regional myocardial blood flow using an intravascular T1 contrast agent. 12<sup>th</sup> annual meeting of the International Society for Magnetic Resonance in Medecine – Kyoto (Japan), May 15-21, 2004.
  - 18) **Wuart M**, Pialat JB, Bagnis S, Nighoghossian N, Berthezène Y. Cerebral blood flow quantification using dynamic contrast–enhanced MRI: simple, practical way to assess an arterial input function. International Symposium on Modelling of Blood Flows – Lausanne (Switzerland), October 1-3, 2003
  - 19) Hermier M, Nighoghossian N, Adeleine P, Derex L, **Wuart M**, Berthezène Y, Pialat JB, Cotton F, Trouillas P, Froment JC. Les veines transcérébrales hypointenses en T2\* : un marqueur du risque de transformation hémorragique des accidents ischémiques aigus traités thrombolyse intraveineuse. Journées Françaises de Radiologie, Paris (France), October 25-29, 2003.
  - 20) **Wuart M**, Fournier L, Novikov V, Shames D, Fu YJ, Roberts T, Shalinsky D, Brasch R. Magnetic resonance imaging detects early changes in tumor microvascular permeability after treatment with the matrix metalloprotease inhibitor Prinomastat. 10<sup>th</sup> annual meeting of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine – Honolulu (USA), May 18-27, 2002.
  - 21) Li KL, Novikov V, Spilker M, Fournier L, **Wuart M**, Fu YJ, Roberts T, Brasch R. Pixel-by-pixel kinetic analysis of dynamic macromolecular contrast medium-enhanced MRI: noise reduction using a flexible gray level model. 10<sup>th</sup> annual meeting of the International Society for Magnetic Resonance in Medecine – Honolulu (USA) May 18-27, 2002.
  - 22) Berthezène Y, **Wuart M**, Corot C, Violas X, Canet E. CT pulmonary angiography and perfusion. An experimental study using blood pool and non specific contrast agent. Contrast Media Research 2001 – Capri (Italy) October 14-18, 2001.
  - 23) **Wuart M**, Berthezène Y, Adeleine P, Baskurt A, Feugier P, Trouillas P, Froment JC, Nighoghossian N. Cerebral vasodilatory response assessment before and after carotid endarterectomy. 8<sup>th</sup> annual meeting of the International Society for Magnetic Resonance in Medecine – Denver (USA) April 3-7, 2000.
  - 24) Viallon M, Berthezène Y, Décorps M, **Wuart M**, Callot V, Bourgeois M, Humblot H, Briguet A, Crémillieux Y. Laser-polarized <sup>3</sup>He as a probe for dynamic regional measurements of lung perfusion and ventilation using magnetic resonance. 8<sup>th</sup> annual meeting of the International Society for Magnetic Resonance in Medecine – Denver (USA) april 3-7, 2000.
  - 25) Nighoghossian N, **Wuart M**, Berthezène Y, Adeleine P, Derex X, Honnorat J, Froment JC, Trouillas P. Borderzones vasodilatory response before and after endarterectomy. 9<sup>th</sup> European stroke conference – Vienna (Autriche), March 2000.
  - 26) **Wuart M**, Rognin N, Baskurt A, Nighoghossian N, Froment JC, Berthezène Y. Cartographies de similarité : une méthode simple pour cartographier la perfusion cérébrale Journées Françaises de Radiologie – Paris, October 25-29, 1999 (1215).
  - 27) **Wuart M**, Rognin N, Baskurt A, Nighoghossian N, Froment JC, Berthezène Y. Similarity mapping : applications in dynamic MRI of the human brain. 15<sup>th</sup> annual meeting of the European Society for Magnetic Resonance in Medecine and Biology – Geneva (Schweizerland), September 17-20, 1998 (169).
  - 28) Berthezène Y, Croisille P, **Wuart M**, Howarth N, Houzard P, Douek P, Amiel M, Revel D. Prospective comparison of MR lung perfusion and scintigraphy. 15th annual meeting of the European Society for Magnetic Resonance in Medecine and Biology – Geneva (Switzerland), September 17-20, 1998.

### 3. Autres activités

#### 3.1. Activités d'enseignement

Années	Etablissement	Discipline	Nombre d'heures /an		Cycle	Année
			TD	CM		
1998-1999	UCBL	Maths	20		1	2
1998-2000	IUT	Maths	96		1	1, 2, spé
2002-2005	UCBL	Biophysique	64		1	1
2005-2009	UCBL	Imagerie	4	3	3	5 (M2R)
2007-2009	INSA Lyon	Imagerie		2	2	5

M2R- Master 2 Recherche

#### 3.2. Responsabilités scientifiques et administratives

##### *Travaux d'encadrement et de co-encadrement*

- **Thèse de doctorat**

- *Jean-Baptiste Pialat* :

Directeur de thèse : Pr Yves Berthezène

Titre de la thèse : Evaluation des volumes lésionnels en IRM dans l'ischémie cérébrale clinique et expérimentale. Rôle neuroprotecteur des récepteurs PPARs et marquage de la réponse inflammatoire post-ischémique à l'aide des USPIO sur un modèle murin

Ecole doctorale : EDISS (Ingénierie Médicale et Biologique, Biologie Humaine)

Financement : HCL

Date de soutenance : 23 juin 2008

Jury : Chantal Rémy (rapporteur), Vincent Dousset (rapporteur), Claire Corot, Yves Berthezène (directeur), Norbert Nighoghossian, Marlène Wiart.

- *Jean-Christophe Brisset* :

Directeur de thèse : Pr Yves Berthezène

Titre de la thèse : IRM de macrophages marqués par des nanoparticules d'oxydes de fer : application à la mesure de la neuroinflammation post-ischémique

Ecole doctorale : EDISS (Ingénierie Médicale et Biologique, Biologie Humaine)

Financement : Allocation doctorale de recherche MNRT

Date de soutenance : 18 novembre 2009

Jury : Emmanuel Barbier (rapporteur), Olivier Clément (rapporteur), Eric Lancelot, Florence Gazeau, Yves Berthezène (directeur), Emmanuelle Canet-Soulas, Marlène Wiart.

- *Virginie Desestret* :

Directeur de thèse : Pr Norbert Nighoghossian

Titre de la thèse : Dynamique et rôle de la réaction inflammatoire au cours de l'ischémie cérébrale

Ecole doctorale : EDISS (Neurosciences)

Financement : Projet Européen I-Know et HCL

Date de soutenance : 24 novembre 2009

Jury : Klaus Petry (rapporteur), Romain Gherardi (rapporteur), Serge Nataf (co-directeur), Norbert Nighoghossian (co-directeur), Alain Vighetto, Chantal Rémy.

- *Tae-Hee Cho* :

Directeur de thèse : Pr Norbert Nighoghossian

Titre de la thèse : Etude de l'effet neuroprotecteur d'une nouvelle forme de l'acide docosahexaénoïque (AceDoPC) dans un modèle murin d'ischémie cérébrale focale

Ecole doctorale : EDISS (Ingénierie Médicale et Biologique, Biologie Humaine)

Financement : HCL

Date de soutenance : prévue en janvier 2011

- *Marilena Marinescu* :

Directeur de thèse : Pr Yves Berthezène

Titre de la thèse : Caractérisation structurale des nanoparticules de Fer pour le suivi cellulaire en IRM

Ecole doctorale : EDISS (Ingénierie Biomédicale et Pharmaceutique, option Imagerie)

Financement : Allocation doctorale de recherche MNRT

Date de soutenance : prévue en septembre 2011

- *Adrien Riou* :

Directeur de thèse : Pr Yves Berthezène

Titre de la thèse : IRM cellulaire pour l'étude de l'inflammation cérébrale et l'évaluation de stratégies de neuroprotection chez le petit animal

Ecole doctorale : EDISS (Ingénierie Biomédicale et Pharmaceutique, option Imagerie)

Financement : Cluster 11

Date de soutenance : prévue en septembre 2011

#### • **DEA et Master 2 Recherche (M2R)**

- *Jean-Baptiste Pialat* (2004, voir thèse ci-dessus)
- *Tae-Hee Cho* (2005, voir thèse ci-dessus)
- *Jean-Christophe Brisset* (2006, voir thèse ci-dessus)
- *Juan-Pablo Santamaria* :

Encadrant : Bruno Neyran, MCU

Titre du mémoire : Deconvolution robustness for local perfusion parameters estimation in Magnetic resonance imaging

Ecole doctorale : EEA (Instrumentation, Systèmes, Signal et Images)

Date de soutenance : 2004

- *Samir Moucharrafié* :

Encadrant : Pr Norbert Nighoghossian

Titre du mémoire : Intérêts et limites des modèles d'ischémie cérébrale expérimentale chez la souris (électrocoagulation versus ischémie permanente par la méthode du filament)

Ecole doctorale : EDISS (Neurosciences)

Date de soutenance : 2007

- *Pierre Aguetaz* :

Encadrant : Pr Norbert Nighoghossian

Titre du mémoire : Evaluation du post conditionnement ischémique et imagerie préclinique du post conditionnement pharmacologique à la cyclosporine A sur un modèle murin d'ischémie cérébrale focale réversible

Ecole doctorale : EDISS (Ingénierie Biomédicale et Pharmaceutique, option Imagerie)

Date de soutenance : 2009

- *Thomas Ritzenthaler* :

Encadrant : Pr Norbert Nighoghossian

Titre du mémoire : Etude en IRM multimodale des paramètres hémodynamiques au sein des zones de progression lésionnelle lors d'un AIC

Ecole doctorale : EDISS (Ingénierie Biomédicale et Pharmaceutique, option Imagerie)

Date de soutenance : 2009

• **Maîtrise et Master 1 (M1)**

- *Stéphane Bagnis*

Diplôme : Maîtrise Scientifique et Technique (MST ATIB, « Acquisition et traitement de l'information en biologie »)

Titre du mémoire : Sélection automatique d'entrées artérielles pour la quantification de la perfusion en IRM

Date de soutenance : 2003

- *François Moreau*

Diplôme : Ingénieur (Ecole Centrale)

Titre du mémoire : Développement d'une interface pour l'évaluation de la perfusion prostatique par IRM

Date de soutenance : 2003

- *Timothée Jacquesson*

Diplôme : Maîtrise de science biologique et médicale (MSBM, certificat « Informatique médicale et technologies de communication »)

Titre du mémoire : Développement du site web de l'équipe Ischémie Cérébrale de Creatis

Date de soutenance : 2004

- *Olivier Querbes*

Diplôme : Ingénieur (Ecole Centrale)

Titre du mémoire : Développements informatiques pour la quantification de la perfusion de la prostate en IRM pour l'optimisation du traitement du cancer par ultrasons

Date de soutenance : 2004

- *Thomas Bochaton*

Diplôme : Maîtrise de science biologique et médicale (MSBM, certificat « Traceurs, explorations fonctionnelles et métaboliques »)

Titre du mémoire : Reproductibilité intra- et inter-souche du modèle d'occlusion permanente par électrocoagulation : comparaison entre les souris Swiss et les souris au background mixte C57Bl6/SV129

Date de soutenance : 2005

- *Solène Charpy*

Diplôme : Ingénieur (Chimie, Physique, Electronique : CPE)

Titre du mémoire : Déconvolution par *Singular Value Decomposition* pour la quantification de la perfusion cérébrale chez le rat

Date de soutenance : 2009

### ***Participation à des projets financés sur Appel d'offres :***

#### **En tant que coordinateur :**

- Imagerie du Petit Animal 2004 (IPA CEA-CNRS) : *Imagerie par résonance magnétique haute résolution de la neuroinflammation. Etude du rôle neuroprotecteur du gène PPAR chez la souris transgénique*, durée : 1 an, montant : 15 kEuros pour 2 partenaires (Creatis UMR CNRS 5515 et Centre Intégréatif de Génomique de l'Université de Lausanne, Pr B Desvergne) ;
- Programme d'Action Intégrée Germaine de Staël 2004 (PAI Egide, financement de missions entre la France et la Suisse) : *Imagerie par résonance magnétique moléculaire de l'inflammation : rôle neuroprotecteur du gène PPAR chez la souris transgénique*, durée : 1 an renouvelé 1 an, montant : 2250 Euros par année par partenaire (Creatis UMR CNRS 5515 et Centre Intégréatif de Génomique de l'Université de Lausanne, Pr B Desvergne) ;
- Bonus Qualité Recherche 2007 (BQR INSA, 1 an, 15 kEuros pour 2 partenaires) : *Etude de l'effet neuroprotecteur d'une nouvelle forme de l'acide docosahexaénoïque (AceDoPC) dans un modèle murin d'ischémie cérébrale focale*, durée : 1 an, montant : 15 kEuros pour 2 partenaires (Creatis UMR CNRS 5515 et U870 Inserm, Pr M Lagarde) ;
- Technologie pour la Santé 2007 (Agence Nationale de la Recherche : ANR TecSan, en coordination avec Pr Yves Berthezène) : *INFLAMMATION in brain and vessels with iron nanoparticles and cell trafficking: a multi-scale approach of tissue microenvironment, iron nanostructure and iron biotransformations*, durée : 3 ans, montant : 849 kEuros pour 10 partenaires dont 2 partenaires industriels ;

#### **En tant que co-investigateur :**

- Projets Scientifiques Structurants 2006 (Institut Fédératif des Neurosciences de Lyon IFNL) : *Etude dynamique IRM et immunohistochimique de la réponse inflammatoire au cours de l'ischémie cérébrale*, durée : 1 an, montant : 15 kEuros pour 2 partenaires (Creatis UMR CNRS 5515 et U842 Inserm, Pr J Honnorat), coordinateurs : Pr N Nighoghossian et J Honnorat ;
- Cluster 11 Handicap, Vieillesse, Neurosciences (Région Rhône-Alpes, thème 7 transversal : *Imagerie, projets méthodologiques, technologies de la santé, plates-formes et centres de ressources*, piloté par Jean-François Le Bas et Isabelle Magnin) : *Etude physiopathologique de l'ischémie cérébrale chez l'homme et l'animal* (action 7114), durée : 1 an, montant : 30 kEuros, coordinateurs : Pr N Nighoghossian et Pr Yves Berthezène ;
- Fédération pour la Recherche sur le Cerveau 2007 (FRC) : *Imagerie de la dynamique inflammatoire au cours des affections neurologiques*, durée : 2 ans, montant : 30 kEuros pour 2 partenaires (Creatis UMR CNRS 5515 et U842 Inserm), coordinateurs : Pr N Nighoghossian et J Honnorat ;
- Programme National de Recherche en Alimentation et nutrition humaine 2007 (ANR PNRA) : *NEUROPROTECT - Métabolisme chez l'Homme d'un phospholipide d'origine marine structuré et action neuronale*, durée : 4 ans, montant : 550 kEuros pour 5 partenaires, coordinateur : Pr M Lagarde.

***Représentante élue des chercheurs et enseignant-chercheurs au Conseil d'Unité de Creatis-LRMN (2007-2011)***

***Critique d'articles pour les revues suivantes (revues internationales à comité de lecture) : Investigative Radiology, Journal of Magnetic Resonance Imaging***

### **3.3. Coopération industrielle et valorisation**

#### ***Coopération industrielle***

Mise en place d'un partenariat avec le laboratoire pharmaceutique de produits de contraste Guerbet (directeur scientifique : Claire Corot) depuis septembre 2003, permettant l'obtention des nanoparticules de Fer nécessaires à la réalisation de nos projets (Sinerem®, P904) ; Contrat de recherche « Microangiographie cérébrale chez la souris avec ischémie cérébrale et TOF » en 2008.

#### ***Valorisation***

Responsabilité du work package « Aide au diagnostic clinique et à la décision thérapeutique des accidents ischémiques cérébraux en urgence », dans le cadre du projet RNTS Plamaivic (PLateforme d'Analyse Multimodale Avancée d'Images à Visée Clinique, 2002-2005), dont le coordinateur était le Professeur Ryvlin (Hôpital neurologique, Lyon).

Les objectifs généraux du projet Plamaivic étaient de développer une plateforme d'analyse avancée d'images multimodales adaptée d'un point de vue technique et économique aux impératifs de la pratique clinique, dévolu à l'exploration des pathologies épileptiques et neuro-vasculaires. Il s'agissait d'un projet collaboratif sur 24 mois, réunissant autour de la société Medasys en charge de l'intégration de l'ensemble des modules constituant le logiciel et de sa commercialisation, le CHU de Lyon, partenaire principal du projet responsable de la coordination des travaux, et 7 laboratoires de recherche publics possédant une expertise en traitement d'images (UMR CNRS 7004, UMR CNRS 7005, UPRES EA 3192, UMR CNRS 5515, CERMEP, EA 1880, LU 1931). Ces derniers ont apporté de manière concertée, des modules spécifiques d'analyse d'image relevant de leurs compétences respectives.

L'innovation principale du projet reposait sur la conjonction dans un même logiciel, de fonctionnalités dédiées à la gestion hospitalière des données d'imagerie médicale, et d'algorithmes aujourd'hui réservés au domaine de la recherche clinique. L'objectif du sous-projet que j'ai mené à bien était de développer un module d'analyse des images IRM de perfusion / diffusion permettant la détermination de la zone à risque de nécrose dans des délais compatibles avec les conditions d'urgences qui caractérise la pathologie vasculaire cérébrale. J'ai encadré pendant les 2 années du projet un ingénieur, M. Pierre Seillé (ingénieur INSA, promotion 2002), permettant le transfert des algorithmes validés dans le cadre de mes travaux de recherche vers le logiciel multi-modalité de revue et d'interprétation des images de la société Medasys : DxMM. Un accord de consortium a été conclu entre tous les partenaires. Cet accord prévoit le versement de royalties au laboratoire Creatis (ainsi qu'à chaque laboratoire partenaire) lors de la vente du logiciel DxMM avec la plateforme Plamaivic.

### 3.4. Information scientifique, technique et vulgarisation

- Participation à l'accueil du public et présentation du laboratoire Creatis-LRMN (UMR CNRS 5220 U630 Inserm) dans le cadre de la Fête de la science ;
- Co-organisation d'une journée de découverte de la neurologie, de la neuro-radiologie et de la recherche en imagerie cérébrale, comprenant une visite de l'IRM, à destination des enfants du quartier de l'hôpital neurologique (12 enfants de 8 à 12 ans), dans le cadre de la Fête de la science 2004 (avec le concours des Professeurs Ryvlin, Nighoghossian, Revol et Hermier), à l'initiative de la bibliothèque des Genêts (annexe de la bibliothèque municipale de Bron), située à proximité de l'hôpital ;
- Accueil de collégiens de 3<sup>ème</sup> pour leur stage de découverte des métiers : Jérôme Temporel en avril 2005 et Faustine Pillat en décembre 2008.

### 3.5. Activités internationales

- **Stage post-doctoral** (15 mois : janvier 2001-mars 2002 ; Pr RC Brasch, Department of radiology, UCSF, San Francisco, Etats-Unis) : bourses de l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC, France) et de la Philippe Foundation (New-York)
- **Missions de recherche dans le cadre d'une collaboration internationale :**
  - 4 missions à l'université de Lausanne en 2004-2005 (22-23 juillet 2004, 25 novembre 2004, 8 mars 2005, 12-13 septembre 2005 ; Pr B Desvergne, Centre Intégréatif de Génomique, UNIL, Lausanne, Suisse) : financement PAI Germaine de Staël ;
  - Mission à l'université polytechnique de Varsovie (2-9 avril 2005 ; Pr Ewa Piatkowska Janko, Institute of Radioelectronics, Warsaw University of Technology, Varsovie, Pologne) : financement PAI Polonium ;
- **Participation à des manifestations scientifiques :**
  - Congrès annuel de l'*International Society for Magnetic Resonance in Medicine* (ISMRM) :
    - 3-7 Avril 2000 (Denver, Colorado, Etats-Unis)
    - 18-27 mai 2002 (Honolulu, Hawaï, Etats-Unis)
    - 15-21 mai 2004 (Kyoto, Japon)
    - 6-12 mai 2006 (Seattle, Washington, Etats-Unis)
    - 3-9 mai 2008 (Toronto, Ontario, Canada)
    - 18-24 avril 2009 (Honolulu, Hawaii, Etats-Unis) ;
  - Congrès annuel de l'*European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology* (ESMRMB) :
    - 17-20 septembre 1998 (Genève, Suisse)
    - 15-18 septembre 2005 (Bâle, Suisse)
    - 2-4 octobre 2008 (Valence, Espagne) ;
  - Congrès annuel de la *British Pharmaceutical Society* (BPS) :
    - 8-10 juillet 2009 (Edinburgh, Royaume Uni).
  - 1<sup>er</sup> *Biomedical Imaging Workshop* Franco-Singapourien :
    - 12-13 octobre 2006 (Singapour, Singapour) ;
  - Symposium international *Contrast Media Research* (CMR) :
    - 11-16 octobre 2005 (Evian, France) ;
  - Symposium international *Modelling of Blood Flows* (MBF) :
    - 1-3 octobre 2003 (Lausanne, Suisse).



## **Chapitre 2. Mémoire de recherche**

## Introduction

Ces quatorze années de recherche ont été consacrées à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et aux agents de contraste dans leurs applications liées essentiellement à la pathologie neurovasculaire. L'évaluation de l'apport des produits de contraste pour l'exploration fonctionnelle en IRM représente le dénominateur commun de mes travaux. L'analyse des caractéristiques des agents de contraste RM constitue donc la première partie de ce chapitre. La grande variété de ces agents implique une description limitée aux produits utilisés dans les travaux rapportés dans ce mémoire.

La seconde partie est une synthèse de mes travaux relatifs à l'évaluation des produits de contraste pour l'étude de la microcirculation et de la perméabilité capillaire. L'évaluation non invasive de la perfusion cérébrale en IRM en vue de son application à l'accident vasculaire cérébral (AVC) constitue l'un des axes de recherche de l'équipe « Ischémie cérébrale » du laboratoire Creatis-LRMN, dont les responsables sont les Pr Norbert Nighoghossian et Yves Berthezène. Mon activité dans ce domaine s'est focalisée sur le traitement des séries d'images dynamiques et la modélisation des données afin d'en extraire des indicateurs de la microcirculation reflétant au plus près les paramètres physiologiques. Au-delà de l'application première dans le cerveau, cette thématique s'est déclinée autour de différents organes et pathologies, chez l'homme et chez l'animal : les tumeurs du sein dans le laboratoire du Pr Robert C Brasch à UCSF (San Francisco, Etats-Unis), le cancer de la prostate en collaboration avec le Pr Olivier Rouvière du service de radiologie urinaire et vasculaire de l'hôpital Edouard Herriot à Lyon, et enfin, au sein du laboratoire Creatis-LRMN, l'embolie pulmonaire et le cancer du foie avec le Pr Yves Berthezène, et l'ischémie myocardique avec le Pr Emmanuelle Canet-Soulas.

La troisième partie présente nos travaux plus récents portant sur l'utilisation des nanoparticules de Fer pour l'étude de la neuroinflammation post-ischémique en IRM. Les aspects physiopathologiques de l'AVC (développés en partie dans la thèse de doctorat) ne seront que brièvement exposés pour nous concentrer sur les développements que nous avons réalisés. Ces derniers travaux ont été réalisés sur la plateforme d'imagerie du petit animal Animage du Cermep à Lyon. J'insisterais ici sur la mise au point et la validation des protocoles d'imagerie haute résolution ( $<100\ \mu\text{m}$ ) chez la souris présentant une ischémie cérébrale. J'aborderais enfin les aspects translationnels de la technique IRM réhaussée avec les nanoparticules d'oxyde de Fer. Les perspectives de ces travaux sont l'évaluation IRM d'un concept de thérapie cellulaire basée sur la modulation de la réponse inflammatoire.

# 1. Les produits de contraste en IRM

Les agents de contraste sont utilisés en IRM comme dans d'autres modalités d'imagerie dans le but d'augmenter le rendement diagnostique de l'examen. A la différence des produits iodés en imagerie conventionnelle par rayons X, le mécanisme d'action des agents de contraste IRM est indirect. En effet, ils agissent en modifiant l'environnement magnétique des protons, par deux mécanismes : une accélération du retour à l'équilibre des protons (effets de relaxation T1 ou T2) et une modification de l'environnement magnétique local (effet de susceptibilité magnétique ou T2\*).

## 1.1. Rappels sur le magnétisme

### 1.1.1. Origine du magnétisme

Le magnétisme des atomes résulte du mouvement des électrons qui induisent un moment magnétique dit orbital, associé à leur révolution autour du noyau, ainsi qu'un moment magnétique dit de spin, associé à leur rotation sur eux-mêmes. Le moment magnétique total est la combinaison vectorielle des moments orbitaux et de spin. L'ordre de grandeur du moment magnétique atomique est le magnéton de Bohr :

$$\mu_B = \frac{e \cdot h}{2 \cdot \pi \cdot 2 \cdot m} = 9,274 \cdot 10^{24} \text{ A} \cdot \text{m}^2 \quad [1]$$

$e$  : charge de l'électron ( $1,6 \cdot 10^{-19}$  C)

$h$  : constante de Planck ( $6,63 \cdot 10^{-34}$  J.s)

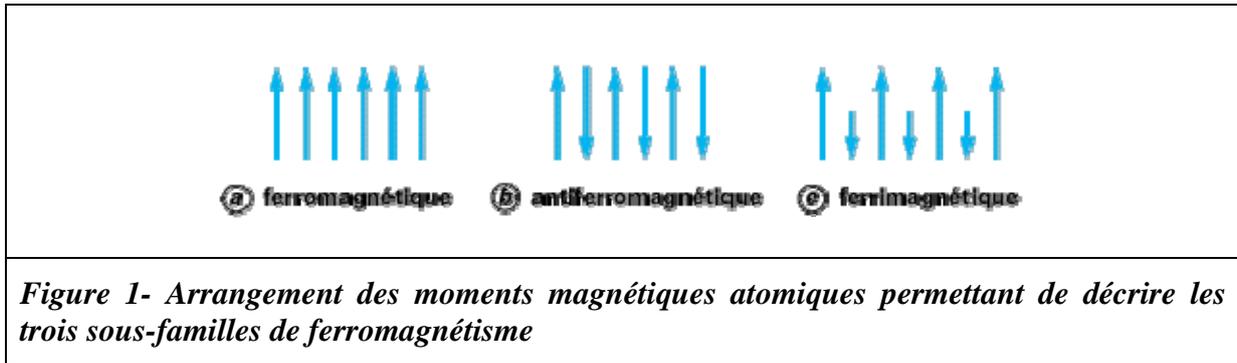
$m$  : masse de l'électron ( $9,11 \cdot 10^{-31}$  kg)

Dans la matière condensée, les moments magnétiques atomiques sont couplés entre eux par des interactions d'origine électrostatique, souvent importantes, qui résultent du recouvrement des orbitales et que l'on appelle **interactions d'échange**. Elles tendent à imposer aux différents moments magnétiques des directions fixes les unes par rapport aux autres, c'est-à-dire à créer un ordre magnétique. Outre ces interactions, il existe un couplage entre le moment magnétique orbital de chaque atome et le champ cristallin, c'est-à-dire le champ électrique créé par les charges des atomes voisins qui sont ionisés. Ce couplage favorise l'orientation des moments dans certaines directions cristallographiques. Il est à l'origine de l'**anisotropie magnétocristalline** qui tend à orienter les moments magnétiques atomiques suivant certaines directions cristallographiques privilégiées : les directions d'aimantation facile. La constante d'anisotropie magnétocristalline  $K$  représente en première approximation l'énergie par unité de volume nécessaire pour orienter l'aimantation d'une direction privilégiée vers une direction difficile.

À toute température, l'ordre des moments magnétiques est déterminé par la compétition entre les **interactions d'échange** qui le favorisent, et l'**agitation thermique** qui tend à le détruire. Les substances **diamagnétiques** ont un moment résultant nul. Au-dessus de la température d'ordre (températures de Curie, de Néel), les corps sont **paramagnétiques** : il n'y a pas d'interaction d'échange, les spins sont orientés au hasard ; la susceptibilité magnétique est faible. Parmi les éléments et composés présentant une **aimantation spontanée** due à la résultante des moments magnétiques, on distingue les substances (Figure 1) :

- **ferromagnétiques** : interactions d'échange positives, les spins sont parallèles ; ce sont certains métaux de transition de la couche  $3d$  (Fe, Co, Ni) et certaines terres rares de la couche  $4f$  (Gd, Tb, Dy). Ils peuvent acquérir une susceptibilité et une aimantation importantes, qui diminuent lorsque la température croît et s'annulent à la température de Curie ;

- **antiferromagnétiques** : interactions d'échange négatives entre moments égaux voisins appartenant à deux sous-réseaux, conduisant à un alignement antiparallèle à résultante nulle. La susceptibilité magnétique est très faible. L'alignement disparaît à la température de Néel ;
- **ferrimagnétiques** : interactions d'échange négatives créant un alignement antiparallèle des moments magnétiques ; mais les deux ou trois sous-réseaux n'étant pas équivalents, la substance possède une aimantation spontanée égale à la somme algébrique des aimantations des sous-réseaux. À ce type appartiennent les ferrites, tels que la magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) et la maghémite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). L'alignement disparaît au point de Curie ferrimagnétique.



### 1.1.2. Magnétisme des métaux 3d et des métaux 4f

Les atomes qui possèdent un moment magnétique sont ceux qui conservent des couches électroniques internes incomplètes. Ils forment les séries de transition, dont les deux plus importantes sont les couches 3d (groupe du fer) et 4f (groupe des terres rares).

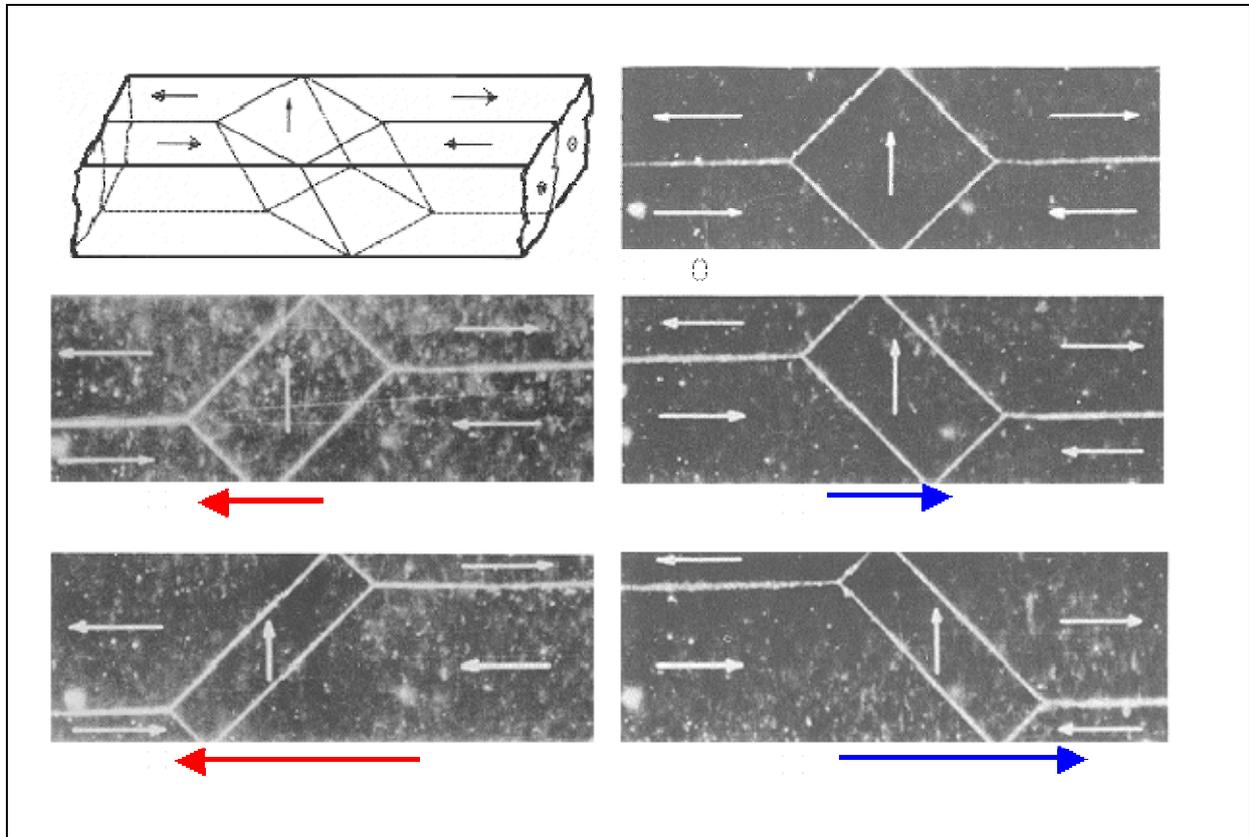
Dans les **métaux 3d** (notamment Fe, Co, Ni), la couche 3d est une couche externe. Les interactions d'échange s'effectuent directement entre les électrons 3d porteurs de moments magnétiques, qui sont relativement délocalisés. Ces interactions sont fortes, de l'ordre de 10 eV, ce qui conduit à des températures d'ordre élevées (température de Curie du Fer : 770°C). Le couplage spin-orbite étant d'un ordre inférieur aux effets du champ cristallin, l'orbitale des électrons est dite *bloquée*, c'est-à-dire uniquement définie par le champ cristallin : le moment magnétique orbital est nul. Seul intervient le moment magnétique de spin. Découplé des orbitales, il est peu influencé par le champ cristallin : **l'anisotropie magnétocristalline K est relativement faible**. Le moment magnétique expérimental du fer est de  $2,2 \mu_B$ .

Dans les **métaux de terres rares 4f**, la couche magnétique 4f est une couche profonde, bien localisée qui est écrantée par les couches complètes et plus externes 5s et 5p. La localisation et l'écrantage de la couche magnétique 4f font qu'il ne peut y avoir d'interaction d'échange directe entre les électrons 4f appartenant à des atomes différents. Ces interactions étant faibles, de l'ordre de 0,01 eV, elles conduisent à des températures d'ordre inférieures à la température ambiante (la plus élevée est observée pour le **gadolinium** qui est ferromagnétique jusqu'à 20 °C). Par contre, dans les métaux de terres rares, le couplage spin-orbite, qui maintient liés les moments de spin et les moments orbitaux, domine l'interaction de couplage de l'orbite avec le champ cristallin du réseau, lequel est partiellement écranté par les couches électroniques plus externes. Dans ces conditions, le couplage spin-orbite est très important, de l'ordre de 1 eV, ce qui entraîne une **forte anisotropie magnétocristalline**.

### 1.1.3. Domaines magnétiques

En dessous de la température de Curie, les moments magnétiques électroniques d'une substance ferromagnétique (ou ferrimagnétique) sont donc tous alignés le long de directions privilégiées. Toutefois, cette substance peut présenter une aimantation inférieure à la valeur maximale correspondant à la

saturation (tous les moments magnétiques sont alors parallèles) et qui peut même s'annuler. Ce comportement s'explique par une subdivision de la substance en petits volumes élémentaires appelés **domaines de Weiss**, aimantés spontanément à saturation mais dans des directions différentes d'un volume à l'autre (Figure 2). Deux domaines magnétiques adjacents sont séparés par une zone de transition appelée **parois de Bloch**, à l'intérieur de laquelle l'aimantation tourne progressivement de la direction facile du premier domaine vers la direction facile du deuxième domaine.



**Figure 2- Organisation en domaines de Weiss d'un petit cristal de Fer unique.**

*Au niveau microscopique, la matière ferromagnétique est organisée en domaines élémentaires appelés domaines de Weiss, au sein desquels l'aimantation est orientée dans une direction d'aimantation facile. En présence d'un champ magnétique externe (symbolisé par les vecteurs rouges et bleus sous le matériau), la minimisation de l'énergie totale impose une réorganisation des domaines, avec une augmentation de la taille des domaines d'orientation favorable vis-à-vis du champ externe.*

Si la taille du matériau est de l'ordre de grandeur de la largeur de la paroi Bloch (de l'ordre de 10 nm pour le Fer), la structuration de la matière en domaines séparés par des parois demande trop d'énergie. Les corps ferromagnétiques de taille nanoscopiques sont par conséquent **monodomaines**. C'est le cas en particulier des **solutions colloïdales constituées de nanoparticules ferromagnétiques en suspension** (dont la taille est comprise entre 4 nm et 18 nm). Chaque particule est équivalente à un nano-aimant possédant un moment magnétique orienté dans une direction magnétique facile (superspin). Afin de simplifier la description de ce type de système, il est courant de faire l'hypothèse d'une **anisotropie uniaxiale** (une seule direction facile).

#### 1.1.4. Superparamagnétisme

Deux mécanismes contrôlent l'aimantation d'un matériau magnétique soumis à un champ magnétique externe croissant :

- **les déplacements des parois de Bloch** qui permettent aux domaines orientés le plus favorablement par rapport au champ de croître au détriment des autres domaines. Ces déplacements sont d'abord **réversibles** (champ très faible) puis **irréversibles**, les parois atteignant alors de nouvelles positions d'équilibre. Relativement aisés, ces déplacements ne nécessitent généralement qu'une énergie magnétique modérée ;
- **les rotations de l'aimantation spontanée** vers la direction du champ. Ce processus doit vaincre les forces d'anisotropie et exige donc des valeurs élevées de champ.

Sous l'action d'un champ magnétique externe, le retournement de l'aimantation globale de particules monodomaines uniaxiales ne peut se produire, en principe, que par rotation cohérente de tous les moments magnétiques à la fois. Le retour à l'équilibre est déterminée par deux processus différents : la **relaxation due à la diffusion brownienne**, caractérisée par la constante de temps  $\tau_B$ , et la **relaxation de Néel**, caractérisée par la constante de temps  $\tau_N$ . La relaxation brownienne induit un changement de direction du moment magnétique en raison de la rotation mécanique (visqueuse) de la particule, les moments magnétiques étant bloqués dans la direction facile. Par ailleurs, les moments magnétiques peuvent inverser leur direction à *l'intérieur de la particule*, en surmontant une barrière énergétique. Les fluctuations magnétiques engendrées par le retournement du moment magnétique le long d'une direction facile sont à l'origine du mécanisme de relaxation de Néel.

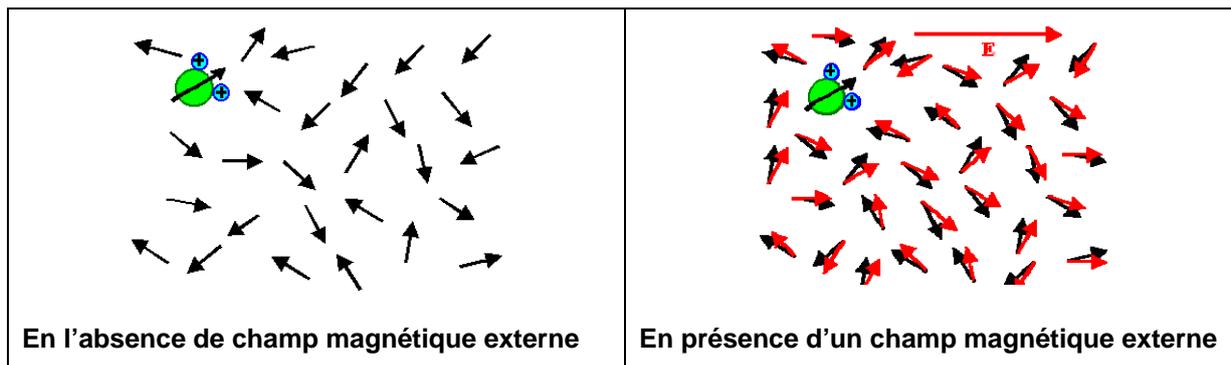
Le taux de relaxation magnétique effectif du colloïde est donné par :

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B} \quad [2]$$

Le mécanisme de relaxation dominant est celui qui présente le temps de relaxation le plus court. Pour une grosse particule,  $\tau_B$  est plus court que  $\tau_N$ , parce que le temps de relaxation brownienne est proportionnelle au volume du cristal, tandis que le temps de relaxation de Néel est une fonction exponentielle du volume. Ainsi, la rotation visqueuse de la particule devient le phénomène dominant la relaxation globale, qui est donc beaucoup plus rapide pour les solutions colloïdales que pour la poudre solide. Dans ces conditions, la courbe de magnétisation est parfaitement réversible, car la rapidité de la relaxation magnétique permet au système d'être constamment à l'équilibre thermodynamique. C'est le phénomène de **superparamagnétisme**, qui apparaît dès lors que la barrière d'énergie à franchir pour renverser l'aimantation est égale à l'énergie d'activation thermique ( $K.V \leq k.T$ ,  $K$  est la constante d'anisotropie, qui dépend du matériau magnétique et de la forme de la particule,  $V$  le volume de la particule ;  $k$  est la constante de Boltzmann et  $T$  la température absolue). Ainsi, pour un ensemble de particules donné, il existe une température critique dite température de blocage qui sépare l'état ferromagnétique et l'état superparamagnétique.

#### 1.1.5. Evolution de l'aimantation en fonction du champ

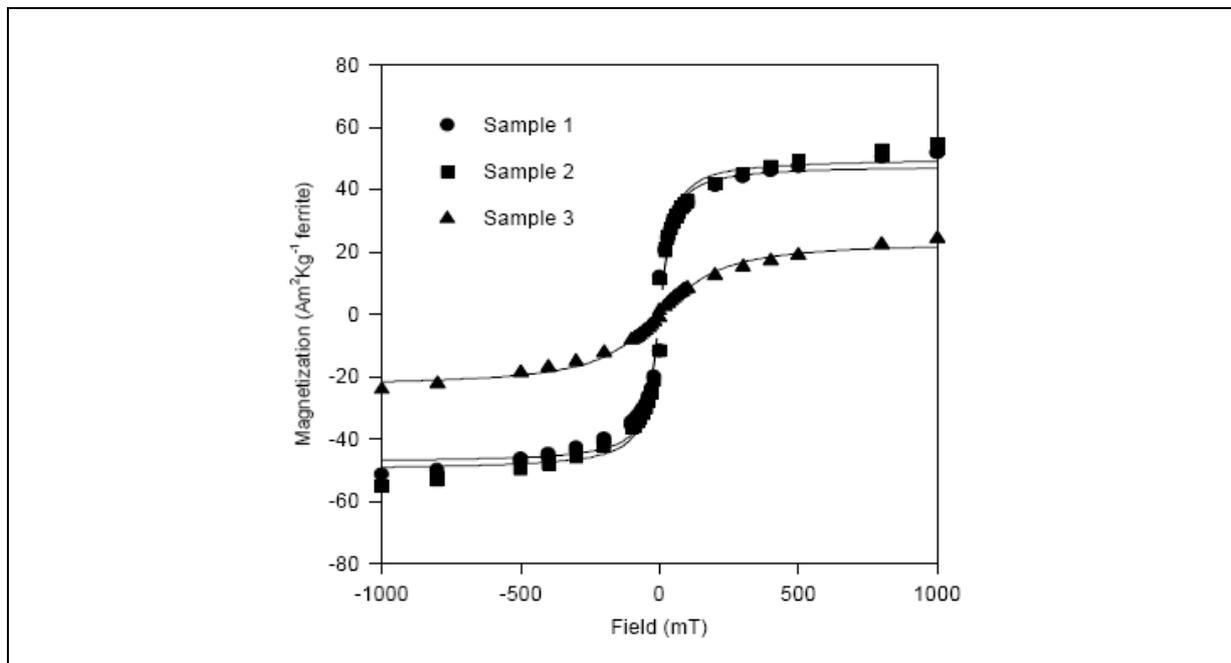
Sous l'action d'un champ magnétique externe, on pourrait s'attendre naïvement à un alignement parfait des moments magnétiques des particules en solution dans le champ, et par conséquent à une forte aimantation. En réalité, l'orientation dans la direction du champ est contrecarrée par les collisions aléatoires dues à l'agitation thermique du liquide porteur. L'aimantation acquise résulte donc d'un moyennage des ré-orientations des moments magnétiques en présence du champ magnétique (Figure 3).



**Figure 3- Orientation des dipôles magnétiques avec et sans champ magnétique externe**

Avant l'application du champ magnétique, l'aimantation est nulle du fait de la distribution aléatoire des orientations des dipôles magnétiques. En présence du champ  $E$ , les dipôles ont tendance à se tourner dans la direction du champ pour minimiser leur énergie. Ces images sont des « instantanés » puisque les dipôles sont constamment en mouvement.

L'énergie d'un dipôle magnétique plongé dans un champ magnétique est fonction de l'angle entre la direction du moment magnétique du dipôle et la direction du champ. En faisant l'hypothèse que la distribution des niveaux d'énergie correspondant à toutes les orientations possibles du moment magnétique de ce dipôle est de type Boltzmann (équilibre thermodynamique), on peut montrer que l'aimantation globale augmente avec le champ selon la **fonction de Langevin**. L'ajustement de la courbe d'aimantation expérimentale d'un fluide magnétique permet d'estimer la taille du cristal et son aimantation spécifique (Figure 4).



**Figure 4- Courbe magnétométrique de différentes nanoparticules d'oxyde de Fer**

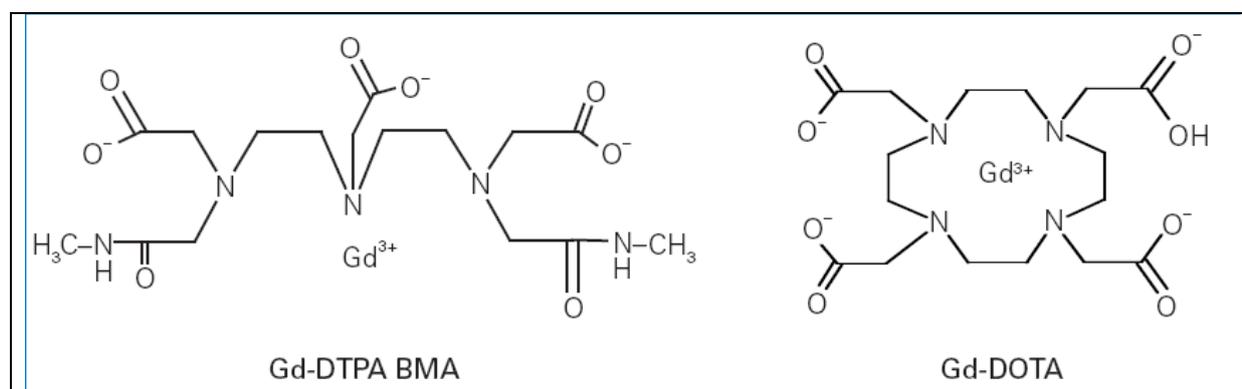
L'aimantation est donnée par :  $\langle M \rangle = M_s \cdot L(\beta)$ , où  $M_s$  est l'aimantation de saturation (en  $A.m^2$ ) et  $\beta = \mu.E/kT$  avec  $\mu$  module du moment magnétique,  $E$  champ magnétique externe,  $k$  constante de Boltzmann et  $T$  température absolue. Taille de l'échantillon 1 : 5,59 nm, échantillon 2 : 5,67 nm et échantillon 3 : 4,84 nm. Reproduit de (Laurent et al. 2008)

## 1.2. Les agents paramagnétiques

Leur principe consiste à utiliser des atomes au moment magnétique électronique très élevé, car porteurs de nombreux électrons non appariés (ils diffèrent ainsi de la plupart des atomes de l'organisme qui ne présentent pas de moment magnétique électronique). Les agents paramagnétiques sont pour la très grande majorité des **complexes à base d'ions gadolinium Gd(III+)**.

### 1.2.1. Caractéristiques physico-chimiques

L'ion gadolinium étant hautement toxique, le premier pré-requis est la synthèse d'un complexe de gadolinium stable tel que la présence de gadolinium libre dans l'organisme soit pratiquement impossible. Cet ion est donc complexé sous la forme d'un **chélate**. Parmi les produits commercialisés, il existe différents complexes de gadolinium, les complexes **linéaires** et les **macrocycliques** (Figure 5), ces composés pouvant être ioniques ou non-ioniques.



**Figure 5- Structures de chélate de gadolinium linéaire et macrocyclique.**

*Gadodiamide (linéaire) et Gadotérate de méglumine (macrocyclique). Reproduit de (Bongartz et al. 2008)*

La stabilité de tous les complexes approuvés est vérifiée et confirmée par de nombreuses études. Mais elles présentent toutefois de minimes différences, également décrites dans la littérature. Il semble que les complexes linéaires aient une liaison moins puissante, bien que demeurant dans les marges de la procédure d'admission. La liaison chimique entre le gadolinium et son ligand spécifique est un phénomène dynamique pouvant être mesuré à pH bas. En principe, dans tous les complexes, l'équilibre entre gadolinium libre et lié est largement déplacé vers le complexe lié (Figure 6). Pour certains complexes, un peu plus faiblement liés (complexes linéaires, non ioniques), des quantités excédentaires de formateurs de chélate sont ajoutées pour accroître la sécurité du produit.



**Figure 6- Etat d'équilibre de la liaison de gadolinium dans les produits de contraste.**

*Dans les produits de contraste, le gadolinium libre se trouve en constant échange avec le gadolinium chélaté. L'équilibre est très nettement déplacé en direction de la forme liée, non toxique. Reproduit de (Bongartz et al. 2008)*

En ce qui concerne l'IRM cardio-vasculaire, les agents commercialisés ont des propriétés physico-chimiques proches en termes de stabilité du complexe et d'efficacité en IRM et sont finalement comparables en termes d'utilisation.

### 1.2.2. Propriétés magnétiques

La relaxivité est définie comme l'augmentation du taux de relaxation du solvant (eau) induite par 1 mM d'ion actif :

$$\frac{1}{T_i^{post}} = \frac{1}{T_i^{pre}} + r_i \cdot C \quad [3]$$

$T_i^{post}$  : temps de relaxation longitudinal ( $i=1$ ) ou transversal ( $i=2$ ) en présence d'agent de contraste (/s)

$T_i^{pre}$  : temps de relaxation longitudinal ( $i=1$ ) ou transversal ( $i=2$ ) en l'absence d'agent de contraste (/s)

$r_i$  : relaxivité longitudinale ( $i=1$ ) ou transversale ( $i=2$ ) de l'agent de contraste (/mM/s)

$C$  : concentration de l'agent de contraste (mM)

Pour un agent paramagnétique, la relaxivité est optimisée lorsque la fréquence des mouvements de ré-orientation du composé est proche de la fréquence de résonance des protons.

Il existe deux contributions à la relaxation des protons dans les systèmes paramagnétiques : **la relaxation de sphère interne** et **la relaxation de sphère externe**. La relaxation de sphère interne concerne les échanges directs d'énergie entre les protons et les électrons localisés dans la première sphère d'hydratation de l'ion paramagnétique. Elle est dominée par le couplage scalaire et dipolaire des spins. Le couplage dipolaire est modulé par la rotation du centre paramagnétique, caractérisée par le temps  $\tau_R$ , par le temps de résidence des molécules d'eau dans la première sphère d'hydratation  $\tau_M$ , et par la relaxation électronique du spin de l'électron associé avec l'ion paramagnétique,  $\tau_{S1}$  et  $\tau_{S2}$ . Les termes de corrélation  $\tau_{C1}$  and  $\tau_{C2}$  sont utilisés pour définir la modulation du couplage dipolaire et sont définis par l'équation [4] :

$$\frac{1}{\tau_{Ci}} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_{Mi}} + \frac{1}{\tau_{Si}} \quad [4]$$

où  $i=1,2$

La contribution des effets de la relaxation de sphère interne à la relaxation totale des protons de l'eau est donnée par l'équation de Salomon-Bloembergen (Laurent et al. 2008).

La relaxation de sphère externe est due aux mouvements des protons de l'eau à proximité du gradient de champ magnétique généré par l'ion paramagnétique. L'interaction entre les spins des protons et le moment magnétique de l'ion paramagnétique est aussi une interaction dipolaire. Ce mécanisme intermoléculaire est modulé par le temps de corrélation translationnel ( $\tau_D$ ), qui prend en compte la diffusion relative ( $D$ ) du centre paramagnétique et de la molécule du solvant, ainsi que la distance d'approche la plus courte ( $d$ ) :

$$\tau_D = \frac{d^2}{D} \quad [5]$$

Le modèle de sphère externe est décrit par l'équation de Freed (Laurent et al. 2008).

### 1.2.3. Pharmacocinétique et biodistribution

Les complexes de gadolinium **standards** sont des **molécules de petite taille** (environ 500 Daltons) dont la **pharmacocinétique** est typiquement **bi-compartimentale** avec une première phase vasculaire plasmaticque (la demi-vie-plasmaticque chez le rat varie entre 15 et 30 minutes). Dès les premières secondes suivant l'injection, on observe une diffusion des produits de contraste dans le compartiment interstitiel, à l'exception du cerveau en présence d'une barrière hémato-encéphalique intacte. En résumé, ces produits présentent une **distribution globale extra-cellulaire** et une **élimination par filtration glomérulaire**, avec une demi-vie d'élimination chez l'homme de 1,2 à 1,6 heures.

Les recherches actuelles visent à une **optimisation de l'efficacité** et de **la spécificité** des agents de contraste. Afin d'**augmenter la rémanence vasculaire**, les complexes de gadolinium ont été couplés de manière covalente à des **macromolécules** telles que l'albumine sérique humaine (HSA) (Henoumont et al. 2008), des polysaccharides (dextran) (Preda et al. 2005), ou des polymères synthétiques (polylysine, polyéthylèneglycol, dendrimères, ...) (Raatschen et al. 2006). Cette stratégie permet non seulement de **ralentir l'excrétion rénale** de l'agent de contraste mais aussi de **réhausser son efficacité** grâce à la réduction de la mobilité moléculaire. L'inclusion des complexes paramagnétiques à des liposomes et des micelles (Parac-Vogt et al. 2006), mimétiques des structures cellulaires sanguines, a également été réalisée en vue d'augmenter la rémanence vasculaire.

### 1.2.4. Biocompatibilité

Tous les complexes de gadolinium sont considérés comme des **produits de contraste très surs** chez les patients dont les reins fonctionnent normalement. Avec la relation dose-effet favorable et la quasi-absence de néphrotoxicité, l'IRM avec produit de contraste était jusqu'à récemment parfaitement acceptée dans le diagnostic chez les patients en insuffisance rénale. Depuis peu de temps, un lien a été établi entre l'exposition aux agents de contraste contenant du gadolinium et la pathogénie de la **fibrose systémique néphrogénique** (FSN) (Agarwal et al. 2008). La FSN est une complication rare et potentiellement mortelle de cette exposition, qui affecte des patients dont les fonctions rénales sont déficientes. On ignore encore sa pathophysiologie exacte et, surtout, on ne dispose pas de traitement contre cette maladie. Une majorité des cas signalés ont été associés à une exposition au gadodiamide (Omniscan), qui appartient à la famille des complexes linéaires (Figure 5). Dans l'insuffisance rénale à un stade avancé, l'élimination rénale est diminuée et la demi-vie du gadolinium est prolongée d'environ 20 fois (pour le gadodiamide, elle passe de 1,3h à 34,3h [13,4–89,2h]). Avec cette exposition plus longue, les infimes quantités de gadolinium libre sont davantage soumises aux réactions biologiques, et du gadolinium élémentaire peut se libérer de son chélate (Bongartz 2007). En l'état actuel des connaissances, il semble que les complexes macrocycliques soient plus surs que les linéaires (Bongartz et al. 2008).

### 1.3. Les agents superparamagnétiques (*basé sur (Laurent et al. 2008)*)

Depuis plusieurs années, la recherche dans le domaine des agents de contraste IRM s'est orientée dans l'étude et le développement de **nanoparticules de fer superparamagnétiques**. En raison de leur relaxivité transversale très élevée, les suspensions colloïdales de nanocristaux d'oxyde de fer sont de bons candidats pour le développement de ces nouveaux agents de contraste. L'effet prédominant sur la relaxation T2 n'empêche pas l'exploitation de leur effet T1, à l'aide de paramètres d'imagerie appropriés (Canet et al. 1993; Chambon et al. 1993). Deux classes distinctes de nanoparticules superparamagnétiques sont actuellement utilisées pour l'imagerie clinique : les **SPIO** (*superparamagnetic particles of iron oxides*), avec un diamètre hydrodynamique supérieur à 50 nm et les **USPIO** (*ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxides*), avec un diamètre hydrodynamique plus petit (Benderbous et al. 1996).

Deux composés de la famille des SPIO sont commercialisés pour une administration intraveineuse : les Ferumoxides (Endorem<sup>®</sup> en Europe, Feridex<sup>®</sup> aux Etats-Unis et au Japon) et le Ferucarbotran (Resovist<sup>®</sup> en Europe et au Japon). Dans les deux cas, les cibles cliniques sont les tumeurs du foie. Ces nanoparticules d'oxyde de fer sont de taille moyenne et enrobées avec du dextran (ferumoxides) ou du carboxydextran (ferucarbotran) (Reimer and Tombach 1998). Plusieurs USPIO ont été étudiés chez l'Homme, tels que le Ferumoxtran-10 (dextran) (Harisinghani et al. 2003; Clement and Luciani 2004; Saleh et al. 2004a; Tang et al. 2008), les VSOP (citrate) (Wagner et al. 2002), le feruglose (amidon pegylé) (Taylor et al. 1999), ou le SHU555C (carboxy-dextran) (Tombach et al. 2004), avec des applications variées (angiographie, tumeurs, plaque d'athérome, neuroinflammation...). De plus, le marquage *ex-vivo* de cellules progénitrices ou de cellules souches par les nanoparticules d'oxyde de Fer pour un suivi *in vivo* en IRM constitue un domaine de recherche majeur (Daldrup-Link et al. 2003; Bulte et al. 2004; Stroh et al. 2005; Guzman et al. 2007).

#### 1.3.1. Composition chimique

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont des ferrites composés de **magnétite** ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) et de **maghémite** ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Les ions métalliques dans le cristal de ferrite occupent deux sous-réseaux, de structure dite spinelle. Cette structuration cristalline entraîne une aimantation nette de la nanoparticule. Les ferrites sont caractérisés par leur aimantation de saturation à 300 K ( $92 \text{ emug}^{-1}$  pour la magnétite et  $78 \text{ emug}^{-1}$  pour la maghémite) (Corot et al. 2006).

De nombreuses méthodes ont été utilisées pour la synthèse des nanoparticules magnétiques pour l'imagerie médicale. Cette synthèse est difficile en raison de la nature colloïdale des nanoparticules superparamagnétique. Le premier point critique consiste à définir les conditions expérimentales permettant d'obtenir une **population monodispersée de grains magnétique de taille adéquate**. Le deuxième point critique concerne la sélection d'un procédé qui permette une **production industrielle sans procédure de purification** complexe. L'**enrobage** (*coating*) des nanoparticules magnétiques est ensuite nécessaire pour éviter une déstabilisation et une agglomération dans le colloïde et pour rendre les nanoparticules solubles dans le liquide porteur (solution saline). De nombreux enrobages monomériques (acide citrique), polymériques (dextran ou dérivés de dextran), ou composé de petites molécules organiques anioniques ont été proposés. La nature de l'enrobage, de même que son arrangement géométrique, déterminent non seulement la taille du colloïde mais joue également un rôle important dans les propriétés de pharmacocinétique et de biodistribution.

### 1.3.2. Propriétés magnétiques

Les propriétés magnétiques des nanoparticules dépendent de leur structure physique : la taille et la forme des particules, leur microstructure et la phase chimique dans laquelle elles se trouvent. L'aimantation de saturation diminue avec la taille de la nanoparticule, ce qui nuit à leur efficacité. De plus, les nanoparticules d'oxyde de Fer magnétiques obtenues avec différents procédés chimiques présentent de très grandes différences en termes de propriétés magnétiques et d'aimantation de saturation. Ces différences sont imputables à des variations dans l'ordre cristallographique, à la structure de la surface, et aux impuretés. L'enrobage peut également affecter l'aimantation. Les colloïdes de nanoparticules d'oxyde de Fer placées dans un champ magnétique externe créent un fort gradient de champ magnétique local, ce qui va influencer le déphasage et la relaxation des protons de l'eau environnante. La théorie de relaxation des nanoparticules de Fer repose sur celle développée initialement pour les systèmes paramagnétiques. Pour les particules superparamagnétiques, la contribution des effets de sphère interne à la relaxation sont mineures et souvent négligeables, comparé à la contribution des **effets de sphère externe**.

Les propriétés de relaxation magnétique nucléaire d'un composé peuvent être appréhendées par l'étude de son profil NMRD (*nuclear magnetic resonance dispersion*). Ces courbes donnent l'évolution de la relaxivité en fonction du champ magnétique externe. L'interprétation de la dépendance en champ du taux de relaxation longitudinal (profil NMRD T1) est basée sur la relaxation de Curie, en considérant deux contributions à la relaxation : d'une part la diffusion des protons dans les inhomogénéités de champ magnétique induites par le mouvement des nanoparticules, indépendamment des fluctuations de l'aimantation électronique (à strictement parler, cette contribution est précisément la contribution de la **relaxation de Curie**), et d'autre part, les fluctuations du moment magnétique électronique (**relaxation de Néel**). Selon le modèle classique de sphère externe, la relaxation superparamagnétique est gouvernée par l'équation de Freed, en remplaçant le temps de relaxation électronique  $\tau_{SI}$  par le temps de relaxation de Néel (Laurent et al. 2008). Quand le temps de corrélation translationnel est petit devant le temps de relaxation de Néel, l'équation de Freed se réduit aux équations antérieures dites de Ayant (Laurent et al. 2008).

La capacité d'une fluctuation magnétique à relaxer les spins des protons dépend de l'ordre de grandeur de son temps de corrélation par rapport à la période de précession des spins dans le champ magnétique externe  $B_0$ . Si le temps de corrélation global défini par :

$$\frac{1}{\tau_C} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_D} \quad [6]$$

$\tau_N$  : temps de relaxation de Néel

$\tau_D$  : temps de corrélation translationnel

est plus long que la période de précession du proton, la fluctuation est moyennée par la précession et elle est inefficace pour la relaxation. Dans le cas contraire, la fluctuation relaxera efficacement les spins de protons. L'équation [7] définit la limite séparant les domaines où la fluctuation caractérisée par le temps de corrélation  $\tau_C$  induit une relaxation du proton ( $w_I \tau_C < 1$ ) ou pas ( $w_I \tau_C > 1$ ) :

$$w_I \cdot \tau_C = 1 \quad [7]$$

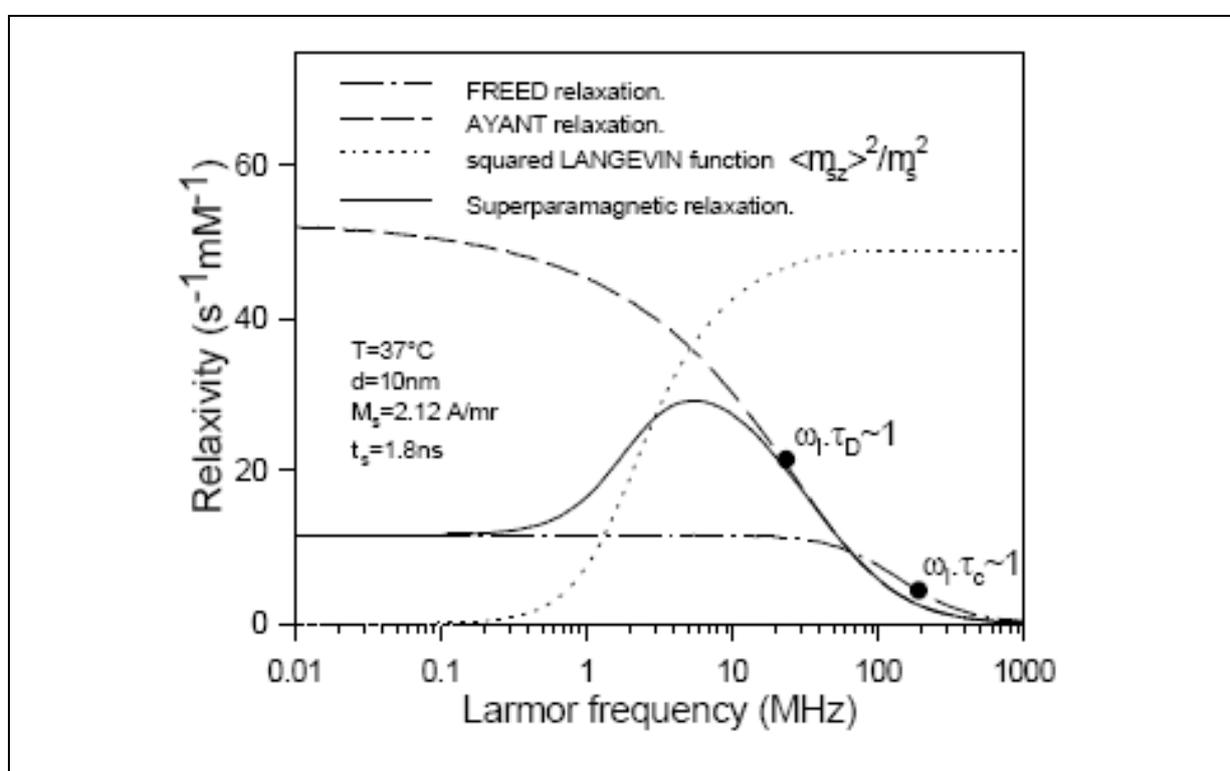
$w_I$  : fréquence angulaire de précession du proton

De plus, le spin de l'électron du cristal superparamagnétique peut lui-même être relaxé ou pas par cette même fluctuation, en fonction de la situation du temps de corrélation  $\tau_C$  par rapport à la période de précession du spin (plus long ou moins long). Ce phénomène est visible à travers la dispersion (point d'inflexion de la courbe) centrée autour de  $w_S \tau_C = 1$ , où  $w_S$  est fréquence angulaire de précession de

l'électron. Comme  $w_S$  est 658 fois plus grand que  $w_I$ , cette dispersion apparaît à un champ bien moindre que pour le proton. La relaxation induite par les cristaux superparamagnétiques est davantage compliquée du fait de la modulation de la fluctuation du moment magnétique de l'électron par la relaxation de Néel, qui dépend de l'anisotropie du cristal.

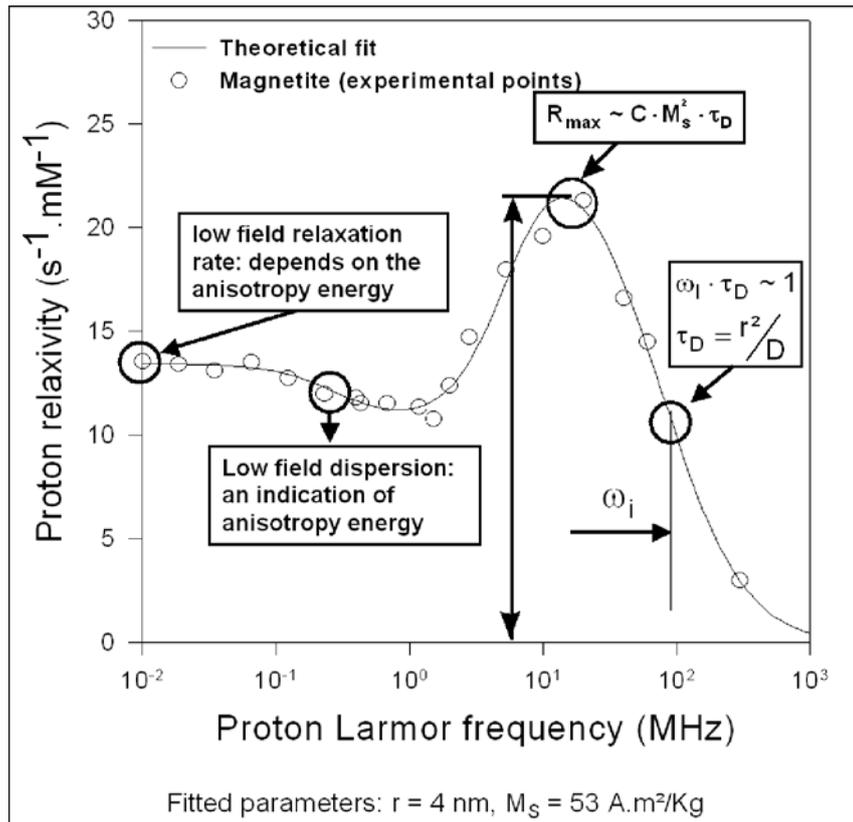
#### Modèle de haute anisotropie

Quand l'énergie d'anisotropie est suffisamment élevée, les fluctuations magnétiques sont liées aux sauts du moment magnétique entre les différentes directions faciles. A bas champ, le taux de relaxation longitudinal est obtenu en annulant la fréquence de Larmor de l'électron dans les équations de Freed. La fonction de densité spectrale est caractérisée par un temps de corrélation global dépendant de  $\tau_N$  et  $\tau_D$ . A haut champ, la relaxation de Curie domine. Pour des champs intermédiaires, les taux de relaxations sont une combinaison des contributions haut champ et bas champ, pondérés par des facteurs dépendant de la relaxation de Langevin (Figure 7). Ce modèle correspond bien aux profils NMRD expérimentaux pour de grosses particules contenant plus d'un cristal (SPIO) (Figure 8), mais ne décrit pas la partie bas champ des courbes NMRD des USPIO contenant un seul cristal par particule.



**Figure 7- Différentes contributions à la relaxation du proton dans le modèle simplifié pour les cristaux présentant une anisotropie élevée**

Reproduit de (Laurent et al. 2008)



**Figure 8- Profil NMRD T1 de particules de magnétite colloïdales en solution**

Reproduit de (Laurent et al. 2008)

*Petits cristaux et limite de faible énergie d'anisotropie*

L'hypothèse d'un verrouillage de l'aimantation le long des directions faciles devient de moins en moins valide à mesure que la taille de la particule (et par conséquent l'anisotropie) diminue. La prise en compte d'une telle réduction de l'interaction d'anisotropie nécessite une nouvelle théorie, entre les deux cas limites considérés jusqu'à présent : le cas où l'énergie d'anisotropie est supposée infinie, et la théorie classique de sphère externe où elle est supposée négligeable. La théorie prévoit une différence marquée entre les mécanismes de relaxation bas champ pour les petites particules (dispersion faible) et pour les plus grandes particules (pas de dispersion). Ces prédictions sont confirmées par la différence de profils NMRD des SPIO et des USPIO. Une confirmation expérimentale de cette approche théorique a été obtenue à l'aide des profils NMRD de suspensions colloïdales de magnétite, dopées avec du Cobalt, un élément qui augmente considérablement l'énergie d'anisotropie. Pour ces petites particules, la faible dispersion à bas champ apparaît pour de faibles dopages de Cobalt, mais disparaît à mesure que le dopage augmente (Laurent et al. 2008).

### 1.3.3. Internalisation *in-vitro* par les macrophages

Les oxydes de Fer partagent la propriété d'être internalisés spécifiquement par les macrophages. L'**endocytose** est un mécanisme complexe qui peut être divisé en différents processus : la pinocytose, l'endocytose non-spécifique, l'endocytose médiée par des récepteurs, et la phagocytose, qui est le mécanisme dominant pour l'endocytose des grosses particules. Mise à part la taille, l'internalisation par phagocytose dépend aussi des propriétés de surface des nanoparticules, comme en témoigne la meilleure internalisation à la fois des SPIO et des USPIO enrobées de carboxy-dextran, en comparaison avec l'enrobage dextran non-ionique (Metz et al. 2006). Parmi les différents type de récepteurs impliqués dans l'endocytose, on distingue la famille des récepteurs éboueurs (*scavenger*), qui permettent l'endocytose d'un grand nombre de ligands polyanioniques et de nanoparticules (Raynal et al. 2004). En plus de leur propriété phagocytaire, les macrophages possèdent de grandes capacités de sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines. Un niveau très faible d'interleukin-1 (comparable aux contrôles négatifs) a été observé après l'incubation de macrophages avec des ferumoxides ou du Ferumoxtran-10, y compris à forte concentration (500 µg Fe/ml), ce qui indique un potentiel pro-inflammatoire très faible pour ces nanoparticules (Raynal et al. 2004).

### 1.3.4. Pharmacocinétique et biodistribution

Le **comportement biologique des nanoparticules magnétiques** dépend également fortement de leur **structure**, ainsi que de leur **polydispersion**, de leur **charge** et de la nature de leur **enrobage**. Les nanoparticules sont habituellement internalisées par les macrophages du foie (cellules de Küppfer), de la rate et de la moelle osseuse, qui sont des tissus riches en macrophages et facilement accessibles. La diminution du taux d'internalisation de certaines nanoparticules, en limitant la phagocytose dans le foie et dans la rate, entraîne une demi-vie plasmatique plus longue, ce qui leur permet d'atteindre des territoires moins facilement accessibles. La demi-vie plasmatique de différentes nanoparticules d'oxyde de fer administrées chez des patients varie entre 1h et 24h-36h (Corot et al. 2006). Pour un enrobage donné, les USPIO sont moins internalisés par le foie en raison de leur petite taille. De la même manière que pour l'internalisation *in vitro*, la demi-vie plasmatique est plus courte pour les dextrans ioniques (carboxy et carboxy-méthyl) que pour les dextrans non-ioniques. La taille n'est pas le seul facteur en jeu, puisque les très petits USPIO (*very small superparamagnetic iron oxyde particle* ou VSOP), de taille 8,7 nm, présentent la plus petite demi-vie plasmatique chez l'Homme, en raison de leur surface très anionique (Wagner et al. 2002).

Pour toutes les nanoparticules d'oxyde de fer, la **demi-vie plasmatique** est **dose-dépendante**. Cette caractéristique est liée à la saturation progressive de l'internalisation macrophagique dans le foie ou dans les autres organes riches en macrophages (rate et moelle osseuse). Cependant, la légère augmentation de demi-vie observée dans la gamme des doses clinique n'a pas d'impact déterminant en terme de profil pharmacocinétique global (Bourrinet et al. 2006). La demi-vie plasmatique des USPIO est généralement plus longue chez l'Homme que chez l'animal. Par exemple, aux doses de 30 ou 45 µmol Fe/kg, la demi-vie du Ferumoxtran-10 est de 2h à 3h chez le rat et de 24h à 36h chez l'Homme. Comme l'accès des USPIO aux compartiments profonds est facilité par une demi-vie prolongée, les expérimentations chez l'animal sont généralement réalisées avec de fortes doses d'USPIO (200 à 2000 µmol Fe/kg), en comparaison avec la dose clinique (45 µmol Fe/kg). Bien que l'internalisation des USPIO dans les macrophages soit clairement établie, les voies de transport des USPIO vers les macrophages tissulaires ne sont pas totalement élucidées. Plusieurs mécanismes ont été proposés (Dousset et al. 1999; Rausch et al. 2003; Corot et al. 2004) : 1) les USPIO sont phagocytés par les monocytes sanguins activés qui migrent dans les tissus pathologiques ; 2) les USPIO migrent dans les tissus (par exemple en traversant l'endothélium par transcytose) et sont internalisés secondairement par les macrophages *in situ* ; 3) les

USPIO sont amenés dans le tissu pathologique par la néovascularisation inflammatoire (*vaso vasorum*) irriguant le tissu. Ces trois mécanismes peuvent se produire simultanément.

### 1.3.5. Métabolisme

Le **métabolisme intracellulaire** dépend de la **composition chimique** des nanoparticules d'oxyde de fer. Il a été montré que le Ferumoxtran-10 était complètement dégradé dans le lysosome du macrophage en 7 jours (Schulze et al. 1995). Le principal site d'internalisation est représenté par les cellules de Küppfer. La distribution et l'élimination ont été évaluées par double marquage du Ferumoxtran-10 avec le  $^{14}\text{C}$  et le  $^{59}\text{Fe}$ . Au vue des différences de devenir des radioactivités liées au  $^{14}\text{C}$  et au  $^{59}\text{Fe}$ , l'enrobage dextran est progressivement dégradé par les dextranases intracellulaires après internalisation macrophagique, avec une élimination pratiquement exclusivement urinaire. Le fer contenu dans le Ferumoxtran-10 est incorporé dans les protéines de stockage physiologiques du fer (ferritine) et il est progressivement recyclé dans les globules rouges (hémoglobine). De même que le fer endogène, son élimination de l'organisme est très lente. Le même comportement a été décrit pour les ferumoxides (Weissleder et al. 1990). Les nanoparticules de Fer avec un enrobage dextran, qui sont biodégradables, n'ont par conséquent pas de toxicité à long terme. Outre le Ferumoxtran-10 et les ferumoxides, cette augmentation de taux de ferritine a été rapportée dans plusieurs articles utilisant divers USPIO (Taylor et al. 1999; Taupitz et al. 2004).

La biodistribution dans les cellules endothéliales est un autre aspect important, car ces cellules sont moins efficaces pour métaboliser et dégrader les nanoparticules d'oxyde de fer en comparaison avec les cellules de Küppfer. Il n'est pas conséquent pas toujours possible de prédire la pharmacocinétique, le profil métabolique ou la distribution sub-cellulaire d'un type de nanoparticules, en se basant sur les résultats obtenus de composés similaires, en raison de la grande variation de composition de l'enrobage.

### 1.3.6. Biocompatibilité

En général, les nanoparticules de Fer présentent une **bonne biocompatibilité** (Raynal et al. 2004) et leur internalisation par les macrophages n'est pas associée avec une activation cellulaire. L'injection chez l'Homme a montré des profils de sécurité satisfaisant d'après les tests pharmacologiques et toxicologiques standards (Corot et al. 2006). La toxicité du fer et de ses dérivés a également été étudiée. Les tissus humains peuvent contenir du fer ou des nanoparticules d'oxyde de fer sous forme d'hémosidérine, de ferritine et de transferrine. Le foie normal contient approximativement 0,2 mg de fer par gramme et les stocks de fer totaux sont de 3500 mg chez l'Homme. La quantité de fer administrée pour l'imagerie diagnostique (50 à 200 mg de fer) est petite en comparaison avec les quantités de fer endogène. La toxicité chronique liée ne se développe que pour des quantités de fer hépatiques supérieures à 4 mg Fe/g (Bonnemain 1998).

La présence d'anticorps anti-dextran détectés chez un petit nombre d'individus (Anastase et al. 1996) représente au moins une menace théorique associée à l'enrobage dextran utilisé pour certaines nanoparticules. Des réactions allergiques sévères aux oxydes de fer utilisés en association avec l'érythropoïétine (EPO) humaine recombinante pour le traitement de l'anémie au stade terminal de la maladie rénale ont été rapportées (incidence de 0,7% (Fishbane et al. 1996)). Des réactions graves associées à l'utilisation de dextrans 40 et 70 comme substitut de plasma ont également été rapportées (Zinderman et al. 2006). Celles-ci sont causées, au moins en partie, par des anticorps IgG anti-dextran (Zinderman et al. 2006). Dans le cas des SPIO et des USPIO, le poids moléculaire des dextrans et des carboxydextran utilisés pour l'enrobage (10 kDa ou 2 kDa) est inférieur à celui des substituts de plasma. A notre connaissance, aucune donnée n'a été publiée concernant l'observation d'effets adverses des (U)SPIO liés aux anticorps anti-dextran.

#### 1.4. Les noyaux hyperpolarisés

Différentes techniques permettent d'utiliser deux gaz rares, le xénon 129 ( $^{129}\text{Xe}$ ) et l'hélium 3 ( $^3\text{He}$ ), polarisés nucléairement, pour réaliser des IRM fonctionnelles pulmonaires de ventilation et de perfusion (Viallon et al. 2000; Driehuys et al. 2006; Al Faraj et al. 2008). Le  $^{129}\text{Xe}$  hyperpolarisé a de plus été utilisé pour étudier la perfusion cérébrale (Duhamel et al. 2001), en s'inspirant des méthodes de mesure du débit basées sur le clairance du xénon. De nouvelles techniques ont récemment été développées pour l'hyperpolarisation du carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ ) (Mansson et al. 2006). L'IRM du  $^{13}\text{C}$  hyperpolarisé est très prometteuse pour la réalisation d'angiographies (Svensson et al. 2003) et d'imagerie de perfusion (Svensson et al. 2003), car le traceur agit comme une source directe de signal, contrairement aux techniques utilisant les chélates de gadolinium, où c'est l'effet indirect du produit de contraste sur les protons qui est mesuré. Cette technique a également été utilisée pour effectuer du suivi de cathéter (Magnusson et al. 2007), et pour l'étude du métabolisme du glucose (van der Zijden et al. 2008).

#### 1.5. Développements actuels et futurs

La conception d'**agents de contraste** dits "**intelligents**", dont l'efficacité est modulée par l'environnement biologique (présence d'enzymes,  $\text{pO}_2$ , pH, ..) fait également l'objet de recherches actuelles. Ainsi, des agents de contraste « pH-spécifiques » qui développent leur effet au voisinage de tumeurs dont le pH est proche de 6,8, alors que le milieu extra-cellulaire sain présente un pH de 7,4, ont été synthétisés (Hartman et al. 2008). Les études de pointe s'orientent aujourd'hui vers l'**imagerie moléculaire**, dont la stratégie repose sur la reconnaissance de structures moléculaires spécifiques de pathologies. A cette fin, le vecteur est greffé au « contrastophore », particule superparamagnétique (Huang et al. 2008) ou complexe paramagnétique (Corot et al. 2008).

## 2. Quantification de la perfusion et de la perméabilité en IRM

La **microcirculation** joue un rôle fondamental dans l'évaluation des **pathologies ischémiques**, puisque c'est au niveau des microvaisseaux que s'effectue la majeure partie des échanges métaboliques entre le sang et le tissu. Dans le cas de l'AVC, l'évaluation de l'hémodynamique tissulaire permet de préciser la physiopathologie de l'accident ischémique par l'identification précise des conséquences parenchymateuses. Cette évaluation détermine l'éligibilité des patients aux thérapeutiques destinées à la reperfusion, et l'impact thérapeutique. La caractérisation de la microcirculation s'effectue par l'estimation de paramètres de perfusion (débit sanguin régional) et de perméabilité capillaire (constantes de transfert entre l'espace vasculaire et extravasculaire), et peut s'étendre à d'autres champs d'application que l'AVC, tels que l'ischémie myocardique ou la néoangiogenèse en oncologie.

La plupart des techniques d'évaluation de la microcirculation reposent sur le suivi d'un traceur du compartiment vasculaire et l'enregistrement de la distribution de ce traceur dans l'organe étudié. Le suivi de la concentration des traceurs permet de connaître leur vitesse de distribution et par conséquent le débit sanguin. Au plan théorique, les principes utilisés par l'imagerie moderne sont ceux qui ont été énoncés au siècle dernier pour mesurer des débits à partir des courbes de dilution d'un indicateur coloré. La méthode de référence pour la mesure de débits régionaux est la technique des microsphères radioactives. Cette technique est utilisée exclusivement chez l'animal en raison de son caractère invasif. Plusieurs techniques ont été développées pour évaluer le débit sanguin cérébral chez l'Homme de manière non-invasive. Actuellement, les traceurs radioactifs servent de référence dans ce domaine, avec deux types d'imagerie scintigraphique : la scintigraphie par émission de photons simples et la tomographie par émission de positons (Heiss and Podreka 1993; Ito et al. 2005). L'avènement des multidétecteurs autorise une analyse multimodale du parenchyme (scanner X sans injection), des vaisseaux (angio-scanner), mais également de la perfusion (scanner X avec injection de produits iodés) (Scaroni et al. 2006; Tambasco et al. 2006). La tomodensitométrie permet d'obtenir d'excellentes résolutions spatiale et temporelle, et surtout, c'est une technique moins coûteuse et plus accessible. Les principaux inconvénients proviennent des effets indésirables des produits iodés, et de l'exposition aux rayons X.

Le caractère non invasif, la résolution spatiale et temporelle relativement élevée, et la diversité en termes de contraste d'image font de l'**imagerie par résonance magnétique (IRM)** un outil idéal pour l'étude de la microcirculation. Il existe différentes méthodes en IRM pour estimer la **perfusion tissulaire** et la **perméabilité capillaire**. Celles-ci diffèrent par leur utilisation respective de produit de contraste endogènes (marquage intrinsèque de flux, tels que l'*Arterial Spin Labeling* ou *ASL*) ou exogènes (à l'aide de chélates de gadolinium, de nanoparticules de Fer, ou encore de gaz hyperpolarisés). Nous limitons notre exposé à l'IRM dynamique avec injection de produit de contraste, puisque c'est la technique que nous avons utilisée pour nos travaux de recherche.

### 2.1. Analyse de la cinétique d'un agent de contraste

L'IRM dynamique avec produit de contraste consiste en l'injection intraveineuse d'un produit de contraste (chélates de gadolinium dans le contexte clinique) et au suivi de son passage dans le tissu à l'aide de l'acquisition répétée des images de l'organe à une cadence suffisante. Cependant, les images natives ne se prêtent pas à une interprétation visuelle aisée. Le développement de méthodes de modélisation des données et d'extraction de paramètres quantifiables est par conséquent nécessaire.

#### 2.1.1. Techniques IRM

Les séquences IRM peuvent être conçues de manière à être sensibles à la phase vasculaire du produit de contraste (méthodes pondérées T2\* basées sur la susceptibilité magnétique) ou à la présence de produit de contraste dilué dans l'espace extracellulaire extravasculaire (méthodes pondérées T1 basées sur la relaxivité). Ces deux méthodes sont comparées dans le *Tableau 1*.

	<b>Dynamic-susceptibility contrast enhanced MRI (DSC-MRI)</b>	<b>Dynamic relaxivity contrast enhanced MRI (DCE-MRI)</b>
<b>Mécanisme de réhaussement tissulaire</b>	Effets de susceptibilité magnétique du produit de contraste sur le champ magnétique	Effets de relaxivité du produit de contraste sur l'eau des tissus
<b>Compartiment tissulaire exploré</b>	Espace vasculaire	Espaces vasculaire et extravasculaire
<b>Variation d'intensité du signal tissulaire</b>	Chute de signal	Réhaussement de signal
<b>Durée de l'effet et résolution temporelle optimale</b>	Secondes / toutes les 1-2 secondes	Minutes / Toutes les 2-25 secondes
<b>Méthode de quantification utilisée</b>	Boîte noire	Modèle pharmacocinétique multi-compartimental
<b>Paramètres cinétiques mesurés</b>	Débit et volume sanguin régional, temps de transit moyen	Constantes de transfert, volume de distribution du produit de contraste

**Tableau 1- Comparaison des techniques d'IRM dynamique de susceptibilité et de relaxivité**

### **Imagerie dynamique pondérée T2\* (DSC-MRI)**

#### *Acquisition des données*

Les images de perfusion sont obtenues avec la technique de **suivi de bolus** (*bolus tracking*). Le premier passage de produit de contraste dans les capillaires induit une **chute de signal** en raison des effets de susceptibilité magnétique causés par la compartimentalisation du produit paramagnétique. L'amplitude de la chute de signal dépend du type de séquence utilisée, de la concentration vasculaire du produit de contraste, ainsi que de la taille et de la densité des microvaisseaux (Dennie et al. 1998). Le rapport signal-sur-bruit (SNR) de la technique DSC-MRI peut être augmentée en utilisant de plus fortes doses de produit de contraste ( $>0,2$  mmol/kg) (Bruening et al. 2000), mais au détriment de la précision de la quantification (Alger et al. 2009). Typiquement, la stratégie d'imagerie consiste à utiliser une séquence rapide pour obtenir une **résolution temporelle de l'ordre de la seconde**. Dans cette petite fenêtre d'acquisition, il est généralement possible d'acquérir des données multi-coupes avec une matrice de 128x128 ou plus, en fonction des spécificités du scanner. Les séquences écho-planaires (**EPI**) sont le plus souvent utilisées. Cependant, leur application est limitée en ce qui concerne les tissus extracrâniens, en raison de la sensibilité intrinsèque de ces techniques aux artefacts de susceptibilité magnétique (interfaces air-tissu). Les séquences en écho de spin sont plus sensibles aux débit sanguins dans les capillaires, comparé aux séquences en écho de gradient, qui sont elles plus sensibles aux signaux des gros vaisseaux (Simonsen et al. 2000). Cependant, cet avantage est contrebalancé par la perte de rapport signal-sur-bruit de la séquence **EPI** écho de spin par rapport à la séquence **EPI** écho de gradient.

## Analyse des images

L'analyse des images de DSC-MRI repose sur l'hypothèse selon laquelle le produit de contraste demeure **intravasculaire** pendant le temps de la mesure, se comportant ainsi comme un marqueur du secteur vasculaire. Cette hypothèse est valide uniquement dans le cerveau présentant une barrière hémato-encéphalique intacte. Les **applications** de la technique DSC-MRI concernent donc principalement le **cerveau**, mais elle peut également être utilisée pour l'estimation de la **perfusion tumorale** à l'aide de **nanoparticules d'oxyde de Fer** (Varallyay et al. 2009). L'estimation de la concentration de produit de contraste à partir des variations de signal observées est réalisée en faisant l'hypothèse que la concentration de produit de contraste est reliée linéairement à la variation de la relaxivité transversale :

$$C_i(t) = k \cdot \Delta R_2^*(t) \quad [8]$$

avec :

$$\Delta R_2^*(t) = \frac{1}{T_2^*(t)} - \frac{1}{T_{20}^*} = -\frac{1}{TE} \cdot \ln\left(\frac{S(t)}{S_0}\right) \quad [9]$$

$TE$  : temps d'écho de la séquence (secondes)

$S(t)$  : signal RM à l'instant  $t$  (unités arbitraires)

$S_0$  : signal RM avant l'arrivée du produit de contraste ou ligne de base (unités arbitraires)

Les courbes ainsi obtenues dans une artère et dans le tissu sont analysées soit quantitativement, à l'aide de la théorie décrite ci-dessous, soit de manière semi-quantitative, à l'aide de paramètres dits « de synthèse » tels que l'aire sous la courbe, le temps au pic, le temps d'arrivée du bolus, etc. Pour ce type d'approche, l'ajustement par une fonction gamma est souvent utilisé, dans le but de débruiter les données, de les extrapoler et d'éliminer la recirculation (Rempp et al. 1994). L'inconvénient des paramètres semi-quantitatifs provient du fait qu'ils peuvent être influencés par les facteurs physiologiques (fraction d'éjection cardiaque), ou d'acquisition (gain), ce qui rend les comparaisons intra-patients et intra-systèmes problématiques. Néanmoins, leur calcul est beaucoup plus simple et ils se sont révélés utiles pour différencier un certain nombre de situations pathologiques et/ou physiologiques.

## Imagerie dynamique pondérée T1 (DCE-MRI)

### *Acquisition des données*

Le mécanisme de réhaussement est l'augmentation du taux de relaxation longitudinal T1 causé par le produit de contraste. La plupart des études de DCE-MRI utilisent des séquences en écho de gradient 2D ou 3D, des séquences rapides d'inversion/récupération ou de saturation/récupération (type turboFLASH) ou des séquences écho planaires. Le choix de la séquence et des paramètres utilisés dépend des avantages et des désavantages intrinsèques de chacune des techniques, en prenant en compte la sensibilité T1, le nombre de coupes, les temps d'acquisition, les artefacts provenant des inhomogénéités de champ magnétique et la précision de la quantification. L'amplitude du réhaussement T1 dépend de multiples facteurs physiques (T1 pré-contraste, dose de produit de contraste, paramètres d'imagerie, gain) et physiologiques (perfusion tissulaire, perméabilité capillaire, surface d'échange des capillaires, volume de l'espace extravasculaire). Les **applications** de la technique DCE-MRI concernent principalement les **tumeurs** et la mesure de la **perfusion hors du système nerveux central** (myocarde par exemple).

### *Analyse des images*

L'approche DCE-MRI nécessite la quantification du T1 pré-contraste à l'aide d'une séquence préalable (même séquence que la séquence dynamique, en faisant varier le temps de répétition TR, le temps d'inversion TI, ou l'angle de bascule). La concentration tissulaire du produit de contraste est estimée avec l'hypothèse suivante :

$$C_i(t) = \Delta R_1(t) = \frac{1}{T_1(t)} - \frac{1}{T_{10}} \quad [10]$$

où  $T_1(t)$  (post-contraste) est ajusté à l'aide de l'équation de la séquence. Quand il n'est pas possible de quantifier le T1 pré-contraste (pour des raisons de temps par exemple), une approche simplificatrice consiste à faire l'hypothèse que les variations de signal RM sont proportionnelles aux variations de relaxivité longitudinale :

$$\Delta R_1(t) = k \cdot \frac{S(t) - S_0}{S_0} \quad [11]$$

$S(t)$  : signal RM à l'instant  $t$  (unités arbitraires)

$S_0$  : signal RM avant l'arrivée du produit de contraste ou ligne de base (unités arbitraires)

La validité de cette hypothèse doit être vérifiée au cas par cas, en fonction des paramètres de la séquences et de leur rapport aux temps de relaxation T1 et T2\* (qui eux-même varient en fonction de la concentration du produit de contraste).

De même que précédemment, les courbes de réhaussement peuvent être analysées de manière quantitative (voir paragraphe suivant sur la quantification) ou de manière semi-quantitative, à l'aide de paramètres dits « de synthèse ». Celles-ci présentent trois phases distinctes : la **pen**te ascendante (*upslope*), le **maximum de réhaussement** et la **clairance** (*washout*). Il est généralement admis que la pente ascendante dépend de la perfusion tissulaire et de la perméabilité, avec une prédominance de la perfusion. Le réhaussement maximum est relié à la prise de contraste dans le compartiment interstitiel (avec une contribution vasculaire additionnelle), tandis que le taux de clairance est associé à la diminution de la concentration tissulaire et donc fortement relié à la perméabilité capillaire. Les données natives peuvent être analysées directement ou bien débruitées à l'aide d'un ajustement par une fonction modèle type Freundlich (Sipola et al. 2003). L'aire initiale sous la courbe (*initial area under curve, IAUC*) représente également une méthode robuste et simple pour caractériser des régions présentant différentes caractéristiques hémodynamiques (Evelhoch 1999). Cependant, l'aire sous la courbe, de même que la plupart des paramètres de synthèse, n'a pas de relation simple avec les paramètres d'intérêt (perfusion, perméabilité et volume de distribution) et peut être par conséquent difficile d'interprétation. Néanmoins, ces paramètres restent une bonne option dans beaucoup de situations cliniques (Padhani 2003).

### 2.1.2. Quantification des paramètres de perfusion et de perméabilité

**Cas d'un traceur non-diffusible** (typiquement chélate de gadolinium standard dans le cerveau en présence d'une barrière hémato-encéphalique intacte) :

La modélisation la plus couramment utilisée est celle de « **boîte noire** » : le tissu est modélisé comme un système dynamique ayant une entrée (artérielle) et une sortie (veineuse) uniques. On fait l'hypothèse d'un système stationnaire, linéaire et invariant et on note  $h(t)$  la réponse impulsionnelle du système (sortie du système si l'entrée est un signal instantané d'amplitude 1) :

$$C_v(t) = C_a(t) \otimes h(t) \quad [12]$$

$C_v(t)$  : concentration de gadolinium à l'instant  $t$  dans la veine (en mM)

$C_a(t)$  : concentration de gadolinium dans l'entrée artérielle à l'instant  $t$  (en mM)

$h(t)$  : fonction de transport ou réponse impulsionnelle (sans unité)

$\otimes$  : produit de convolution

Par ailleurs, la conservation de la masse donne :

$$\frac{d}{dt} C_i(t) = \rho \cdot F_t \cdot (C_a(t) - C_v(t)) \quad [13]$$

$C_t(t)$  : concentration de gadolinium à l'instant  $t$  dans le tissu (en mM)

$F_t$  : débit sanguin régional (ml/min/100g de tissu)

$\rho$  : masse volumique du tissu (g/ml)

En combinant les équations [12] et [13], on obtient :

$$\frac{d}{dt} C_t(t) = \rho \cdot F_t \cdot C_a(t) \otimes (\delta(t) - h(t)) \quad [14]$$

Ce qui donne :

$$C_t(t) = \rho \cdot F_t \cdot C_a(t) \otimes \left( 1 - \int_0^{\infty} h(\tau) \cdot d\tau \right) \quad [15]$$

On définit la fonction résidu (produit de contraste toujours dans le tissu à l'instant  $t$ ) :

$$R(t) = 1 - \int_0^{\infty} h(\tau) \cdot d\tau \quad [16]$$

Et on obtient :

$$C_t(t) = \rho \cdot F_t \cdot C_a(t) \otimes R(t) \quad [17]$$

La plupart des auteurs font l'hypothèse que la masse volumique du tissu est égale à 1 g/ml, c'est pourquoi le paramètre  $\rho$  disparaît souvent de l'équation [17].

Dans le cas d'une **analyse monocompartmentale**, on aboutit à la même expression formelle, mais avec une hypothèse de monoexponentielle décroissante pour la fonction résidu. On a :

$$C_t(t) = fPV \cdot C_v(t) \quad [18]$$

$fPV$  : fraction volumique plasmatique ou volume sanguin régional (en pourcentage ou ml/100g de tissu soit ml/100ml de tissu avec l'hypothèse  $\rho = 1$ g/ml).

Les équations [13] et [18] donnent :

$$\frac{d}{dt} C_t(t) + \frac{F_t}{fPV} \cdot C_t(t) = \rho \cdot F_t \cdot C_a(t) \quad [19]$$

C'est une équation différentielle du premier ordre qui se résout classiquement. La solution de l'équation sans second membre est :

$$C_t(t) = A \cdot e^{-\frac{F_t}{fPV} \cdot t} \quad [20]$$

Pour obtenir la solution générale, on utilise la méthode de la variation de la constante :

$$\frac{d}{dt} A(t) = \rho \cdot F_t \cdot C_a(t) \cdot e^{\frac{F_t}{fPV} \cdot t} \quad [21]$$

ce qui donne, après intégration par partie et avec  $C_t(t) = 0$  à  $t = 0$  :

$$A(t) = \rho \cdot F_t \cdot \int_0^t C_a(\tau) \cdot e^{\frac{F_t}{fPV} \cdot \tau} \cdot d\tau \quad [22]$$

D'où la solution de l'équation [19] :

$$C_t(t) = \rho \cdot F_t \cdot \int_0^t C_a(\tau) \cdot e^{-\frac{F_t}{fPV}(t-\tau)} \cdot d\tau \quad [23]$$

Ce qui équivaut à :

$$C_t(t) = \rho \cdot F_t \cdot C_a(t) \otimes e^{-\frac{F_t}{fPV}t} \quad [24]$$

D'après le **théorème du volume central**, le temps de transit moyen  $MTT$  (en s) est lié au débit et au volume sanguin régional comme suit :

$$MTT = \frac{fPV}{F_t} \quad [25]$$

Finalement, on obtient :

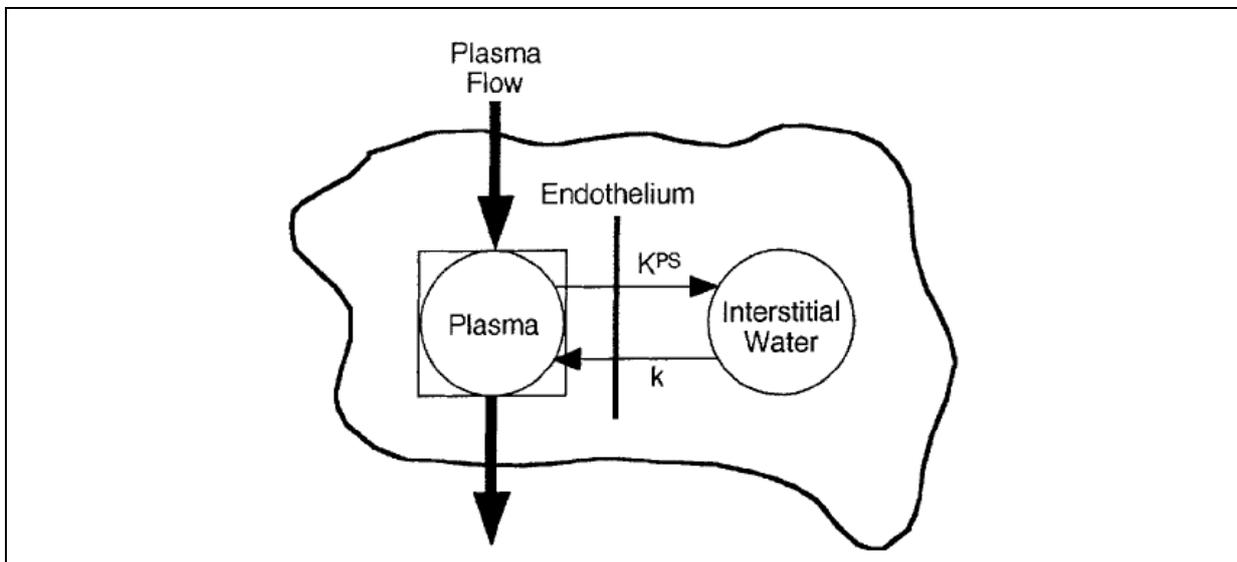
$$C_t(t) = \rho \cdot F_t \cdot C_a(t) \otimes e^{-\frac{t}{MTT}} \quad [26]$$

Ce qui revient bien à l'équation [17], en posant :

$$R(t) = e^{-\frac{t}{MTT}} \quad [27]$$

**Cas d'un traceur diffusible** (typiquement chélate de gadolinium standard hors du cerveau) :

La modélisation la plus courante est **bicompartimentale bidirectionnelle**, avec un compartiment représentant le secteur vasculaire et un compartiment représentant le secteur interstitiel (Figure 9).



**Figure 9- Modèle pharmacocinétique à deux compartiments**

Modèle décrivant la cinétique des échanges de produit de contraste entre le plasma et l'espace interstitiel. Le paramètre  $K^{PS}$  (ml/min/100g) représente le coefficient de transfert endothélial et le paramètre  $k$  (/min) représente le taux de reflux du produit de contraste de l'interstitium vers le plasma. La boîte autour du compartiment plasmatique indique que la clairance plasmatique est forcée par une fonction modèle (monoexponentielle décroissante). Reproduit de (Daldrup et al. 1998).

La contribution du traceur intravasculaire à la concentration tissulaire totale est négligée dans la plupart des approches (Tofts et al. 1999). La variation de la concentration tissulaire dans le temps est alors décrite par l'équation différentielle suivante (Daldrup et al. 1998) :

$$\frac{d}{dt} C_t(t) = \rho \cdot K^{PS} \cdot C_a(t) - k \cdot C_t(t) \quad [28]$$

$C_t(t)$  : concentration de gadolinium à l'instant  $t$  dans le tissu (en mM)

$C_a(t)$  : concentration de gadolinium dans l'entrée artérielle à l'instant  $t$  (en mM)

$K^{PS}$  : coefficient de transfert endothélial (en ml/min/100g)

$k$  : taux de reflux (en /min)

$\rho$  : masse volumique du tissu (g/ml)

En fait, le produit de contraste ayant une distribution plasmatique (extracellulaire), plusieurs auteurs ont préféré utiliser dans cette équation la concentration plasmatique plutôt que la concentration artérielle :

$$C_a(t) = C_p(t) \cdot (1 - Hct) \quad [29]$$

$C_a(t)$  : concentration de gadolinium dans l'entrée artérielle à l'instant  $t$  (en mM)

$C_p(t)$  : concentration de gadolinium à l'instant  $t$  dans le plasma (en mM)

$Hct$  : taux d'hématocrite (en pourcentage)

Dans une tentative de standardiser toutes les notations, Tofts et al (Tofts et al. 1999) ont suggéré d'utiliser la constante de transfert endothélial  $K^{trans}$  (en /min/100g de tissu) plutôt que le coefficient de transfert endothélial  $K^{PS}$ , définie par :

$$K^{trans} = \rho \cdot K^{PS} \cdot (1 - Hct) \quad [30]$$

et de noter  $k_{ep}$  le taux de reflux, qui peut être relié à  $K^{trans}$  par :

$$k_{ep} = \frac{K^{trans}}{ve} \quad [31]$$

$ve$  : volume extravasculaire extracellulaire (en pourcentage ou ml/ml de tissu)

Cela a pour avantage de simplifier l'écriture de l'équation [28] :

$$\frac{d}{dt} C_t(t) = K^{trans} \cdot C_p(t) - k_{ep} \cdot C_t(t) \quad [32]$$

La solution de cette équation en terme d'intégrale de convolution avec  $C_t(t) = 0$  à  $t = 0$  est donnée par :

$$C_t(t) = K^{trans} \cdot C_p(t) \otimes e^{-k_{ep} \cdot t} \quad [33]$$

Si la modélisation compartimentale est la plus répandue, l'approche par **boîte noire** peut tout à fait être appliquée ici. Il n'est pas alors nécessaire de faire d'hypothèse sur l'allure de la fonction résidue (Jerosch-Herold et al. 2004) :

$$C_t(t) = K^{trans} \cdot C_p(t) \otimes R(t) \quad [34]$$

Une hypothèse simplificatrice consiste à considérer un **modèle bicompartimental monodirectionnel** (le reflux du produit de contraste du compartiment interstitiel vers le compartiment vasculaire est supposé négligeable pendant le temps de l'expérimentation). Enfin, pour prendre en compte la contribution intravasculaire, il faut utiliser un modèle plus complexe (St Lawrence and Lee 1998) :

$$\begin{cases} C_i(t) = ve \cdot C_e(t) + fPV \cdot C_p(t) \\ \frac{d}{dt} C_e(t) = k_{ep} \cdot (C_p(t) - C_e(t)) \end{cases} \quad [35]$$

### Interprétation de $K^{trans}$

Le modèle de perméabilité de Renkin-Crone relie  $K^{PS}$  au débit sanguin régional  $F_t$  :

$$K^{trans} = \rho \cdot K^{PS} = \rho \cdot F_t \cdot E \cdot (1 - Hct) \quad [36]$$

où  $E$  est la fraction d'extraction du produit de contraste :

$$E = 1 - e^{-\frac{PS}{F_t \cdot (1 - Hct)}} \quad [37]$$

avec  $PS$  qui représente le produit surface-perméabilité (en ml/min/100g de tissu), une grandeur permettant d'estimer la perméabilité capillaire. C'est le rapport entre le débit sanguin régional plasmatique et le produit perméabilité-surface qui va déterminer si  $K^{PS}$  est une approximation de la perméabilité capillaire ou de la perfusion tissulaire (Tofts et al. 1999) :

- **Transport limité par la perméabilité (*permeability-limited*) :**

Si le débit sanguin tissulaire est très grand par rapport au produit surface-perméabilité :

$$F_t \gg PS, \text{ alors } E \rightarrow \frac{PS}{F_t \cdot (1 - Hct)} \text{ et } K^{trans} \rightarrow \rho \cdot PS \quad [38]$$

$K^{trans}$  donne dans ce cas une estimation de la perméabilité capillaire. Par exemple, dans le cas d'un **agent de contraste macromoléculaire**, le transport est limité par la perméabilité et la constante de transfert endothélial mesurée à l'équilibre est une approximation de la perméabilité capillaire. En revanche, la mesure de la perméabilité capillaire à l'aide d'un chélate de gadolinium standard est davantage sujette à caution du fait de l'extravasation rapide du traceur dans l'espace interstitiel dès le premier passage (Brasch et al. 2002).

- **Transport limité par la perfusion (*perfusion-limited*) :**

A l'inverse, si le produit surface-perméabilité est très grand par rapport au débit sanguin tissulaire (modèle de Kety) :

$$PS \gg F_t, E \rightarrow 1 \text{ et } K^{trans} \rightarrow \rho \cdot F_t \cdot (1 - Hct) \quad [39]$$

$K^{trans}$  donne donc une estimation du débit sanguin régional. Cette approche a été validée en comparaison avec les microsphères radioactives pour la quantification de la perfusion myocardique chez le cochon en utilisant les **courbes de premier passage** d'un chélate de gadolinium standard (Jerosch-Herold et al. 2004).

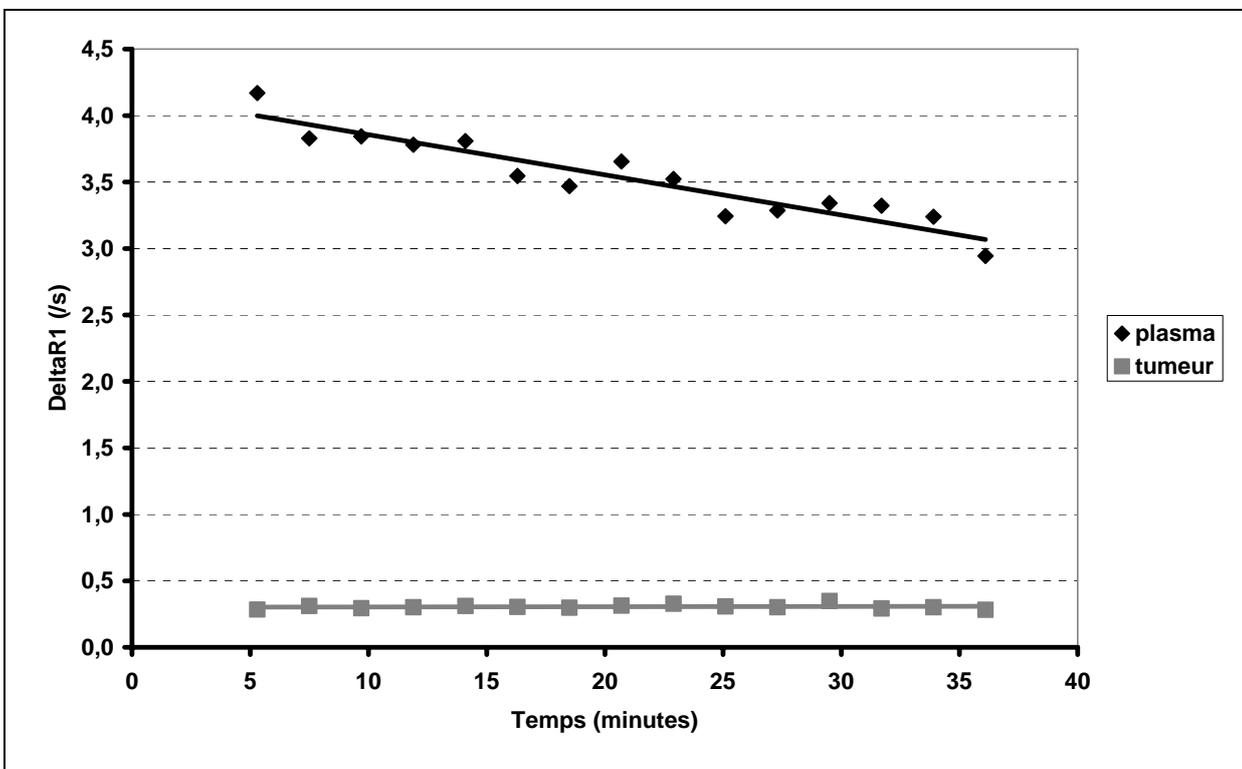
- **Cas intermédiaires :**

Dans les cas intermédiaires, il n'est pas possible d'interpréter  $K^{trans}$  en termes de perfusion ou de perméabilité capillaire. Il faut alors revenir à la définition initiale, c'est-à-dire une constante de transfert endothéliale entre le compartiment vasculaire et le compartiment interstitiel, dont la valeur dépend à la fois du produit perméabilité-surface et du débit sanguin régional. Seule une mesure indépendante de la perfusion (par exemple à l'aide de microsphères) permet à partir de la mesure de  $K^{trans}$  d'estimer le taux d'extraction  $E$  (Equation [37]) (Daldrup et al. 1998).

### Premier passage vs phase d'équilibre

L'acquisition des données pour la mesure de la **perfusion** est réalisée pendant le **premier passage** du produit de contraste. La mesure de la **concentration plasmatique** se fait nécessairement dans une **artère**, avec une résolution temporelle inférieure ou égale à la seconde afin d'obtenir un échantillonnage suffisant pour mesurer le pic. Dans le cas d'un traceur diffusible, il est possible d'utiliser l'équation [34] pour estimer la perfusion, à condition d'être dans un régime limité par la perfusion.

L'acquisition des données pour la mesure de la **perméabilité capillaire**, contrairement à la perfusion, est réalisée à **la phase d'équilibre** (après le premier passage). Par conséquent, la cadence d'acquisition des images n'a pas besoin d'être aussi rapide que pour l'imagerie de perfusion, et ce d'autant moins que l'agent de contraste présente un poids moléculaire élevé (car son extravasation est d'autant plus lente). De plus, avec un produit de contraste macromoléculaire, la mesure de la **concentration plasmatique** peut être réalisée dans une **veine** à la place d'une artère, puisque les courbes sont à l'équilibre et que le nombre de molécules diffusant dans l'espace interstitiel est faible. Un exemple de quantification à l'équilibre à l'aide d'un produit de contraste macromoléculaire dans une tumeur du sein implantée chez le rat est donné *Figure 9*.



**Figure 10- Variations de  $\Delta R1$  dans le plasma et dans le tissu tumoral**

Le modèle utilisé pour l'ajustement est monodirectionnel ( $k=0$ ). Les paramètres obtenus dans ce cas particulier sont :  $fPV = 4$  ml/100g et  $K^{trans} = 37$  /min/100g. Données de l'auteur, acquises au CPMI (directeur Pr Brasch).

### 2.1.3. Entrée artérielle

L'entrée artérielle doit répondre à plusieurs critères afin d'être utilisable pour la quantification de la perfusion (Conturo et al. 2005). Dans un premier temps, le signal de l'entrée artérielle doit avoir une relation linéaire avec la concentration de gadolinium dans le sang, ou bien il doit être possible de le convertir dans une grandeur qui varie linéairement avec la concentration. Un autre impératif est que le facteur de conversion reliant le signal à la concentration soit le même pour l'entrée artérielle et pour le tissu, ou bien qu'il existe un moyen de mettre à l'échelle ces facteurs de conversion. De plus, la linéarité de la relation et le facteur de conversion doivent être valables pour toute une gamme de taux d'hématocrite, puisqu'il existe une grande variabilité ce taux chez les volontaires sains (en particulier en fonction du sexe) et chez les patients.

Dans un deuxième temps, une grande précision dans la mesure de l'entrée artérielle est nécessaire, afin de minimiser la propagation d'erreurs dans la procédure de déconvolution. Ainsi, le signal de l'entrée artérielle doit présenter un rapport signal-sur-bruit (*SNR*) élevé pendant le premier passage du bolus. Cette exigence est particulièrement contraignante, parce que l'IRM est une modalité dont le *SNR* est en général limité, et que les autres critères nécessaires à une mesure fiable de l'entrée artérielle ont pour conséquence de diminuer le *SNR*. Les autres critères sont : une résolution spatiale suffisante pour résoudre la lumière de l'artère en minimisant les effets de volume partiel, une résolution temporelle suffisante pour échantillonner le premier passage du bolus, l'absence de saturation ou de repli de spectre (*aliasing*). La saturation fait référence à une sous-réponse du signal RM à de fortes concentrations de gadolinium, tandis que le repli de spectre se réfère à une erreur de positionnement des intensités de signal. Ces deux effets limitent la gamme de concentration à l'intérieure de laquelle la relation entre le signal RM et la concentration est linéaire. Enfin, l'entrée artérielle doit être mesurée avec la plus petite dispersion et le délai le plus court entre l'entrée artérielle mesurée et la véritable entrée artérielle vascularisant le tissu.

Mesurer l'entrée artérielle est l'une des étapes les plus difficiles et l'une des sources d'erreur les plus grandes, car nombre des critères définis ci-dessus se contredisent. Par exemple, les techniques avec une résolution spatiale élevée ont typiquement un faible rapport signal-sur-bruit et une résolution temporelle médiocre. De même, l'obtention d'une résolution temporelle élevée se fait au détriment du rapport signal-sur-bruit et de la résolution spatiale. De plus, la possibilité de résoudre la lumière artérielle est améliorée avec l'utilisation de larges artères, telles que la carotide interne pour le cerveau, plutôt que de petites artères, telles que l'artère sylvienne ou ses branches. Cependant, une entrée artérielle mesurée dans une petite artère aura moins de dispersion et de délai. A ma connaissance, il n'existe pas actuellement de consensus pour le choix de l'entrée artérielle, y compris pour le cerveau. Le développement d'algorithmes permettant la détermination d'une entrée artérielle fiable reste un domaine de recherche très actif (Ellinger et al. 2000; Knutsson et al. 2004; Conturo et al. 2005; Kotys et al. 2007; Brunecker et al. 2008).

#### **2.1.4. Méthodes de déconvolution**

Plusieurs méthodes ont été proposées pour déconvoluer l'équation [17] et ainsi estimer les paramètres de perfusion. On distingue deux sortes d'approche : l'approche modèle-dépendante et l'approche modèle indépendant.

##### **Approche modèle-dépendante**

Une expression analytique est choisie pour décrire la fonction résidue  $R(t)$ . Le modèle le plus courant est la fonction monoexponentielle (équation [27]), basée sur l'analyse en équations différentielles (Ostergaard et al. 1996a; Ostergaard et al. 1996b; Padhani et al. 2000). La fonction de Fermi a également été utilisée avec succès pour modéliser la fonction résidue dans le cas d'un traceur diffusible (Neyran et al. 2002; Jerosch-Herold et al. 2004). Les paramètres de perfusion sont déterminés à l'aide d'une optimisation non linéaire pour obtenir le meilleur ajustement des données au modèle (méthode des moindres carrés).

##### **Approche modèle-indépendante**

Pour la méthode modèle-indépendante, l'équation [17] est résolue à l'aide de la transformée de Fourier inverse (Ostergaard et al. 1996a; Ostergaard et al. 1996b) ou de techniques algébriques, telles que la décomposition en valeurs singulières (*Singular Value Decomposition, SVD*) (Ostergaard et al. 1996a; Ostergaard et al. 1996b) ou encore le modèle autorégressif ARMA (Neyran et al. 2002; Jerosch-Herold et al. 2004), en utilisant une forme discrétisée de l'équation.

##### **Choix de la méthode de quantification**

Le choix de la méthode de quantification dépend de l'étude envisagée et doit être défini en fonction des hypothèses de la modélisation, du rapport signal-sur-bruit de la séquence, de l'existence ou non d'un retard entre les courbes d'entrée artérielle et de sortie tissulaire (les différentes méthodes étant plus ou moins robustes au bruit et aux retards), etc. Pour la quantification de la perfusion cérébrale à l'aide de la technique DSC-MRI, la méthode de déconvolution *SVD* est généralement admise comme la plus fiable (Ostergaard et al. 1996a).

## 2.2. Travaux de recherche

### 2.2.1. Perfusion pulmonaire

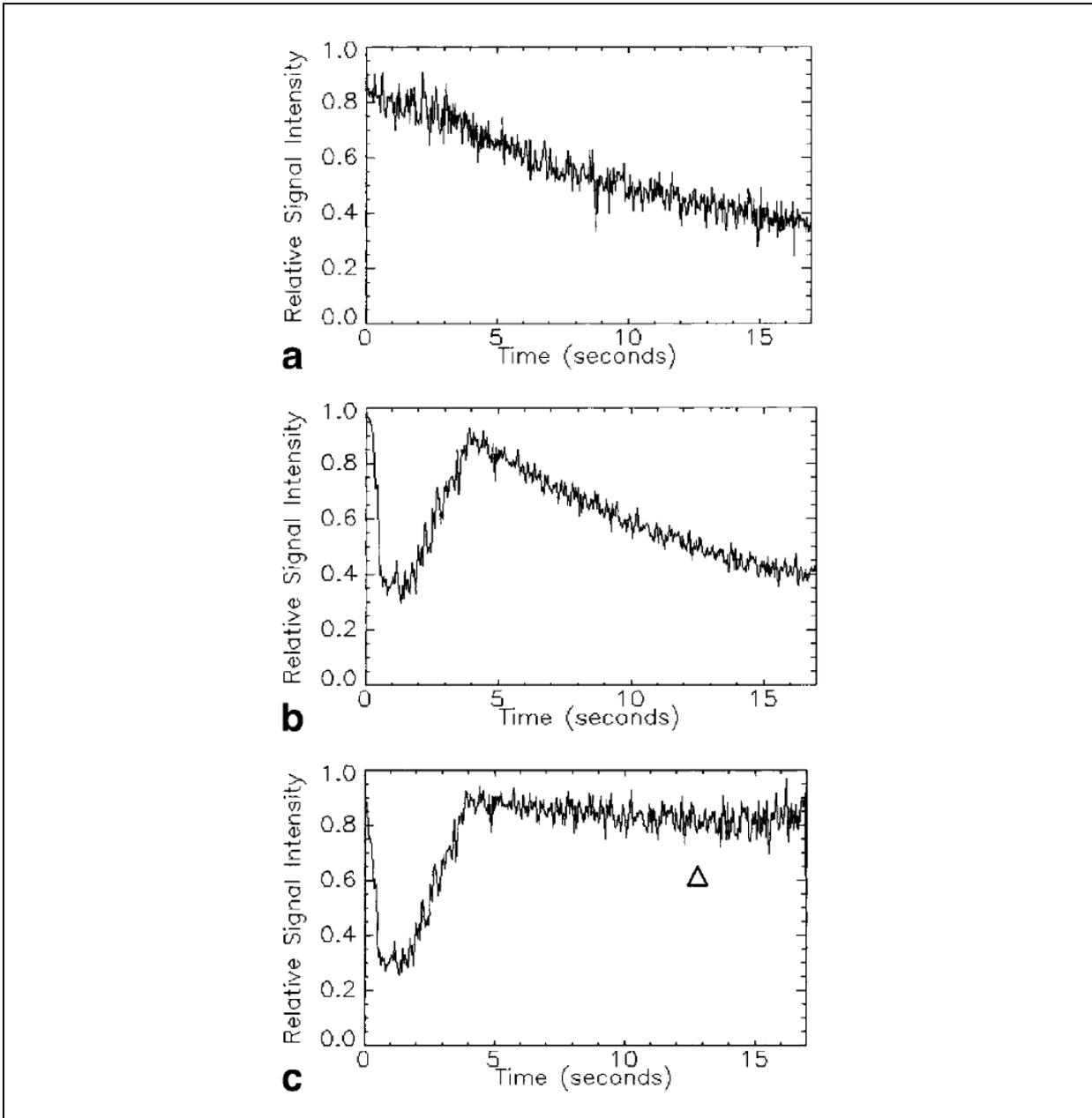
L'étude du poumon en IRM est peu développée, en raison de difficultés inhérentes au parenchyme pulmonaire. Non seulement la densité en protons du poumon est faible, mais en plus les différences de susceptibilité magnétique au niveau des alvéoles entraînent des temps de relaxation transversaux T2 et T2\* extrêmement courts. Le signal disponible est donc particulièrement faible et il décroît très rapidement. L'utilisation de temps d'écho très courts permet néanmoins de recueillir un signal pulmonaire. Les images ainsi obtenues sont fortement pondérées T1, donc très sensibles aux agents paramagnétiques.

Au cours de mon stage de DEA (1996-1997), j'ai évalué une nouvelle technique ultra-rapide d'IRM de perfusion pulmonaire. L'objectif de l'étude était d'évaluer de manière qualitative (visuelle) et quantitative l'apport diagnostique de la technique d'IRM dynamique avec injection de produit de contraste, chez des patients pour lesquels il existait une suspicion clinique de déficit de perfusion pulmonaire, soit en raison d'une embolie pulmonaire, soit en raison d'un emphysème. Les examens ont été effectués sur l'aimant 1,5T de l'hôpital neuro-cardiologique (Vision, Siemens, Erlangen, Germany). Une série dynamique de 10 images par niveau de coupe a été acquises en apnée ou en respiration lente, avec une antenne à polarisation circulaire *phased-array*, à l'aide d'une séquence écho de gradient Turbo-FLASH pondérée T1, précédée d'une inversion-récupération : TR/TE 3,3/1,4 ms ; TI 400 ms ; angle de bascule 20° ; champ de vue : 25 x 25 cm<sup>2</sup> ; matrice : 128 x 128 ; épaisseur de coupe : 15 mm ; 6 coupes coronales. La résolution temporelle était de 4,8 s (durée totale de l'acquisition : 48 s). Un chélate de gadolinium conventionnel (Magnevist, Shering, Berlin, Allemagne) a été injecté manuellement en bolus, à la dose de 0,1 mmol/kg.

La lecture en aveugle des séquences IRM par trois radiologues indépendants en comparaison avec une méthode de référence, la scintigraphie pulmonaire, a montré une bonne concordance entre les deux examens pour la détection visuelle des déficits de perfusion (Berthezene et al. 1999). Spécifiquement, mon travail a consisté à extraire des paramètres fonctionnels à partir des courbes tissulaires de premier passage de l'agent de contraste. L'intérêt diagnostique d'une telle approche s'est révélée limitée, principalement en raison des facteurs antinomiques mis en jeu entre l'analyse visuelle et l'analyse quantitative : l'amélioration de l'analyse quantitative passe en effet par la diminution de la dose de l'agent de contraste (pour éviter les effets de saturation du signal) et par l'amélioration de la résolution temporelle (égale à 4,8 secondes dans cette étude), qui ne peut se faire qu'au détriment de l'analyse visuelle en diminuant le rapport signal-sur-bruit (c'est-à-dire de la qualité de l'image) et le nombre de coupes (c'est-à-dire du recouvrement du poumon). La technique d'IRM de perfusion pulmonaire apparaissait donc comme un outil diagnostique prometteur, bien que limité dans ce cas précis à une approche qualitative.

Cependant un déficit de perfusion n'est cependant pas spécifique d'une embolie pulmonaire. Le couplage avec une technique permettant l'évaluation de la ventilation, comme par exemple l'IRM des gaz hyperpolarisés, est nécessaire. Par la suite, mon expertise dans la modélisation des courbes d'IRM de perfusion a été mise à contribution pour le développement par Magalie Viallon d'une technique IRM de mesure conjointe de la ventilation et de la perfusion pulmonaire chez le rat, en couplant l'utilisation d'Hélium 3 hyperpolarisé et l'injection en bolus de SPIO (SBPA, Bracco Research, Geneva, Switzerland (Pochon et al. 1997)) (Viallon et al. 2000). Cette étude a été effectuée sur l'aimant 2T/12-cm (Oxford, UK) du laboratoire de RMN (UMR CNRS 5012). Une série dynamique comprenant 40 images par coupe était enregistrée pendant une apnée respiratoire après inhalation du gaz hyperpolarisé, avec une antenne accordée sur la fréquence de résonance de l'<sup>3</sup>He, à l'aide de l'acquisition spiralee de l'espace des *k* : TE 1,76 ms ; 12 spirales de 1024 échantillons ; temps d'acquisition d'une image : 240 ms ; champ de vue 10,4 x 10,4 cm<sup>2</sup> ; épaisseur de coupe : 20 mm, 1 coupe axiale. La résolution temporelle était de 0,5 s

(durée totale de l'acquisition : 20 secondes). L'injection en bolus des SPIO entraîne une augmentation du déphasage des spins nucléaires d' $^3\text{He}$  situés à proximité des vaisseaux. Cela se traduit sur l'image par une chute transitoire du signal RM lors du premier passage des SPIO (Figure 11).



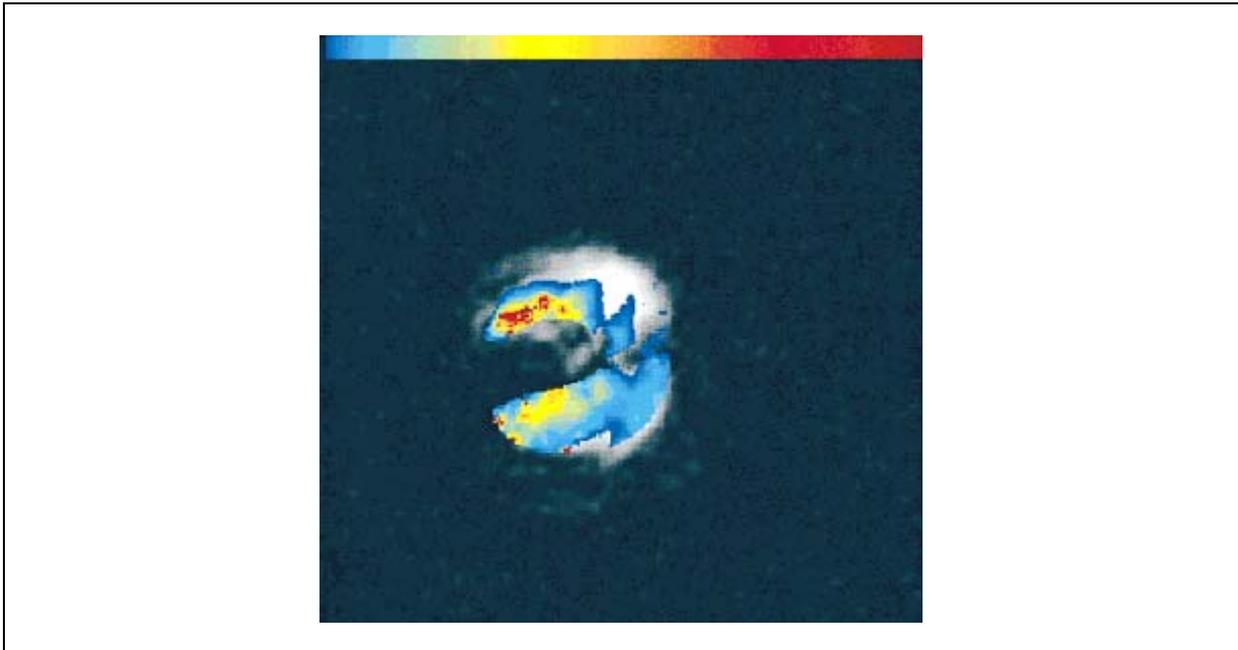
**Figure 11- Evolution du signal RM de l'hélium 3 dans les poumons d'un rat**

a) Courbe de référence. La diminution du signal est due à la combinaison de différents mécanismes : les effets d'entrée et de sortie de coupe des spins nucléaires polarisés, la relaxation due aux interactions spin-réseau, et la dépolarisation due à l'impulsion RF ; b) Courbe obtenue après injection de SPIO. Noter la chute de signal correspondant au premier passage du bolus ; c) Même courbe que b) après corrections des effets de l'impulsion RF. La tête de flèche montre une diminution tardive de signal, probablement liée à la recirculation du produit de contraste. Reproduit de (Viallon et al. 2000)

Les courbes obtenues après correction des signaux RM peuvent ensuite être modélisées pour estimer la perfusion pulmonaire. Nous avons mesuré un paramètre facilement quantifiable et représentatif du volume sanguin régional  $rBV$ , couramment utilisé pour l'analyse des courbes de perfusion cérébrale :

$$rBV = \int_{\text{premier passage}} \ln \frac{S(\tau)}{S(0)} \cdot d\tau \quad [40]$$

L'analyse pixel à pixel a permis de reconstruire des cartographies de volume sanguin relatif et de mettre en évidence un désaccord (*mismatch*) de ventilation/perfusion chez des rats présentant une embolie pulmonaire (Figure 12).



**Figure 12- Cartographie de volume sanguin pulmonaire chez un rat**

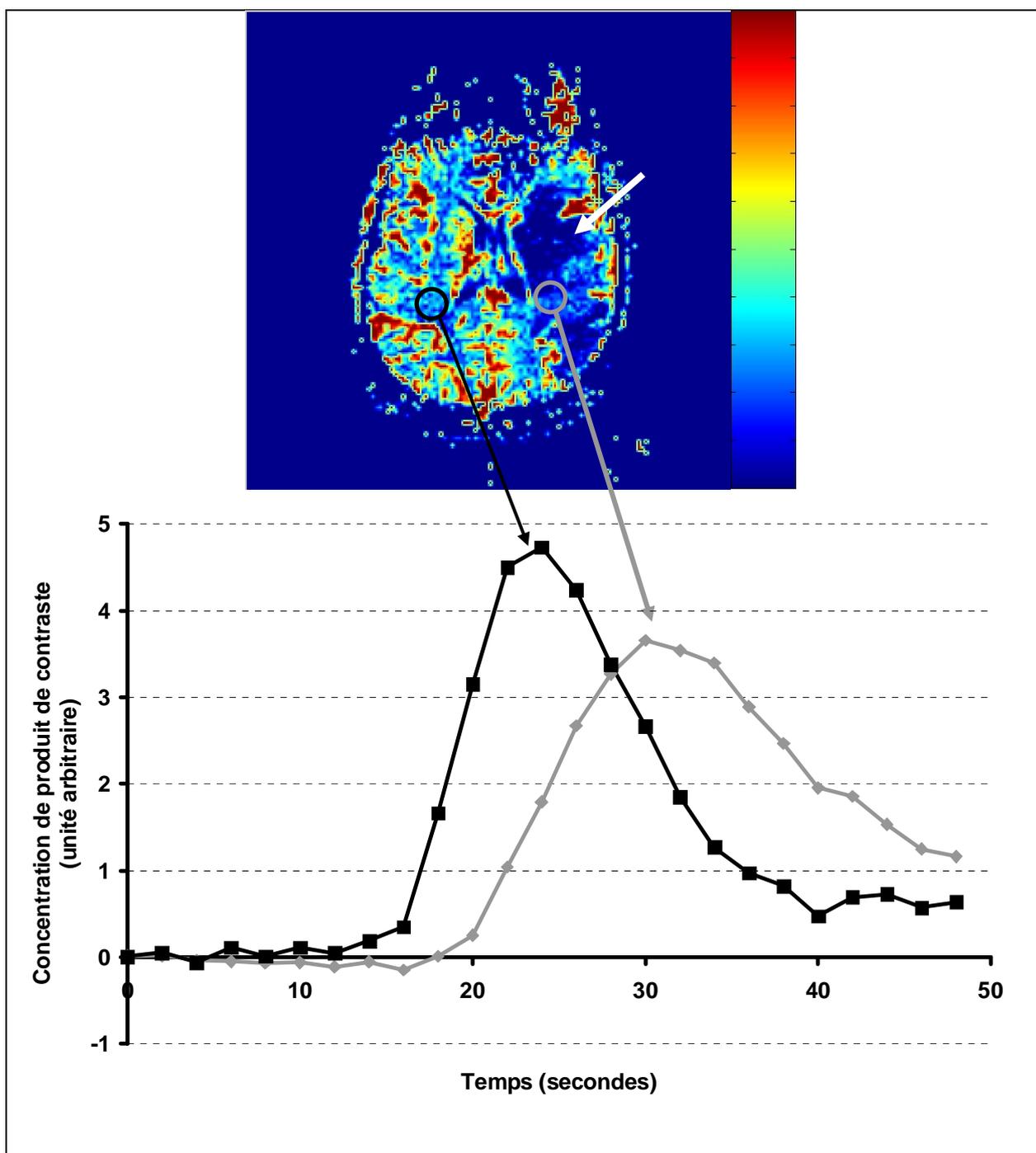
*La cartographie en fausse couleur (les valeurs de volume sanguin régional sont croissantes du bleu au rouge) est superposée sur une des images pré-contraste en Hélium 3 (en niveaux de gris) montrant la distribution du gaz dans les poumons. Dans le poumon droit (le plus bas dans l'image), la cartographie de volume correspond bien à l'image de ventilation. Dans le poumon gauche (le plus haut dans l'image), un désaccord entre l'image de ventilation et l'image de perfusion apparaît en raison d'un déficit de perfusion causé par l'injection d'une bulle d'air. Reproduit de (Viallon et al. 2000)*

Il est à présent possible d'étudier la ventilation pulmonaire chez l'homme en IRM à l'aide d'inhalation d<sup>3</sup>He (Wang et al. 2008). Bien que la translation clinique de cette approche soit encore actuellement limitée, l'étude de la fonction pulmonaire (ventilation / perfusion) à l'aide de l'IRM pourraient avoir de nombreuses applications pour le diagnostic et le suivi de traitement.

### **2.2.2. Perfusion cérébrale**

Le cerveau est l'organe pour lequel la modélisation de la perfusion en IRM est la plus avancée, en raison de conditions facilitant l'analyse des courbes de premier passage : pas de mouvement et pas de diffusion des produits de contraste conventionnels en raison de la barrière hématoencéphalique. Néanmoins de nombreux problèmes subsistent concernant la quantification absolue (mesure de la perfusion en ml/min/100g de tissu), notamment dans le cas des pathologies ischémiques, où les modèles physiologiques ne sont plus valides.

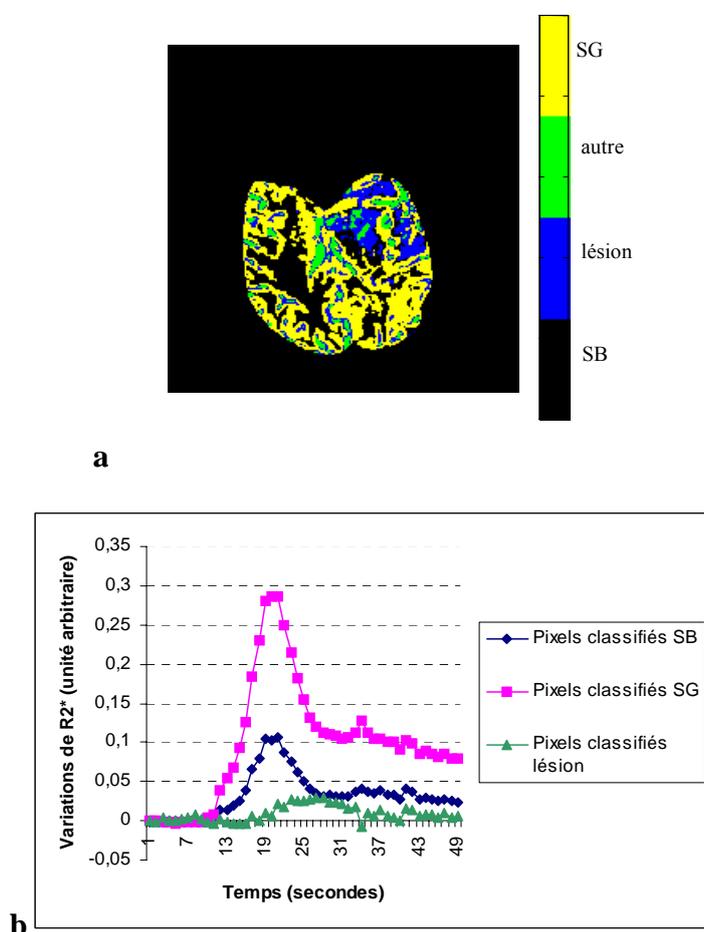
Dans le cadre de ma thèse (1997-2000), j'ai développé et validé une méthode de post-traitement des images de perfusion cérébrale acquises à l'aide de l'IRM dynamique de premier passage, dédiée à l'étude de l'ischémie cérébrale (Figure 13). La mesure d'une entrée artérielle fiable, pré-requis nécessaire à la quantification absolue, s'est révélée difficile avec les données acquises en clinique, notamment en raison des effets de volume partiel et des effets de saturation du signal dans les artères corticales. C'est pourquoi j'ai proposé de normaliser les résultats avec les paramètres de perfusion mesurés dans le cervelet. Le modèle mathématique que j'ai développé, basé sur l'ajustement des courbes de concentration par une fonction de type gamma, permet d'obtenir les caractéristiques de la courbe nécessaires à l'extraction des paramètres de perfusion (aire sous la courbe, premier moment de la courbe) de manière analytique. Une série de mesures réalisée chez des patients présentant une sténose serrée unilatérale de la carotide interne, au repos et sous stimulation pharmacologique, a permis de mettre en évidence la vulnérabilité à l'ischémie des zones jonctionnelles entre deux territoires vasculaires chez ces patients à plus haut risque d'infarctus cérébral (Wiert et al. 2000).



**Figure 13- Cartographie de perfusion cérébrale chez l'homme**

Cartographie obtenue chez un patient présentant une chute de débit suite à un accident vasculaire cérébral (flèche blanche). Echelle de couleur en unités arbitraires, allant du bleu au rouge pour des valeurs croissantes de perfusion. Le graphe sous la cartographie représente les variations de concentration de produit de contraste obtenues à partir des images RM natives de premier passage dans une région saine (en noir) et dans une région ischémique (en gris). Noter la diminution du pic et l'élargissement de la courbe dans la région lésée.

Dans les études précédentes, les paramètres de perfusion ont été mesurés dans des régions d'intérêt, dessinées par un opérateur sur la séquence d'images de perfusion pour chacune des coupes de l'examen. Cette étape est chronophage et dépendante de l'opérateur. Une segmentation automatique des régions d'intérêt permettrait d'isoler les pixels appartenant à des régions de perfusion homogène (par exemple dans le cas du cerveau : substance blanche et substance grise) et d'effectuer des mesures globales dans chacun de ces tissus, voire d'adapter la modélisation à un tissu donné. Au cours de notre thèse, nous avons par suite développé une méthode de segmentation des images RM basée sur la perfusion cérébrale (Wuart et al. 2001). Nous avons proposé l'utilisation d'un modèle linéaire autorégressif couramment utilisé dans le domaine du traitement du signal, le modèle ARMA, pour modéliser les réponses tissulaires de la substance blanche et de la substance grise saines, puis nous avons défini un critère de similarité pour classifier tous les pixels de l'image. Cette méthode a été validée chez des volontaires sains en calculant le rapport de perfusion substance blanche:substance grise et en comparant avec les valeurs de la littérature (valeur obtenue en moyenne pour 6 volontaires :  $2,1 \pm 0,2$ , à comparer avec  $1,9 \pm 0,5$  (Rempp et al. 1994)). Elle a de plus donné des résultats encourageants chez les patients, avec la mise en évidence de la lésion ischémique (Figure 14).



**Figure 14- Segmentation basée sur la perfusion obtenue à l'aide de cartographies de similarité et courbes de premier passage correspondantes**

a) Image segmentée en 4 couleurs : substance blanche (SB) en noir, substance grise (SG) en jaune, lésion en bleu, autres tissus (liquide céphalo-rachidien, vaisseaux) en vert ; b) Courbes de premier passage moyennes dans les régions définies ci-dessus.

La limite principale de la méthode de segmentation est que le choix de l'entrée artérielle et des sorties tissulaires (substance blanche, substance grise) pour la construction du modèle de départ doit être effectué par un opérateur. La sélection de l'entrée ne pose pas trop de problème dans la mesure où une visualisation de la série en boucle (affichage dynamique) permet d'identifier les régions qui s'assombrissent le plus, et qui correspondent aux vaisseaux. De plus, le choix d'une entrée artérielle est également nécessaire si l'on souhaite quantifier les paramètres de perfusion. La sélection de la sortie est plus critique. D'un côté, les images natives ne permettent pas de différencier la substance blanche de la substance grise. Une connaissance anatomique est par conséquent nécessaire pour choisir les pixels sur l'une des images de la série de perfusion dans la substance grise et dans la substance blanche. D'un autre côté, les pixels de référence dans la substance blanche et dans la substance grise ne doivent pas se situer dans une région pathologique ou dans une région présentant un effet de volume partiel (contenant à la fois de la substance grise et de la substance blanche par exemple). De plus, ces pixels doivent être choisis dans différentes régions du cerveau (hémisphères droit et gauche, régions frontales et pariétales), afin de ne privilégier aucune particularité spatiale. Finalement, bien que la segmentation soit effectivement automatique, la construction des modèles s'est avérée très chronophage (choix des pixels de référence) et vraisemblablement opérateur-dépendant (bien que cela n'ait pas été testé). C'est la raison il n'a pas été possible de généraliser cette approche à grande échelle.

A notre connaissance, il n'existe pas dans la littérature de méthode validée permettant de faire l'économie de l'étape de tracer des régions d'intérêt pour l'analyse des données d'IRM de perfusion. L'idée d'utiliser la séquence de perfusion pour segmenter les régions présentant une perturbation hémodynamique est séduisante, car elle évite le problème du recalage avec les images d'une autre séquence (particulièrement difficile en raison des distorsions de l'image engendrées par la séquence EPI). Cependant, les difficultés rencontrées sont les mêmes que pour la reconstruction des cartographies de perfusion : faible rapport signal-sur-bruit pour l'analyse pixel à pixel (en particulier dans les régions ischémiques), hétérogénéité de la perfusion cérébrale, mise en jeu de phénomènes d'auto-régulation complexes rendant difficile le choix d'un bon critère pour définir une perturbation hémodynamique (par exemple l'arrivée du produit de contraste peut être simplement retardée du fait du recrutement de la circulation collatérale), absence d'information anatomique... Les recherches actuelles dans ce domaine s'orientent plutôt vers des méthodes de classification non supervisées basées sur l'analyse factorielle (Chou et al. 2007), l'algorithme espérance-maximisation (Wu et al. 2007), le *clustering* (regroupement) (Wismuller et al. 2006), ou encore de l'analyse en composantes indépendantes (Kao et al. 2003).

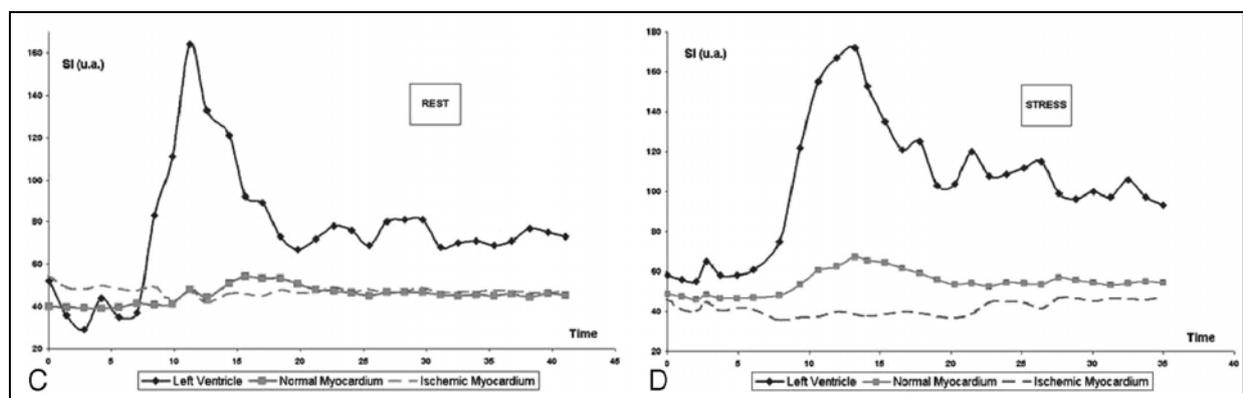
En tant que membre de l'équipe de recherche *Ischémie cérébrale* du laboratoire Creatis (pendant ma thèse en 1997-2000, puis à mon retour en France en 2002), j'ai également contribué à l'analyse des images de perfusion et de diffusion dans le parenchyme cérébral pour des études IRM cliniques menées par mes collègues médecins. Ces travaux ont permis de valider le rôle de l'IRM pour la détection de déficits de perfusion dans les lésions sous-corticales (Nighoghossian et al. 1999) et de définir les principales variables IRM prédictives du pronostic clinique. Deux facteurs majeurs sont significatifs : le siège de l'occlusion artérielle (Derex et al. 2004a) et son impact hémodynamique en regard des paramètres IRM indicatifs de la perfusion cérébrale. En outre, une approche originale et globale de l'ensemble des paramètres prédictifs de la transformation hémorragique (IRM et cliniques) a été effectuée (Hermier et al. 2003a; Hermier et al. 2003b; Derex et al. 2004b; Derex et al. 2005). Ces travaux ont également précisé les limites du concept de désaccord de perfusion-diffusion classiquement prédictif du pronostic clinique chez les patients traités par thrombolyse (Nighoghossian et al. 2001). Enfin, la réversibilité partielle des anomalies de diffusion a été mise en évidence dans le cadre de la thèse de sciences de Jean-Baptiste Pialat (Pialat et al. 2005).

### 2.2.3. Perfusion myocardique

Dans le myocarde, les contraintes liées à l'organe (mouvement, atténuation importante du signal, diffusion hors du secteur vasculaire des produits de contraste conventionnels) rendent la quantification de la perfusion particulièrement difficile. L'utilisation d'agents de contraste pré-cliniques à longue rémanence vasculaire conduit à une modélisation plus simple, comme pour le cerveau (Neyran et al. 2002). J'ai donc naturellement été amenée à collaborer avec l'équipe *Ischémie myocardique* de Creatis, en particulier Emmanuelle Canet et Bruno Neyran, dans le cadre de la thèse de Sabin Carme (2000-2003). L'objectif de la thèse était d'améliorer l'interprétation clinique de l'IRM de perfusion myocardique, en situation d'acquisition clinique chez le cochon, les acquisitions ayant été réalisées au repos et sous stimulation pharmacologique, avec une mesure simultanée des débits myocardiques par une méthode de référence : les microsphères radioactives.

Les examens ont été réalisés sur l'aimant 1,5T de l'hôpital neuro-cardiologique (Vision, Siemens, Erlangen, Germany). Une série dynamique de 60 images par niveau de coupe a été acquise en apnée, avec une antenne à polarisation circulaire *phased-array*, à l'aide d'une séquence écho de gradient Turbo-FLASH pondérée T1, précédée d'une saturation-récupération : TR/TE 2,4/1,2 ms ; TI 176 ms ; angle de bascule 8° ; champ de vue : 18,8 x 30 cm<sup>2</sup> ; matrice : 256 x 256 ; épaisseur de coupe : 8 mm ; 2 coupes « petit axe » (basale et mi-ventriculaire). La résolution temporelle était de 2 s (avec synchronisation sur l'EEG, durée totale de l'acquisition : 120 s). Le produit de contraste CMD-A2-Gd-DOTA (Guerbet, Aulnay-sous-bois, France), un polymère carboxyméthyl-dextran substitué avec le complexe macrocyclique Gd-DOTA, présente une relaxivité élevée ( $R_1=9,4$  mM/s à 60 Hz dans l'eau à 37°C) et la pharmacocinétique d'un agent de contraste intravasculaire (Canet et al. 2000). Il a été injecté en bolus, à la dose de 0,009 mmol/kg. Une série de 10 images avec des temps d'inversion variant de 20 à 3000 ms avait été acquise à l'aide de la même séquence avant l'injection du produit de contraste, afin de quantifier le T1 pré-contraste, et par la suite de transformer les variations de signal en variations de relaxivité  $\Delta R_1(t)$ .

La Figure 15 montre les courbes typiquement obtenues pour le tissu sain et ischémié. La lecture en aveugle par deux radiologues indépendants des séquences IRM de premier passage et des cartes paramétriques issues de la modélisation ARMA (Neyran et al. 2002) a montré la supériorité de l'approche quantitative en terme de concordance inter-observateur et de précision (Carme et al. 2006). Il existait de plus une forte corrélation entre la mesure quantitative du débit sanguin régional avec l'IRM et avec les microsphères radioactives (Carme et al. 2006).



**Figure 15- Courbes de premier passage pour la mesure de la perfusion myocardique**

Courbes obtenues dans le ventricule gauche (trait plein noir), dans le myocarde sain (trait plein gris) et dans le myocarde ischémiée (trait pointillé gris), au repos (à gauche) et sous stress pharmacologique (à droite). Reproduit de (Carme et al. 2006).

L'étude précédente a été réalisée en faisant l'hypothèse implicite d'un échange rapide entre les molécules d'eau du compartiment vasculaire et du compartiment extravasculaire. Dans ce cas, même si l'agent de contraste demeure intravasculaire, il raccourcit le T1 de l'espace extravasculaire, car les molécules d'eau ayant « vu » l'agent paramagnétique dans le vaisseau diffusent dans l'espace extravasculaire avant la mesure du signal RM. Il est possible de minimiser la dépendance du signal RM avec les échanges d'eau en optimisant les paramètres de la séquence (Donahue et al. 1997; Jerosch-Herold et al. 1999; Judd et al. 1999; Bjornerud et al. 2003; Vallee et al. 2003). Par exemple, un temps d'inversion court ( $TI < 100$  ms) va laisser peu de temps aux molécules d'eau pour diffuser d'un compartiment à l'autre, rendant la mesure relativement échange-indépendante (Lombardi et al. 1999). Cependant, un temps d'inversion court diminue considérablement la dynamique de réhaussement tissulaire lors du premier passage, et compromet par conséquent l'analyse des données. A l'inverse, l'utilisation d'un temps d'inversion relativement long, tel que celui adopté dans le cadre de cette étude ( $TI = 176$  ms), pourrait perturber les mesures de T1 tissulaire. Nous avons donc par la suite entrepris d'évaluer les effets des échanges d'eau entre les compartiments intravasculaire et extravasculaire sur la quantification absolue du débit sanguin régional myocardique (Wiert et al. 2006).

Le taux d'échange entre les espaces intravasculaires et extravasculaires,  $1/\tau$ , est défini par :

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_b} + \frac{1}{\tau_e} \quad [41]$$

$\tau_b$  : temps de résidence moyen des molécules d'eau dans le compartiment intravasculaire (c'est-à-dire dans le sang, comprenant à la fois le plasma et les érythrocytes, en faisant l'hypothèse d'un échange rapide entre ces deux sous-compartiments (Donahue et al. 1997))

$\tau_e$  : temps de résidence moyen des molécules d'eau dans le compartiment extravasculaire (comprenant l'espace interstitiel et l'espace intracellulaire, en faisant l'hypothèse d'un échange rapide entre ces deux sous-compartiments également (Donahue et al. 1997)).

Le taux d'échange entre les espaces intravasculaire et extravasculaire, en soit, est constant. Cependant, il est qualifié de « rapide », « intermédiaire » ou « lent », en comparaison avec la différence de taux de relaxation entre les deux compartiments. Soit  $T_{1b}$  le temps de relaxation longitudinale dans le sang («  $b$  » pour *blood*) et  $T_{1e}$  le temps de relaxation longitudinale dans l'espace extravasculaire («  $e$  » pour *extravascular*), on définit comme suit trois régimes d'échange :

$$(i) \text{ Echange rapide } \frac{1}{\tau} \gg \left| \frac{1}{T_{1b}} - \frac{1}{T_{1e}} \right|$$

Le tissu relaxe avec une seule constante de temps,  $1/T_{1t}$ , égale à la somme des taux de relaxation de chaque compartiment, pondérée par leurs fractions volumiques respectives (Donahue et al. 1997) :

$$\frac{1}{T_{1t}} = \frac{fBV}{T_{1b}} + \frac{1-fBV}{T_{1e}} \quad [42]$$

$$(ii) \text{ Echange intermédiaire } \frac{1}{\tau} \approx \left| \frac{1}{T_{1b}} - \frac{1}{T_{1e}} \right|$$

Quand les échanges d'eau sont plus lents, les espaces intravasculaire et extravasculaire relaxent avec des constantes de temps séparées. La description de la magnétisation résultante est complexe, mais peut être approximée par le modèle d'échange entre deux sites, c'est-à-dire en ajoutant aux équations de Bloch un terme prenant en compte les échanges d'eau (Larsson et al. 2001) :

$$\frac{dM_b(t)}{dt} = \frac{M_{0b} - M_b(t)}{T_{1b}} - \frac{M_b(t)}{\tau_b} + \frac{M_e(t)}{\tau_e},$$

$$\frac{dM_e(t)}{dt} = \frac{M_{0e} - M_e(t)}{T_{1e}} - \frac{M_e(t)}{\tau_e} + \frac{M_b(t)}{\tau_b} \quad [43]$$

$M(t)$  : magnétisation à l'instant  $t$

$M_0$  : magnétisation à l'équilibre

Indice «  $b$  » pour *blood*

Indice «  $e$  » pour *extravascular*

$$(iii) \text{ Pas d'échange } \frac{1}{\tau} \ll \left| \frac{1}{T_{1b}} - \frac{1}{T_{1e}} \right|$$

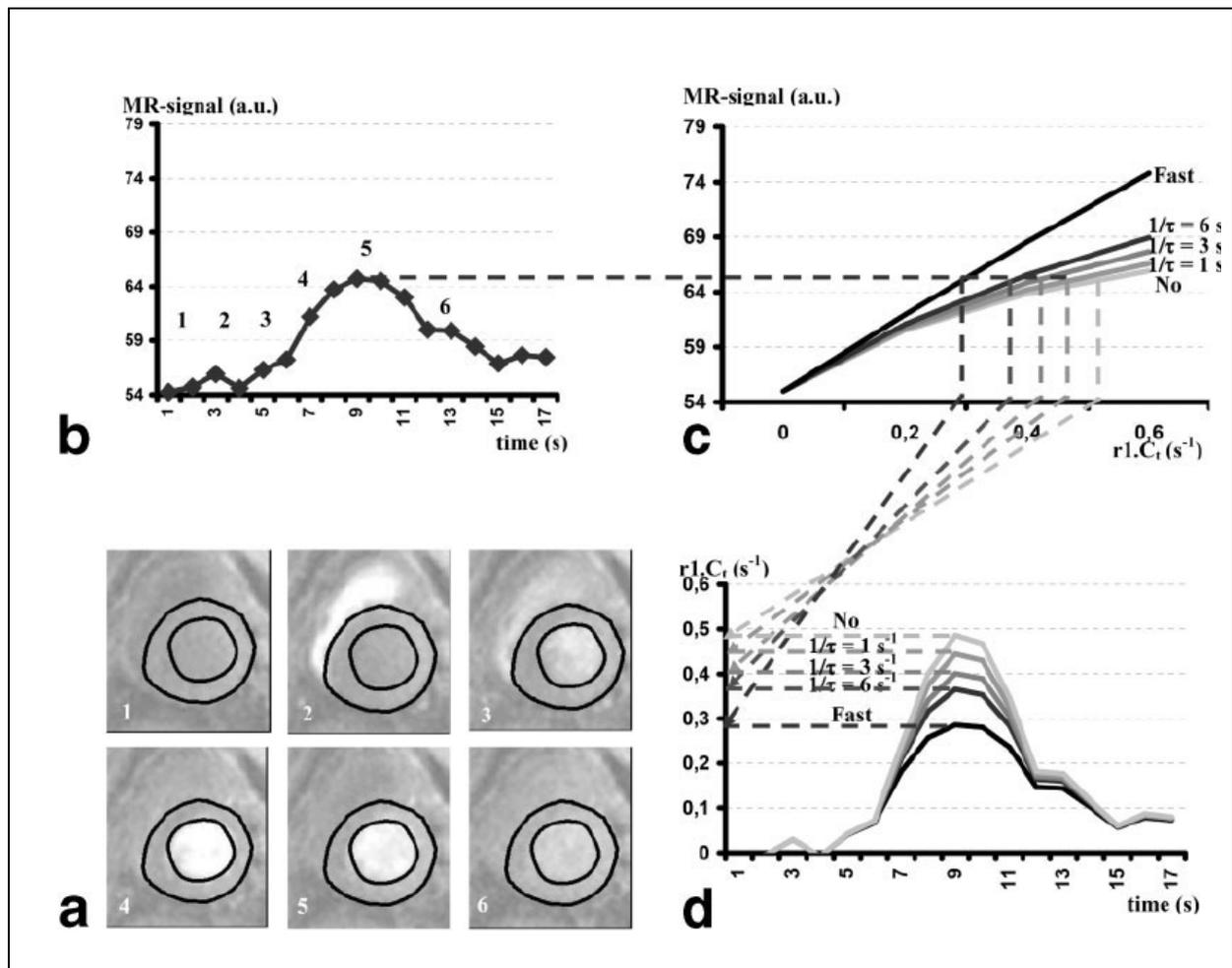
S'il n'y a pas d'échanges d'eau pendant la durée de l'acquisition, le tissu va relaxer avec deux constantes de temps distinctes. Le signal RM peut être décrit comme la somme du signal RM provenant de deux compartiments, pondérée par leurs fractions volumiques respectives (Larsson et al. 2001) :

$$S = fBV \cdot S(T_{1b}) + (1-fBV) \cdot S(T_{1e}), \quad [44]$$

La Figure 16 montre un exemple de conversion des variations de signal RM suite à l'injection en bolus de l'agent de contraste intravasculaire en concentration tissulaire de gadolinium, pour différents taux d'échange.

Les résultats obtenus ont montré que l'hypothèse d'échanges rapides (utilisée dans l'étude précédente) était la mieux adaptée au protocole mis en œuvre, c'est-à-dire aux conditions cliniques. Cependant, en termes absolus, la mesure IRM du débit sanguin régional était sur-estimée de 40% par rapport à la mesure réalisée avec les microsphères radioactives. Cette sur-estimation du débit sanguin régional peut s'expliquer en partie par deux facteurs. D'une part, une sous-estimation du signal de l'entrée artérielle au pic pourrait se produire du fait de la non-linéarité de la relation entre le  $\Delta R1$  et la concentration de produit de contraste à fortes concentrations. Des prélèvements sanguins réalisés dans la carotide toutes les 2 secondes pendant le premier passage du produit de contraste ont montré qu'il existait une bonne concordance entre les  $\Delta R1(t)$  mesurées à l'IRM et les concentrations artérielles effectives (Wiat et al. 2006), ce qui limite la portée de cet argument. D'autre part, il a été montré, aussi bien sur des données simulées que sur des données expérimentales de cœur isolé, que la méthode de déconvolution ARMA utilisée dans cette étude entraînait une sur-estimation du débit sanguin régional pour des valeurs de débit inférieures à 250 ml/min/100g (Neyran et al. 2002). Cependant, cette même étude a démontré que la méthode ARMA était plus robuste au bruit que la méthode SVD ou que les méthodes analytiques de déconvolution (Neyran et al. 2002), d'où le choix de l'utiliser malgré ses limites.

Par ailleurs, la mesure IRM de la réserve de perfusion étaient sous-estimée de 25% par rapport à la mesure réalisée avec les microsphères radioactives, dans l'hypothèse la plus favorable d'un régime d'échange rapide. Là encore, plusieurs hypothèses peuvent être avancées. D'abord, l'administration d'une deuxième dose d'agent de contraste (étude sous stress pharmacologique), environ 60 minutes après l'injection de la première dose (étude au repos), pourrait entraîner une saturation du signal au pic dans l'entrée artérielle sous stress, en raison de la longue rémanence vasculaire de l'agent de contraste, donc une sous-estimation de la perfusion sous stress et une sous-estimation de la réserve de perfusion. Ensuite, nous avons fait l'hypothèse que le taux d'échange ne changeait pas entre les conditions de repos et de stress. En fait, les échanges d'eau sont plus lents sous stress qu'au repos, en raison de la vasodilatation engendrée par les conditions hémodynamiques de stress. Par conséquent, la perfusion sous stress pourrait être sous-estimée du fait de la sur-estimation du taux d'échange. Enfin, la variation du régime d'échange d'eau dans le temps et le long des capillaires n'a pas été pris en compte, pour des raisons évidentes de simplification.



**Figure 16- Conversion des variations de signal RM en variations de concentration en fonction du régime d'échange d'eau dans le myocarde**

a) Images de premier passage dans le myocarde (contouré en noir) : 1. Image pré-contraste ; 2. Arrivée du produit de contraste dans le ventricule droit ; 3. Arrivée du produit de contraste dans le ventricule gauche ; 4. et 5. Passage du produit de contraste dans le myocarde ; et 6. Clairance. b) Variation dans le temps du signal RM moyen dans le myocarde en unités arbitraires. Les chiffres 1 à 6 renvoient aux étapes décrites en a). c) Signal RM en fonction de  $R1$  pour différents échanges d'eau, du régime rapide (Fast) au régime sans échange (No), en passant par des taux échanges réalistes pour le myocarde : 6, 3 et 1 Hz. d) Variation dans le temps de la concentration dans le myocarde obtenue pour chacun des régimes d'échange d'eau. Reproduit de (Wuart et al. 2006).

Dans les protocoles cliniques, il n'est pas toujours possible de consacrer du temps à l'acquisition de données permettant la quantification du  $T1$  pré-contraste. Nous avons donc parallèlement évalué les conséquences de travailler avec le signal RM à la place du  $\Delta R1$ . Pour cela, nous avons fait l'hypothèse d'échanges d'eau rapides, conformément aux résultats précédents. L'approche basée sur la mesure du signal RM repose sur l'hypothèse d'une relation de linéarité entre le signal RM et le  $\Delta R1$ , justifiée théoriquement comme suit. L'équation de la séquence Turbo-FLASH est donnée par :

$$S(T_1) = \Omega \cdot M_0 \cdot \left[ \left( 1 - e^{-\frac{TR}{T_1}} \right) \cdot \cos^{n-1} \alpha \cdot e^{-\frac{(n-1)TR}{T_1}} + \left( 1 - e^{-\frac{TR}{T_1}} \right) \cdot \frac{1 - \cos^{n-1} \alpha \cdot e^{-\frac{(n-1)TR}{T_1}}}{1 - \cos \alpha \cdot e^{-\frac{TR}{T_1}}} \right] \quad [45]$$

$\Omega$  : gain

$M_0$  : magnétisation à l'équilibre

$TI$  : temps d'inversion de la séquence

$\alpha$  : angle de bascule

$n$  : nombre de pas de codage de phase pour acquérir la moitié de l'espace des  $k$  ( $n = N_{phase}/2$ )

En faisant l'hypothèse que  $TR$  et  $TI$  sont très petits devant  $T_1$  :  $(n-1).TR \ll T_1$  et  $TI \ll T_1$ , l'équation [6] peut être approximée par :

$$S(T_1) = \Omega \cdot M_0 \cdot \left[ \left( TI \cdot \cos^{n-1} \alpha + TR \cdot \frac{1 - \cos^{n-1} \alpha}{1 - \cos \alpha} \right) \cdot \frac{1}{T_1} \right] \quad [46]$$

d'où il vient :

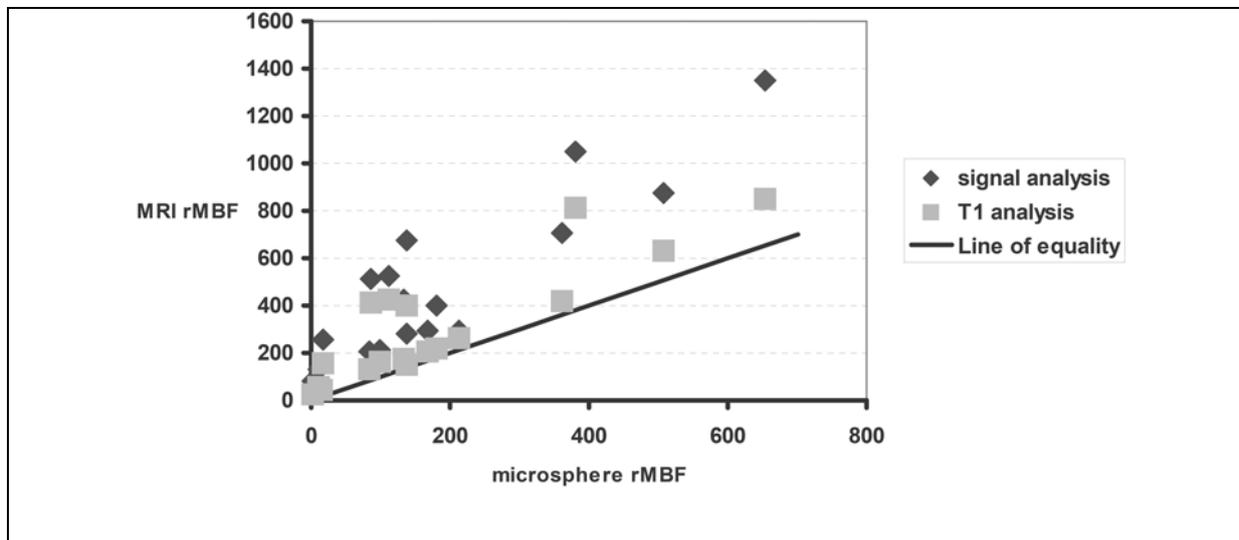
$$S(T_1) = c \cdot \frac{1}{T_1} \quad [47]$$

où  $c$  est une constante de proportionnalité. En combinant avec l'équation [10], on obtient :

$$C(t) = K \cdot (S(t) - S(0)) \quad [48]$$

où  $K$  est une constante de proportionnalité. Si l'équation [11] est valide, alors il n'est pas nécessaire de quantifier le  $T_1$  pré-contraste pour estimer la concentration.

La Figure 17 montre les valeurs de perfusion myocardique obtenues en estimant les variations de concentration de gadolinium avec le  $\Delta R_1$  ou avec le signal RM, en fonction des valeurs de référence (microsphères radioactives). On observe une sur-estimation des valeurs de débit sanguin régional myocardique obtenue par l'analyse en signal par rapport à l'analyse en  $\Delta R_1$ .



**Figure 17- Débit sanguin régional myocardique mesuré en IRM en fonction du débit mesuré avec les microsphères radioactives**

Débit sanguin régional myocardique obtenu à l'aide de l'analyse des données IRM en signal (losanges noirs) et en  $T_1$  (carrés gris), en faisant l'hypothèse d'échanges rapides. La droite représente la ligne d'égalité. Les valeurs obtenues avec l'analyse  $T_1$  sont sur-estimées par rapport aux valeurs obtenues avec les microsphères radioactives (résultat de la corrélation linéaire :  $Y=1,4.X$ ,  $R^2=0,69$ ), mais moins qu'avec l'analyse en signal (résultat de la corrélation linéaire :  $Y=2,2.X$ ,  $R^2=0,72$ ). Reproduit de (Wuart et al. 2006).

La linéarité de la relation entre le signal RM et le  $\Delta R1$  dépend du rapport entre le temps d'inversion  $TI$  et le temps de relaxation longitudinale  $T1$  ( $TI/T1 \ll 1$ ), et par conséquent de la dose d'agent de contraste. Le produit de contraste utilisé dans cette étude présente une relaxivité élevée et la dose utilisée a été sélectionnée afin d'obtenir un rapport contraste-sur-bruit suffisant pour la quantification absolue de la perfusion (Neyran et al. 2002). Au pic de concentration, le rapport  $TI/T1$  était de l'ordre de 0,35 dans le tissu, alors qu'il était proche de 1 dans le ventricule gauche. Ainsi, l'équation [11] n'était pas valide pour l'entrée artérielle, ce qui explique en grande partie la sur-estimation supplémentaire du débit sanguin régional lorsque l'analyse est faite en signal et pas en  $\Delta R1$ . L'analyse en signal fournit cependant des valeurs de perfusion, qui, bien que sur-estimées d'un facteur 2, sont bien corrélées avec les valeurs de la méthode de référence ( $R^2=0,72$ ). Par conséquent, cette approche représente une alternative acceptable lorsque la quantification du  $T1$  pré-contraste n'est pas une option.

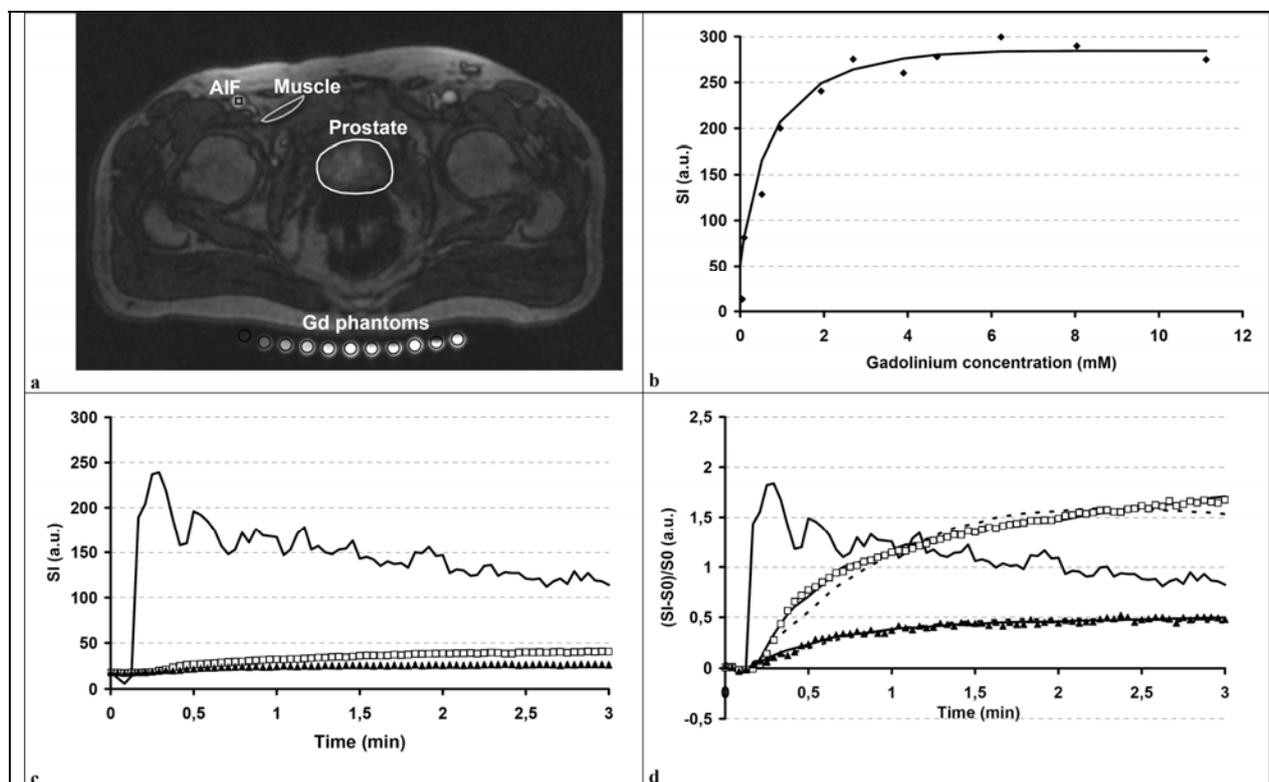
En conclusion, cette étude montre qu'il est possible de trouver un compromis entre analyse visuelle et quantitative pour la détection et la caractérisation des lésions ischémiques du myocarde. L'examen de la perfusion myocardique en IRM reste encore du domaine de l'investigation expérimentale et clinique. L'approbation pour l'application humaine de nouveaux agents de contraste spécifiques du secteur vasculaire est nécessaire pour l'évaluation clinique de l'approche quantitative présentée ci-dessus. Les nanoparticules de Fer pourraient jouer un rôle important dans ce contexte. En effet, leur effet  $T1$  a déjà été exploité chez l'homme pour étudier la perfusion hépatique à l'aide de l'IRM dynamique (Muller et al. 1998; Saito et al. 2005). Dans le cœur, des résultats encourageants ont été obtenus avec des SPIO chez le cochon, en comparaison avec les microsphères (Ludemann et al. 2007). Enfin, des travaux récents ont montré qu'il serait possible d'estimer la perfusion myocardique de manière fiable (en comparaison avec les microsphères radioactives chez le chien) à l'aide de chélates de gadolinium de petite taille, à condition d'utiliser un protocole et une modélisation adaptés : « double bolus » (un premier bolus de dose moindre pour la mesure de l'entrée artérielle et un deuxième de dose plus élevée pour la mesure tissulaire) et déconvolution analytique avec une fonction de Fermi (Christian et al. 2004).

#### **2.2.4. Perfusion prostatique**

Ce projet, initié en 2003 par le Pr Olivier Rouvière (service d'imagerie urinaire et vasculaire de l'hôpital Edouard Herriot, U556 Inserm) et Jean-Yves Chapelon (U556 Inserm), avait pour objectif de quantifier la perfusion prostatique chez des patients présentant un cancer de la prostate, avant traitement par Ablatherm (faisceau ultrasonore focalisé de très haute intensité induisant une nécrose tissulaire), afin d'explorer une relation éventuelle avec l'échec ou la réussite du traitement. Comme nous venons de le préciser, la quantification de la perfusion est difficile chez l'Homme hors du cerveau, en raison de l'extravasation des chélates de gadolinium de petite taille, dès le premier passage. Dans le cadre de cette étude, nous avons développé un modèle prenant en compte cette extravasation, et nous avons comparé les résultats obtenus avec les résultats de l'approche semi-quantitative et avec les résultats de la déconvolution analytique avec une fonction de Fermi (Wiar et al. 2007a). Les valeurs de la littérature ont été utilisées pour la validation, puisque nous ne disposons pas pour cette étude de méthode de référence.

Les examens ont été réalisés sur l'aimant 1,5T de l'hôpital Edouard Herriot (Symphony, Siemens, Erlangen, Germany). Une série dynamique de 75 images par niveau de coupe a été acquise avec une antenne à polarisation circulaire *phased-array*, à l'aide d'une séquence écho de gradient Turbo-FLASH pondérée  $T1$ , précédée d'une inversion-récupération : TR/TE 838/2,75 ms ; TI 500 ms ; angle de bascule  $10^\circ$  ; champ de vue : 24 x 38 cm<sup>2</sup> ; matrice : 160 x 256 ; épaisseur de coupe : 5 mm ; 3 coupes. La résolution temporelle était de 2,5 s (durée totale de l'acquisition : 187 s). Un chélate de gadolinium conventionnel (Dotarem, Guerbet, Aulnay-sous-bois, France) a été injecté en bolus à l'aide d'un injecteur automatique (Spectris MR injector, Medrad, Indianola, PA), à la dose de 0,1 mmol/kg. Le  $T1$  pré-contraste n'a pas été quantifié, mais une ceinture avec 11 fantômes de concentrations croissantes de gadolinium (0,05-11 mM) a été placée sous chaque patient pour vérifier la gamme de linéarité de la relation entre le signal RM et la concentration de gadolinium.

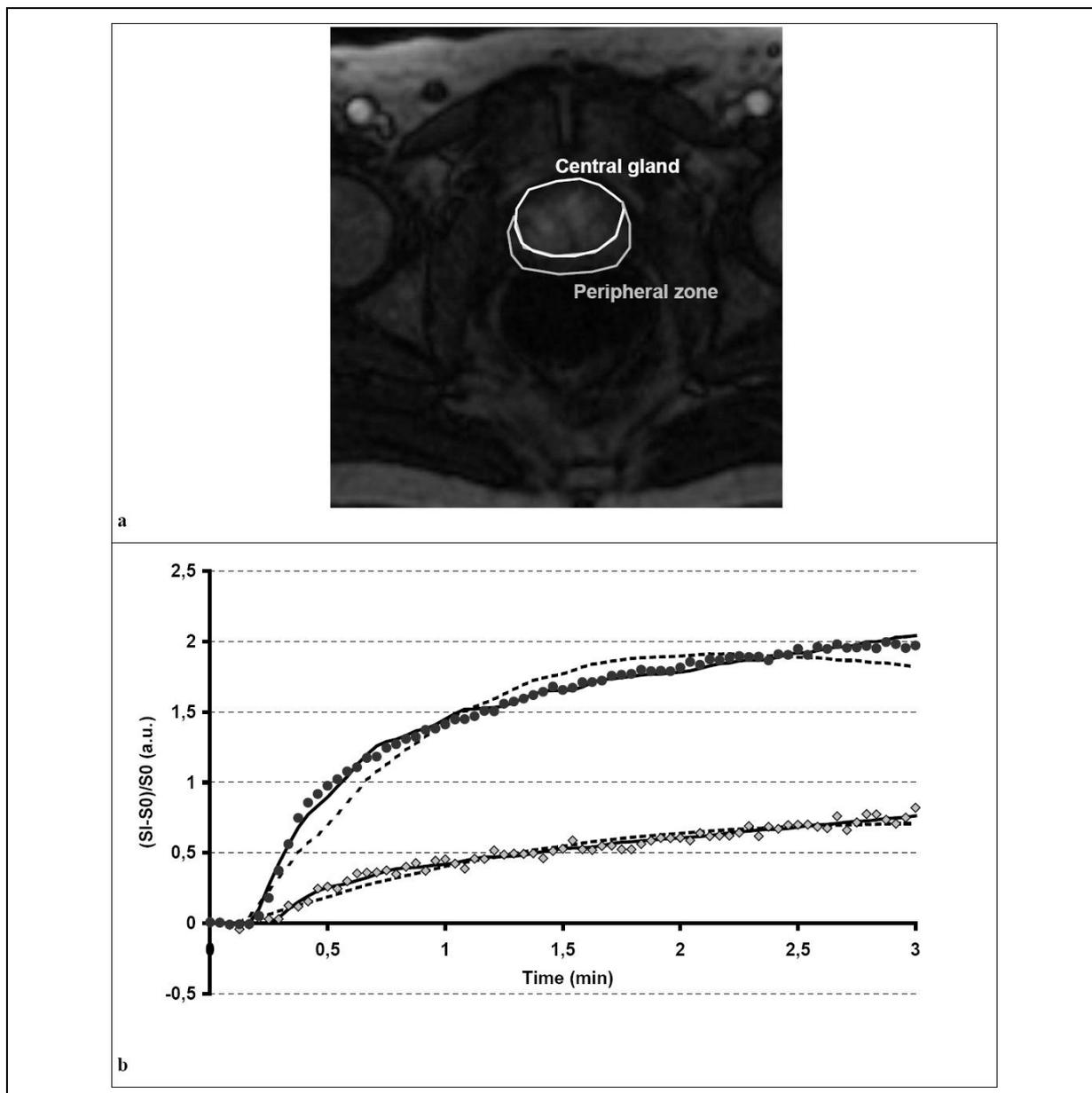
La Figure 18 présente les courbes de premier passage typiquement obtenues dans l'entrée artérielle (artère fémorale commune), la prostate et dans le muscle (pectiné), pris comme région de référence. Le signal RM était proportionnel à la concentration de gadolinium pour des valeurs comprises entre 0 et 200 (correspondant à une gamme de concentration de gadolinium de 0,05 à 1 mM), c'est-à-dire pour l'ensemble des valeurs rencontrées, à l'exception du pic de l'entrée artérielle (autour de 250). La concentration en gadolinium *in vivo* a été considérée proportionnelle à :  $\frac{S(t) - S(0)}{S(0)}$ .



**Figure 18- Courbes de premier passage pour l'étude de la perfusion prostatique : entrée artérielle, prostate et muscle**

a) Image transverse obtenue chez un patient avec la séquence dynamique pondérée T1 deux minutes après l'injection de gadolinium montrant le positionnement des régions d'intérêt ; b) Calibration entre le signal RM (SI) et les concentrations de gadolinium (Gd) dans les fantômes (losanges : données expérimentales, ligne pleine : ajustement des données basé sur l'équation de la séquence Turbo-FLASH) ; c) Variations de signal RM en fonction du temps dans l'entrée artérielle (AIF, ligne fine), la prostate (carrés) et le muscle (triangles) ; d) Réhaussement du signal par rapport à la ligne de base (S0) en fonction du temps : entrée artérielle (ligne fine, après division par un facteur 10), prostate (carrés) et muscle (triangles). La ligne pointillée représente l'ajustement des données après déconvolution analytique avec une fonction de Fermi et la ligne pleine avec le modèle MPC. Dans cet exemple, les paramètres de perfusion étaient les suivants : pour la prostate, la perfusion était de 6 ml/min/100g avec la technique Fermi et de 11 ml/min/100g avec la technique MPC ; pour le muscle, la perfusion était de 3 ml/min/100g avec la technique Fermi et de 3 ml/min/100g avec la technique MPC. Reproduit de (Wuart et al. 2007a).

Des régions d'intérêt ont de plus été dessinées dans deux sous-régions de la prostate : la glande prostatique centrale, et la zone périphérique, région moins vascularisée que la glande centrale dans les conditions normales (Figure 19).



**Figure 19- Courbes de premier passage pour la perfusion prostatique : glande centrale et zone périphérique**

a) Image transverse obtenue chez un patient avec la séquence dynamique pondérée T1 deux minutes après l'injection de gadolinium montrant le positionnement des régions d'intérêt ; b) Courbes de réhaussement correspondantes : glande centrale (cercles) et zone périphérique (losanges). La ligne pointillée représente l'ajustement des données après déconvolution analytique avec une fonction de Fermi et la ligne pleine avec le modèle MPC. Dans cet exemple, les paramètres de perfusion étaient les suivants : pour la glande centrale, la perfusion était de 7 ml/min/100g avec la technique Fermi et de 13 ml/min/100g avec la technique MPC ; pour la zone périphérique, la perfusion était de 2 ml/min/100g avec la technique Fermi et de 3 ml/min/100g avec la technique MPC. Reproduit de (Wiert et al. 2007a).

Trois approches différentes ont été mises en œuvre pour l'estimation de la perfusion :

(i) *Analyse semi-quantitative*

Deux indices de perfusion ont été calculés : la plus forte pente (pente maximale détectée dans la partie ascendante de la courbe tissulaire (Miles 1991)) et le gradient moyen (taux de réhaussement pendant les 3 premières minutes post-injection (Padhani et al. 2000)). Ces deux paramètres ont été normalisés par le pic de l'entrée artérielle afin de permettre les comparaisons inter-patients.

(ii) *Analyse quantitative : modèle de Fermi*

Cette approche a été décrite initialement pour la quantification de la perfusion myocardique à l'aide d'un agent de contraste conventionnel (Jerosch-Herold et al. 2004). Elle est basée sur un système de boîte noire, décrit par l'équation de base :

$$C_t(t) = \rho \cdot rPBF \cdot C_a(t) \otimes R(t) \quad [49]$$

$\otimes$  : produit de convolution

$C_t(t)$  : concentration de gadolinium à l'instant  $t$  dans le tissu (en mmol/l)

$C_a(t)$  : concentration de gadolinium à l'instant  $t$  dans l'entrée artérielle (en mmol/l)

$rPBF$  : débit sanguin régional prostatique (en ml/min/100g)

$R(t)$  : fonction résiduelle (réponse impulsionnelle) du système

$\rho$  : masse volumique de la prostate (approximée à 1 g/ml)

Pour la déconvolution de l'entrée artérielle avec la sortie tissulaire, la fonction résiduelle est modélisée par une fonction de Fermi :

$$R(t) = \frac{2}{1 + \exp\left[\frac{t - w}{\tau}\right]} \quad [50]$$

où  $\tau$  et  $w$  sont les paramètres à ajuster.

(iii) *Analyse quantitative : modèle MPC*

L'allure de la fonction de Fermi est bien adaptée pour décrire le transport tissulaire d'un agent de contraste intravasculaire. En cas de traceur diffusible, seule la partie ascendante de la courbe de premier passage (*wash-in*) doit être prise en compte. En effet, la différence dans l'allure des courbes de premier passage entre un agent de contraste intravasculaire et un agent de contraste extravasculaire est principalement due à l'extravasation de l'agent de contraste, qui se produit principalement après le pic. La partie ascendante de la courbe est donc plus sensible à la perfusion et elle peut être approximée par une fonction de Fermi, même dans le cas d'un traceur diffusible. Cependant, la perfusion prostatique qui est dix fois plus lente que la perfusion myocardique, et il est probable que l'extravasation se produise y compris lors de la partie ascendante de la courbe. Afin de prendre en compte les particularités de la perfusion prostatique, nous avons proposé la fonction résiduelle empirique suivante :

$$R(t) = a + b \cdot \exp\left(-\frac{t - w}{\tau}\right) \quad [51]$$

où  $a$ ,  $b$ ,  $\tau$  et  $w$  sont les paramètres à ajuster. Cette fonction tend vers une valeur non-nulle  $a$ , qui prend en compte l'accumulation du traceur dans le secteur extravasculaire pendant le temps de l'expérimentation (3 minutes), et néglige sa clearance (*wash-out*). Nous l'appellerons par la suite MPC (pour « monoexponentielle plus constante »).

Les résultats montrent que le gradient moyen est le paramètre semi-quantitatif le plus robuste au bruit parmi les deux paramètres explorés. Ce paramètre était pertinent pour l'analyse intra-patient : il permettait de mettre en évidence la différence de perfusion entre zone périphérique et glande centrale, en accord avec une étude IRM précédente (Padhani et al. 2000), et il fournissait un rapport de perfusion prostate:myocarde égal à 2,5, en accord avec le rapport obtenu par les méthodes quantitatives (voir ci-dessous). Cependant, ce paramètre n'était pas suffisamment sensible pour les comparaisons inter-patients. Par exemple, aucune différence significative n'a été détectée entre le groupe de patients traité par

hormonothérapie et le groupe de patients non traité, malgré la diminution de la perfusion engendrée par le traitement hormonal. Ce manque de sensibilité illustre bien les limites des paramètres semi-quantitatifs (y compris s'ils sont normalisés à l'aide d'une entrée artérielle) : en effet, ils ne permettent pas de s'affranchir de biais tels que les paramètres de l'acquisition (le gain par exemple) ou encore l'hémodynamique du patient au moment de l'acquisition (la fonction cardiaque par exemple).

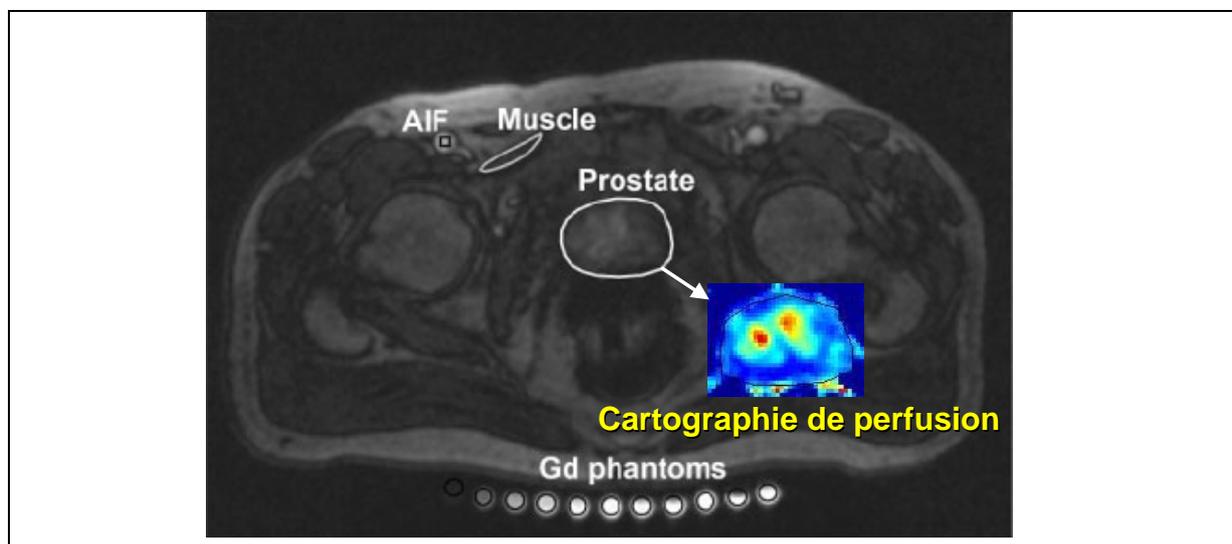
Les valeurs de débit sanguin régional les plus proches de celles de la littérature ont été obtenues grâce à la méthode MPC (moyenne pour les 48 patients) :  $5 \pm 3$  ml/min/100g dans le muscle (à comparer à  $4 \pm 1$  ml/min/100g obtenu en PET scan avec l'eau marquée  $H_2O^{15}$  (Paternostro et al. 1996)) et  $12 \pm 8$  ml/min/100g dans la prostate (à comparer avec  $16 \pm 8$  ml/min/100g obtenu en PET scan avec l'eau marquée  $H_2O^{15}$  (Inaba 1992)). La méthode de Fermi pour les mêmes régions d'intérêt donnait  $3 \pm 2$  ml/min/100g dans le muscle et  $8 \pm 5$  ml/min/100g dans la prostate (moyenne pour les 48 patients). Les deux méthodes ont montré une différence significative entre la perfusion de la glande centrale et la perfusion de la zone périphérique. En revanche, seule la méthode MPC a mis en évidence une différence significative de perfusion entre le groupe de patients traité par hormonothérapie et le groupe de patients non traité.

Cette approche présente plusieurs limites. D'abord, la relation de linéarité mesurée à l'aide de fantômes de gadolinium pourrait ne pas être valide *in vivo* en raison des échanges d'eau, ainsi que discuté dans le paragraphe précédent (perfusion myocardique). Ensuite se pose la question de la fiabilité de l'entrée artérielle. Il est généralement admis qu'un bon échantillonnage de l'entrée artérielle nécessite une résolution temporelle inférieure ou égale à 2 secondes, afin de ne pas manquer le pic de concentration. La séquence utilisée pour cette étude résulte comme toujours d'un compromis entre le rapport signal-sur-bruit, la résolution spatiale, le nombre de coupes, et la résolution temporelle – aboutissant ici à une cadence d'acquisition légèrement sous-optimale. De plus, le signal RM au pic pourrait être sous-estimé du fait de la non-linéarité de la relation entre le signal RM et la concentration de gadolinium au-delà d'une concentration égale à 1 mM. Enfin, une autre source d'erreur provient du fait que l'artère fémorale commune, où l'entrée artérielle a été échantillonnée, n'est pas une vraie entrée artérielle pour la prostate. Cependant, ces trois biais devraient engendrer une sur-estimation du débit sanguin régional prostatique, ce qui ne semble pas être le cas en comparaison avec la littérature.

Il existe également des limites aux modèles mathématiques utilisés. L'hypothèse implicite principale de nos modèles est que la diffusion de l'agent de contraste du plasma vers l'espace interstitiel ne représente pas un obstacle à la mesure du débit sanguin régional (Jerosch-Herold et al. 2004). Dans la prostate, comme la perfusion est lente, il est probable que la fraction d'extraction du produit de contraste au premier passage soit proche de 1, donc que le transport soit limité par la perfusion. Par conséquent, la déconvolution de l'équation [34] pourrait effectivement fournir une mesure du débit sanguin et non de la perméabilité capillaire (les notions de transport limité par la perfusion ou par la perméabilité et leur conséquence sur la quantification des paramètres hémodynamiques sont explicitées p.44). Une autre hypothèse, qui concerne cette fois-ci uniquement le modèle MPC, est le fait que le transport de l'agent de contraste se fait uniquement dans le sens plasma-espace interstitiel et pas dans l'autre sens, pendant la durée de l'observation, c'est-à-dire les 3 premières minutes post-injection. Le retour de l'agent de contraste dans le compartiment vasculaire se produit typiquement dans une période allant de plusieurs minutes à une heure (Padhani 2003). La rapidité de ce retour dépend, entre autres, du volume de l'espace extravasculaire-extracellulaire et de la vitesse à laquelle la concentration plasmatique diminue. Ainsi, cette hypothèse est une fois de plus soutenue par le fait que la perfusion prostatique est relativement lente.

Une autre limite provient du fait que les courbes tissulaires ont été définies dans des régions anatomiques et donc que certaines régions d'intérêt pourraient inclure du tissu cancéreux. Or il est connu que la perméabilité et la perfusion sont toutes deux augmentées dans les tumeurs (Padhani 2003). La présence de tissu tumoral pourrait d'une part entraîner une sur-estimation des paramètres hémodynamiques variables d'un patient à l'autre et d'autre part compromettre la validité des hypothèses

des modèles mathématiques. Un autre inconvénient de l'approche par région d'intérêt est qu'elle ne prend pas en compte l'hétérogénéité de la distribution du débit sanguin régional dans la prostate (Figure 20), alors que celle-ci pourrait influencer la réussite ou l'échec du traitement. Une telle approche a été choisie parce qu'elle améliorerait le rapport signal sur bruit, donc la précision des paramètres issus de la déconvolution.



**Figure 20- Cartographie de la perfusion prostatique**

*L'encart montre une cartographie de perfusion, avec une échelle allant du bleu au rouge pour des valeurs croissantes de perfusion. Noter l'hétérogénéité de la perfusion, avec deux « points chauds » (hot spot), en rouge, à l'intérieur de la glande prostatique, évocateur de tissu tumoral. L'analyse par région d'intérêt moyenne le signal dans l'ensemble de la prostate et dans chacune des deux sous-régions (glande centrale et zone périphérique), et par conséquent ignore cette hétérogénéité, bien qu'elle pourrait avoir une influence sur l'issue du traitement (données non publiées).*

Malgré toutes ces simplifications, la concordance entre nos résultats et les données de la littérature plaide en faveur de la validité de notre approche, pour le protocole clinique donné. Nous avons donc choisi d'utiliser la méthode MPC pour explorer l'effet de la perfusion prostatique sur la réussite ou l'échec du traitement par Ablatherm. L'hypothèse était que la perfusion pourrait jouer un rôle dans la dissipation de la chaleur lors du traitement : ainsi, les prostatites présentant une perfusion élevée aurait un risque d'être sous-traitées en raison d'une dissipation accrue (le traitement étant par ailleurs standardisé et adapté uniquement à la taille de la prostate). L'analyse des résultats a conforté cette idée, en montrant que les patients dont le cancer récidivait après traitement (PSA nadir > 0,2 ng/ml) avaient un niveau de perfusion significativement plus élevé que les patients qui répondaient bien au traitement (PSA nadir < 0,2 ng/ml). Cependant, si cela est vérifié en moyenne, il existe un chevauchement important des valeurs de perfusion au niveau individuel (« faux positifs » et « faux négatifs » si un seuil de perfusion devait être défini).

Les études futures pourraient gagner à explorer l'hétérogénéité de la perfusion prostatique, à l'aide de la reconstruction de cartographies de perfusion par exemple. Il est probable que d'autres paramètres que la perfusion interviennent, et une combinaison de plusieurs paramètres permettrait sans doute d'améliorer la spécificité et la sensibilité. Une autre piste actuellement explorée par l'équipe du Pr Chapelon en collaboration avec le Cermep est le monitoring de la température de la prostate en IRM pendant le traitement. A terme, ces études pourraient avoir des implications importantes pour la personnalisation du traitement par Ablatherm.

### 2.2.5. Perfusion hépatique

Au cours des dernières années, j'ai également été associée aux travaux d'un doctorant encadré par le Pr Yves Berthezène, Dr Siraj Abdullah, dont l'un des objectifs était d'étudier la perfusion des deux cancers hépatiques les plus fréquents : le carcinome hépatocellulaire (CHC) et le cancer colorectal métastatique (CCM), à l'aide de l'IRM. La vascularisation du foie est très particulière, car le sang arrive à la fois par une artère (artère hépatique : entre 25% et 30% de la perfusion hépatique totale) et par une veine (veine porte : entre 75% et 70% de la perfusion hépatique totale). La proportion entre perfusion artérielle et portale varie en fonction de l'état pathologique du foie et, dans le cas du cancer, du type de tumeur, de sa taille, et de son degré de différenciation. Par exemple, le CHC est généralement hypervascularisé, tandis que le CCM est généralement hypovascularisé. Le but de cette étude prospective était de caractériser la perfusion de ces deux types de cancer à l'aide de l'IRM dynamique avec produit de contraste (Abdullah et al. 2008). A notre connaissance, il s'agissait de la première étude quantitative en IRM multi-coupes chez des patients.

Une série dynamique de 50 images par niveau de coupe a été acquise à 1.5T (Magnetom Symphony Maestro Class; Siemens, Erlangen, Germany) avec l'antenne corps, à l'aide d'une séquence écho de gradient pondérée T1 (*fast spoiled gradient echo*) : TE/TR 12/210-ms, angle de bascule 12°, champ de vue : 40 x 32 cm, matrice : 178 x 78, épaisseur de coupe : 8 mm, 8 coupes parasagittales. La résolution temporelle pour chaque coupe était de 1,7 s. Le chélate de gadolinium (Dotarem, Guerbet, Aulnay-Sous-Bois, France) a été injecté à la dose de 0,1 mmol/kg à l'aide d'un injecteur automatique. De la même manière que pour l'étude de la perfusion prostatique, nous avons fait l'hypothèse que la concentration en gadolinium était proportionnelle aux variations de signal RM au cours du temps, définies par :

$$C_t(t) = k \cdot \frac{S(t) - S_0}{S_0} \quad [52]$$

$C_t(t)$  : concentration de gadolinium à l'instant  $t$  dans le tissu (en mmol/l)

$S(t)$  : signal RM à l'instant  $t$  dans le tissu (en unité arbitraire)

$S_0$  : signal RM avant l'arrivée du produit de contraste (ligne de base, en unité arbitraire)

La Figure 21 montre les courbes typiquement obtenues pour les deux types de cancer. Les régions d'intérêt ont été définies par Siraj Abdullah à l'aide du logiciel Creatools (avec une correction manuelle du mouvement image par image), puis les courbes obtenues ont été déconvoluées à l'aide d'un script écrit sous Matlab (MathWorks, Natick, MA). Dans le cadre de cette étude, j'ai mis en œuvre un modèle pharmacocinétique prenant en compte les entrées artérielles et portales (Cuenod et al. 2001) :

$$C_t(t) = \rho \cdot [HPI \cdot C_a(t) + (1 - HPI) \cdot C_{vp}(t)] \otimes F_t \cdot e^{-t/MTT} \quad [53]$$

$C_t(t)$  : concentration de gadolinium à l'instant  $t$  dans le tissu (en mmol/l)

$C_a(t)$  : concentration de gadolinium à l'instant  $t$  dans l'artère hépatique (en mmol/l)

$C_{vp}(t)$  : concentration de gadolinium à l'instant  $t$  dans la veine porte (en mmol/l)

$F_t$  : débit sanguin régional tissulaire (perfusion hépatique totale, en ml/min/100g)

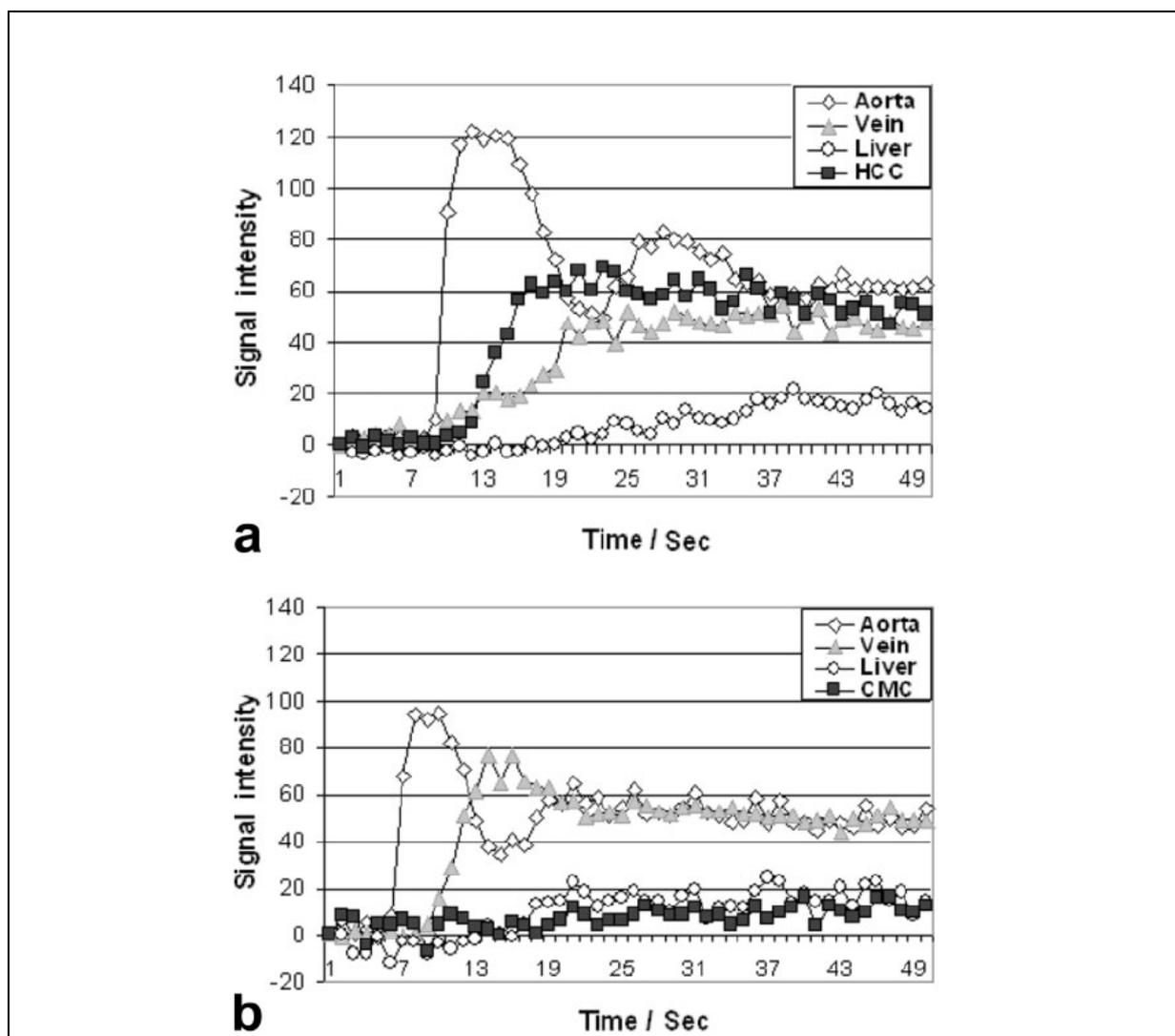
$HPI$  : index de perfusion hépatique (pourcentage de la perfusion totale issue de l'artère hépatique, en %)

$MTT$  : temps de transit moyen (en s)

$\rho$  : masse volumique du foie (approximée à 1 g/ml)

$\otimes$  : produit de convolution

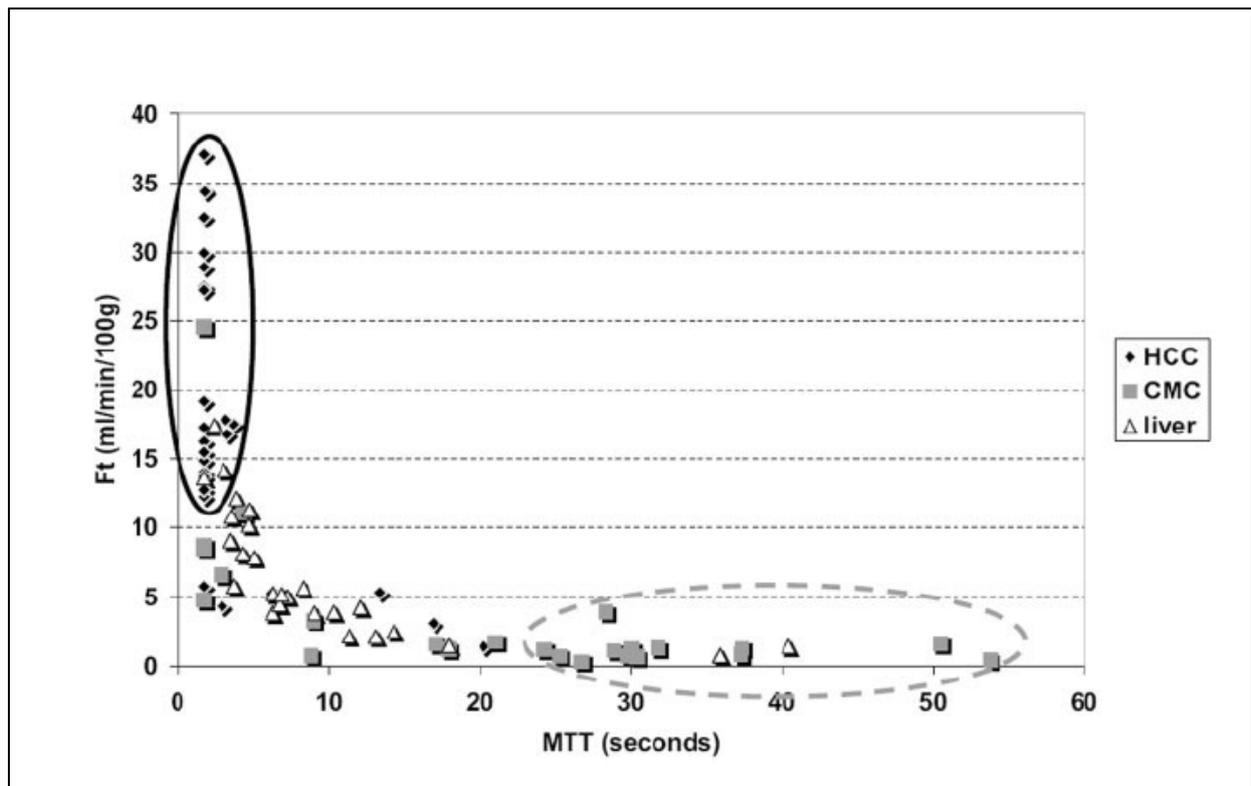
Pour chaque tissu d'intérêt (tumeur et foie adjacent), six paramètres de perfusion ont été évalués : l'index de perfusion hépatique ( $HPI$ ), le temps de transit moyen ( $MTT$ ), le débit de perfusion total ( $F_T$ ), le volume de distribution ( $DV = F_T / MTT$ ), la perfusion artérielle ( $F_A = HPI \times F_T$ ) et la perfusion portale ( $F_P = (1 - HPI) \times F_T$ ).



**Figure 21- Variations de signal dans le plasma et dans le tissu hépatique**

*Courbes obtenues dans le foie non cancéreux (ronds), l'aorte (représentant l'entrée artérielle, losanges), la veine portale (triangles) et un nodule (carrés) pour le CHC (a) et le CCM (b). Noter dans le cas du CHC un réhaussement supérieur à celui du foie adjacent et dans le cas du CMC un réhaussement inférieur à celui du foie adjacent. Reproduit de (Abdullah et al. 2008).*

L'étude a été réalisée chez 26 patients, pour un total de 50 nodules cancéreux. L'analyse des données par Siraj Abdullah a montré que les paramètres de débit sanguin régional ( $F_T$ ,  $F_A$  et  $F_P$ ) étaient significativement plus élevés dans le groupe des CHC que dans le groupe des CCM. Les CHC présentaient par ailleurs un volume de distribution de produit de contraste plus important que les CCM. La combinaison des deux paramètres de fit indépendants ( $F_T$  et  $MTT$ ) semblait la plus appropriée pour différencier les deux types de cancer (Figure 13).



**Figure 22- Distribution de deux paramètres d'ajustement indépendants**

Le débit sanguin hépatique total ( $F_T$ ) est représenté en fonction du temps de transit moyen  $MTT$ , pour les nodules CHC ( $N=26$ , losanges), les nodules CCM ( $N=24$ , carrés) et le foie non-cancéreux des patients CHC et CCM regroupés ( $N=26$ , triangles). La région entourée par un ovale en traits pleins est définie par les seuils suivants :  $F_T > 12$  ml/min/100g et  $MTT < 4$  s. Elle comprend 83% des nodules CHC, 4% des nodules CCM et 13% de foie non-cancéreux. La région entourée par un ovale en traits pointillés est définie par les seuils suivants :  $F_T < 5$  ml/min/100g et  $MTT > 24$  s. Elle comprend 87% des nodules CHC, 0% des nodules CCM et 13% de foie non-cancéreux. Reproduit de (Abdullah et al. 2008).

La limitation principale de l'approche méthodologique utilisée pour cette étude est représentée par la sur-estimation du débit sanguin régional hépatique par rapport aux valeurs de la littérature (Greenway and Stark 1971). Cette sur-estimation s'explique principalement par la difficulté d'obtenir des courbes d'entrées artérielles hépatiques et portales fiables. Les pics de concentrations de gadolinium dans ces vaisseaux étaient bien moins élevés qu'attendu, probablement en raison de la non-linéarité de la relation entre le signal RM et la concentration au pic et/ou aux effets de volume partiel. La saturation du signal dans les vaisseaux pourrait être limitée en diminuant la dose de gadolinium injectée, mais cela ne peut se faire qu'au détriment du rapport contraste-sur-bruit dans le tissu, et par conséquent, au détriment de la précision de la mesure de la perfusion tissulaire. Malgré ces limitations, nous avons obtenu des résultats encourageants pour la caractérisation des tumeurs cancéreuses primaires et secondaires à l'aide de l'IRM. Une telle approche pourrait à l'avenir jouer un rôle important pour la détermination et le suivi des stratégies thérapeutiques, telles que la chimio-embolisation artérielle ou les traitements anti-angiogéniques.

### 2.2.6. Perméabilité tumorale

Au cours de ce travail réalisé lors mon post-doctorat (2001-2002) au Centre d'imagerie moléculaire et pharmaceutique (*Center for pharmaceutical and molecular imaging*, University of California San Francisco, Etats-Unis), je me suis intéressée à la quantification de la perméabilité capillaire des tumeurs cancéreuses. Les anti-angiogéniques sont de nouveaux médicaments qui empêchent l'angiogenèse, c'est à dire la fabrication de nouveaux vaisseaux sanguins indispensables à la croissance tumorale. Ces néo-vaisseaux présentent des caractéristiques différentes des vaisseaux physiologiques, notamment une hyperperméabilité vasculaire. Cette propriété, qui permet aux macromolécules de s'extravaser du compartiment intravasculaire vers le compartiment extravasculaire, peut être mise à profit pour évaluer l'impact fonctionnel d'un traitement anti-angiogénique sur la perméabilité des capillaires aux macromolécules, à l'aide de l'IRM dynamique couplée à l'injection d'un produit de contraste macromoléculaire à base de gadolinium.

Nous avons utilisé cette approche pour évaluer les effets d'un traitement au Prinomastat, un anti-angiogénique basé sur l'inhibition des métalloprotéinases, sur la perméabilité d'une tumeur cancéreuse du sein (MDA-MB-45) implantée en sous-cutanée chez le rat (Wiert et al. 2004). Cette étude a été réalisée sur un aimant dédié au petit animal 2T/15-cm (Omega CSIII; Bruker Instrument, Fremont, CA). La série dynamique a été acquise avec une antenne cage d'oiseau, à l'aide d'une séquence écho de gradient 3D pondérée T1 (*spoiled gradient-refocused acquisition in a steady state, 3D-SPGR*) : TR/TE 30/4,8 ms, angle de bascule 90°, champ de vue 5 x 5 x 9,6 cm, matrice 128 x 128 x 32. La résolution temporelle pour chaque volume était de 2 min 12 s (durée totale d'acquisition : 40 minutes). Une série de 9 images avec des temps de répétition variant de 100 à 300 ms avait été acquise à l'aide de la même séquence avant l'injection du produit de contraste, afin de quantifier le T1 pré-contraste, et par la suite de transformer les variations de signal en variations de relaxivité  $\Delta RI(t)$ . Le protocole comprenait un suivi longitudinal avec 3 acquisitions pour chaque rat (D1, date où la tumeur atteignait 1 cm de diamètre, D2 après 1 jour de traitement avec le Prinomastat ou le véhicule et D10 après 10 jours de traitement). L'analyse des résultats a montré que le Prinomastat réduisait massivement la perméabilité capillaire après 1 jour de traitement, mais que cet effet était annulé après 10 jours (**Tableau 2**), probablement en raison de mécanismes de résistance.

MRI-assayed tumor fractional plasma volume (fPV) and microvascular leakiness ( $K^{PS}$ ) in the prinomastat-treated group. Imaging was performed before treatment (baseline), at day 2 and 10 of treatment (two i.p. injections daily).

N = 8	Baseline	Day 2	Day 10
fPV	4.6±0.8	3.8±0.9	4.4±1.0
$K^{PS}$	18±15	3±8*	20±11

Data are presented as mean±standard deviation, fPV in ml/100 cc of tissue,  $K^{PS}$  in  $\mu$ l/min/100 cc of tissue. \*statistically different from baseline and from day 10 (ANOVA test,  $p < 0.05$ ).

**Tableau 2- Quantification de l'effet du traitement au Prinomastat sur la perméabilité de la tumeur**

Reproduit d'après (Wiert et al. 2004).

Le Prinomastat avait été arrêté par Pfizer en Août 2000 en phase III d'évaluation clinique, en raison du manque d'efficacité chez les patients. Les résultats obtenus *a posteriori* dans cette étude démontrent l'urgence de définir des protocoles pré-cliniques mesurant précisément la capacité des médicaments à atteindre leur cible et ce afin de mieux comprendre leurs mécanismes d'action *in vivo* et de bien sélectionner les patients susceptibles de bénéficier de ces nouvelles thérapeutiques.

### 2.3. Perspectives

Au cours de ces 13 dernières années, nous avons développé et validé différentes méthodes de post-traitement des séries d'images acquises à l'aide des techniques de *DSC-MRI* et *DCE-MRI*, dans le but d'obtenir des paramètres quantitatifs adaptés aux différents organes, pathologies, et questions scientifiques posées. Pour les années à venir, le principal axe de travail vise l'**imagerie pharmacologique** et **translationnelle**, dans le domaine de l'**AVC**. Pour cela, nous souhaitons valider chez le rongeur un protocole d'**IRM multimodale** identiques à celui des études cliniques (angiographie, imagerie de perfusion et de diffusion, imagerie pondérée T2 et T2\*, imagerie pondérée T1 post-gadolinium).

A notre connaissance, il existe actuellement peu de travaux **quantifiant la perfusion de manière absolue** (en ml/min/100g de tissu) chez le **rongeur**. La plupart des études de perfusion sont réalisées avec la méthode de marquage magnétique des spins (*spin labelling*) (Meng et al. 2004; Bardutzky et al. 2007; Henninger and Fisher 2007; Ding et al. 2008). Cependant, le débit sanguin régional est généralement sous-estimé dans la région à bas débit avec ce type d'approche (Buxton et al. 1998; Hofmeijer et al. 2005). Cette sous-estimation est attribuée aux temps de transit allongés dans les régions hypoperfusées, causant une perte du marquage magnétique en raison des délais d'arrivée des spins. De plus, la **technique DSC-MRI** est **attractive du point de vue translationnel**, car c'est cette méthode qui est utilisée en routine clinique pour évaluer les patients présentant un AVC. La sévérité de la réduction du débit sanguin pendant l'ischémie étant un facteur déterminant pour le devenir tissulaire, il apparaît indispensable de rapporter les effets observés suite à un traitement neuroprotecteur au débit sanguin cérébral pendant l'occlusion. Une étude réalisée avec des microsphères radioactives a montré que les mesures *absolues* de débit sanguin cérébral prédisaient mieux les dommages tissulaires suite à une ischémie/reperfusion que les mesures *relatives* (Engelhorn et al. 2005), d'où la nécessité de poursuivre l'objectif de quantification absolue de la perfusion cérébrale en IRM.

### 3. IRM de la neuro-inflammation post-ischémique

L'accident vasculaire cérébral (AVC) est une maladie fréquente et grave, qui touche aussi bien les populations des pays développés que des pays en voie de développement (Yach et al. 2004). Dans les pays occidentaux, les AVC représentent la 3<sup>ème</sup> cause de mortalité et la principale cause de handicap. L'AVC ischémique, qui résulte de l'occlusion d'une artère à destination cérébrale, représente près de 85% des AVC. Après l'occlusion artérielle, le devenir du tissu ischémique n'est pas uniforme. Autour du centre lésionnel rapidement nécrosé, il existe une zone périphérique présentant la capacité de récupérer si la perfusion est restaurée suffisamment rapidement. Cette zone a été dénommée **zone de pénombre**, « *zone partiellement éclairée entourant l'ombre complète comme autour de la lune pendant une éclipse* » (Astrup et al. 1981). Elle constitue l'enjeu des traitements de l'infarctus cérébral aigu (Hossmann 1994).

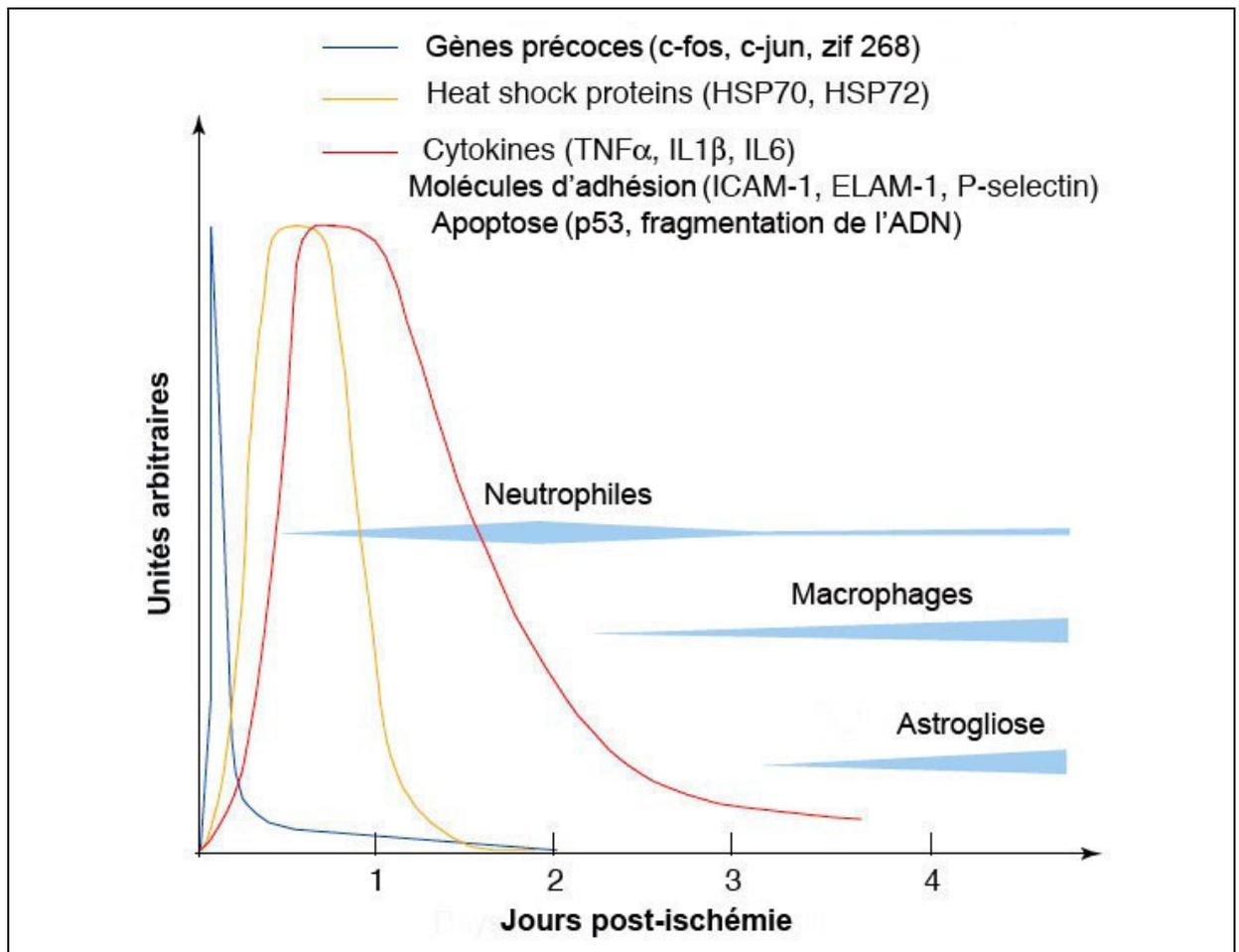
La **thrombolyse** réalisée à l'aide de l'altéplase (activateur tissulaire du plasminogène recombiné ou rT-PA) constitue le traitement de référence en cas d'AVC ischémique aigu, dans les 3 heures suivant la survenue des symptômes. En raison des capacités d'accueil, seule une petite proportion de patients éligibles peuvent bénéficier de ce traitement. A côté de la thrombolyse, de nouveaux traitements sont actuellement étudiés soit en tant qu'agents monothérapeutiques, soit en conjonction avec l'altéplase. Ainsi, de nouveaux traitements **neuroprotecteurs** ciblant la réponse inflammatoire ont été proposés par l'industrie pharmaceutique (Barone and Parsons 2000). L'**inflammation** est en effet considérée à l'origine de dommages secondaires qui complètent les dommages initiaux dus à l'ischémie cérébrale (dommages oxydatifs et neurotoxiques). Cependant, les mécanismes d'action *in vivo* de ces médicaments sont mal connus et, à ce jour, leur efficacité clinique n'a pas été démontrée. Il existe par conséquent un besoin crucial de développer des méthodes non-invasives permettant d'évaluer l'impact de l'inflammation sur la physiopathologie de l'accident vasculaire cérébral *in vivo*. Dans cette perspective, **l'imagerie cellulaire par IRM** pourrait constituer une méthode de choix, en permettant le suivi des cellules inflammatoires et l'étude de leur cinétique d'activation et de migration chez l'animal vivant, voire chez l'homme.

#### 3.1. Utilisation des USPIO pour le marquage magnétique des macrophages

##### 3.1.1. Les phénomènes inflammatoires dans l'ischémie cérébrale

La participation des processus inflammatoires aux dommages ischémiques cérébraux est confirmée par nombreuses données expérimentales (Iadecola and Alexander 2001; Danton and Dietrich 2003; Price et al. 2003), avec pour conséquence l'émergence d'une nouvelle voie thérapeutique (Becker 2001). Cependant, à ce jour, la connaissance de ces processus inflammatoires post-ischémiques reste très partielle. Elle repose essentiellement sur des données expérimentales dont la transposition à l'homme est difficile en raison de l'hétérogénéité de la physiopathologie des AVC. Par ailleurs, il s'agit de mécanismes particulièrement complexe, mettant en jeu un certain nombre de phénomènes intriqués et de nombreux acteurs : moléculaires (expression et régulation des gènes impliqués, molécules d'adhésion), humoraux (cytokines et chémokines), et cellulaires (activation microgliale, infiltration granulocytaire et macrophagique). La chronologie des différents processus impliqués dans l'accident ischémique cérébral est représentée *Figure 23*.

Au niveau cellulaire, la réaction inflammatoire suite à une ischémie cérébrale est dominée par les cellules mononuclées phagocytaires : macrophage dérivé du monocyte (présent dans la circulation sanguine) ou résidant dans le cerveau (microglie). La fonction première des macrophages est la phagocytose, c'est-à-dire la capture et l'ingestion des particules solides inertes ou vivantes, soit un rôle d'« éboueurs » des éléments étrangers à notre organisme. L'effet bénéfique ou délétère de l'activation microgliale et de l'influx macrophagique au cours de l'ischémie cérébrale demeure un sujet controversé.



**Figure 23- Chronologie des événements au cours de l'ischémie cérébrale.**

*L'expression des cytokines et des molécules d'adhésion s'accompagne de l'infiltration des neutrophiles. L'influx macrophagique est retardé au 2-3<sup>ème</sup> jour. Abréviations : ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1 ; ELAM-1, endothelial-leucocyte adhesion molecule-1 ; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$  ; IL, interleukine (d'après (Iadecola 1997)).*

Les cellules microgliales sont les principales cellules immunocompétentes résidentes du système nerveux central. La microglie est en mesure d'exprimer une réaction de défense de type macrophagique, de présenter des antigènes, et d'adapter la réponse immunitaire face à de multiples stimuli (Streit 2002). A l'état basal, la microglie exprime peu de molécules de surface, et présente une morphologie ramifiée caractéristique. L'activation microgliale s'accompagne d'une modification morphologique (rétraction des ramifications, transition vers un aspect amiboïde), de l'expression de multiples molécules de surface et de facteurs solubles les rendant indifférenciables des macrophages hématogènes. Par ailleurs, les macrophages périvasculaires, méningés et associés aux plexus choroïdes représentent une population distincte de macrophages résidents dans le système nerveux central, faisant partie intégrante de la barrière hémato-encéphalique (BHE).

L'évolution temporelle de la réponse microgliale a été décrite dans un modèle d'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne chez le rat (Lehrmann et al. 1997; Zhang et al. 1997). Ces études ont montré que l'activation macrophagique prenait un aspect hétérogène et semblait corrélée à la sévérité des lésions neuronales. Cependant, elles ne permettaient pas de distinguer formellement l'infiltration des macrophages hématogènes de la microglie. Afin de préciser cette question, certains auteurs (Rupalla et al. 1998; Schilling et al. 2003) ont proposé de faire appel à un modèle de souris chimérique, qui consiste à

greffer la moelle osseuse de souris transgéniques exprimant le GFP (*green fluorescent protein*) chez des souris contrôle dont la moelle osseuse a été irradiée. Il devient ainsi possible chez ces animaux de différencier la microglie (GFP négative) des macrophages hématogènes (GFP positives). L'utilisation de ces souris chimériques a permis de démontrer aussi bien dans un modèle d'ischémie permanente (Rupalla et al. 1998; Tanaka et al. 2003) que transitoire (Schilling et al. 2003), une activation microgliale précoce dès J0 et une infiltration des macrophages hématogènes plus tardive, à partir de J1, avec un pic à J7. Cependant, même entre J4 et J7, la microglie représentait la grande majorité des cellules phagocytaires au niveau de la zone périlésionnelle. Au niveau clinique, quelques travaux (Lindsberg et al. 1996; Tomimoto et al. 1996; Schwab et al. 2001) portant sur de petites séries autopsiques suggèrent qu'une activation microgliale/macrophagique précoce et prolongée survient au cours des infarctus humains.

De récentes publications font état du caractère versatile et plastique des macrophages, leur permettant d'adapter la réponse inflammatoire à leur environnement (Gordon 2003). En particulier, les cytokines de type Th1, telles que IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  ou LPS, induisent un état d'activation des macrophages dit « classique » ou M1. En revanche, les cytokines Th2, telles que l'IL-4 et l'IL-13 induisent une activation « alternative » ou M2 des macrophages. Les macrophages M1 sont des cellules effectrices qui détruisent les microorganismes et produisent principalement des cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-12. A l'inverse, les macrophages M2 présentent des propriétés anti-inflammatoires car ils produisent des facteurs tels que IL-10, TGF $\beta$  et l'antagoniste du récepteur à IL-1 $\beta$  (IL-1Ra). Les macrophages M2 sont également impliqués dans l'angiogenèse et ont des capacités de réparation et de remodelage du tissu endommagé. La compréhension des mécanismes moléculaires pouvant réguler ces aspects bénéfiques et délétères pourrait dégager de nouvelles cibles thérapeutiques (Melani et al. 2006).

### **3.1.2. Evaluation de la neuro-inflammation post-ischémique en IRM**

La multiplicité des mécanismes de contraste disponibles en IRM permet d'obtenir une exploration structurelle (densité de protons, temps de relaxation T1 et T2), fonctionnelle (diffusion, tenseur de diffusion, perfusion) et métabolique (spectroscopie) à l'échelle millimétrique pour les champs cliniques, et submillimétrique pour les haut champs. Depuis plusieurs années, un intense effort de recherche a été entrepris pour développer l'IRM cellulaire et moléculaire. Ces nouvelles approches sont susceptibles de permettre un suivi non-invasif de la réponse inflammatoire en exploitant des cibles moléculaires et cellulaires spécifiques de l'inflammation. La possibilité d'explorer l'ensemble du cerveau chez un même sujet de manière non invasive et répétée constitue un avantage certain par rapport aux méthodes *post mortem* d'immunohistologie ou *in vivo* de microscopie multiphotonique. Considérant la vaste littérature concernant l'IRM de l'inflammation, nous limitons notre bibliographie à l'évaluation de la réponse macrophagique suite à une ischémie cérébrale, qui représente le champ de nos travaux.

#### **IRM sans injection de nanoparticules d'oxyde de Fer**

Les premières études ont consisté à évaluer le potentiel de l'IRM pour détecter la réponse inflammatoire post-ischémique sans utiliser de produit de contraste à base de Fer. Ainsi, Schroeter *et al* (Schroeter et al. 2001) ont utilisé l'IRM multimodale haute résolution à 7T (diffusion, perfusion, T2, T1 réhaussé au gadolinium) pour explorer les réponses inflammatoires et gliales consécutives à une ischémie cérébrale focale. Les images ont été acquises chez des rats avec une occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne 3, 7 et 14 jours après l'opération et comparées avec l'immunomarquage des cellules phagocytaires et des astrocytes. D'après les résultats, ce type de protocole ne permettait pas de discriminer les zones inflammées des régions saines. Cette étude soulignait par conséquent le besoin de développer de nouvelles techniques IRM permettant une détection spécifique des cellules inflammatoires.

Deux études ultérieures (Weber et al. 2005; Justicia et al. 2008) ont démontré l'intérêt des séquences 3D pondérées T2\* pour mettre en évidence les régions présentant une activité macrophagique (sans injection de nanoparticules d'oxyde de Fer). En effet, l'accumulation de Fer endogène dans les

macrophages au cours du remodelage tissulaire induit des artefacts de susceptibilité magnétique détectables en IRM à l'aide de séquences très sensibles à ces effets. Une première étude (Weber et al. 2005), réalisée à 4,7T chez des rats avec une occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (60 minutes), a permis d'observer sur l'imagerie T2\* des régions hypointenses dans la lésion ischémique, 10 semaines après l'opération, en co-localisation avec le marquage au bleu de Perls (détection de l'ion ferrique) et l'immunomarquage ED1 (détection des macrophages activés chez le rat). Une étude récente de la même équipe (Justicia et al. 2008), réalisée chez le rat à 4,7T et 7T, s'est intéressée aux dommages secondaires liés à la reperfusion. Dans le thalamus, les hyposignaux T2\* coïncidaient avec la perte neuronale et une forte activation microgliale entre la 10<sup>ème</sup> et la 24<sup>ème</sup> semaine post-ischémie. Si ces études démontrent qu'il est possible de détecter les macrophages marqués magnétiquement par le Fer endogène, il n'en reste pas moins que les temps d'observation post-ischémie demeurent très tardifs, à un moment où la fenêtre d'intervention thérapeutique n'est peut-être pas optimale.

### ***Marquage in vivo des cellules phagocytaires***

Il est possible d'exploiter la propriété de phagocytose des macrophages pour l'imagerie, en injectant des nanoparticules d'oxyde de Fer (SPIO ou USPIO) par voie intraveineuse. Celles-ci sont phagocytées *in vivo* et les macrophages ainsi marqués magnétiquement deviennent détectables en IRM, en raison des perturbations de champ magnétique entraînées par le Fer. L'avantage de cette technique est double : d'une part, elle permet de suivre les macrophages endogènes à l'aide d'un marqueur exogène, et d'autre part il est possible de transférer l'approche en clinique, car certains des produits de contraste à base de Fer sont approuvés ou en phase d'évaluation clinique chez l'Homme.

### **Etudes expérimentales**

Les études portant sur le suivi des cellules phagocytaires post-ischémie cérébrale par l'IRM couplée aux USPIO sont peu nombreuses, mais en nombre croissant depuis quelques années. Elles ont été effectuées en grande majorité chez le rat, selon des protocoles très différents (en fonction du modèle d'ischémie, de la souche de rat utilisée, du produit de contraste, de l'intensité du champ et du protocole d'imagerie), ce qui rend leur comparaison difficile. Il faut préciser ici qu'une toute première étude (Doerfler et al. 2000) avait montré l'absence d'impact de l'injection d'USPIO sur les scores cliniques et les tailles des lésions dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat (occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne par la méthode du filament). Notons tout de même que dans cette étude la dose était d'un ordre de grandeur dix fois moins élevé que dans les études suivantes, car l'objectif était d'utiliser les USPIO comme marqueur du secteur vasculaire pour mesurer la perfusion, et non pour évaluer l'inflammation.

Le *Tableau 3* fait la synthèse des travaux publiés à ce jour à notre connaissance avec un modèle permanent d'ischémie cérébrale focale. Différents temps post-ischémie ont été testés pour l'injection des nanoparticules d'oxyde de Fer. Le protocole donnant les diminutions de T2/T2\* les plus marquées est celui qui fait intervenir une injection à J5 à la dose de 300 µmol Fe/kg et un suivi IRM à J6, que ce soit pour les USPIO (Ferumoxtran-10 ou Sinerem®) ou les SPIO (Ferumoxide ou Resovist®) (Kleinschnitz et al. 2003; Saleh et al. 2004b; Schroeter et al. 2004; Engberink et al. 2008). Ce délai de 24h entre injection et imagerie est nécessaire pour l'élimination du secteur sanguin des nanoparticules d'oxyde de Fer (la demi-vie du Sinerem®, le produit le plus utilisé, étant de 5h chez le rat). L'imagerie pondérée T2/T2\* est utilisée pour mettre en évidence les signaux RM liés aux nanoparticules de Fer dans toutes les études. L'hypothèse d'une diffusion passive des nanoparticules d'oxyde de Fer à la faveur d'une rupture de la barrière hématoencéphalique était écartée en raison de la non-superposition des changements de signaux suite à l'injection d'un chélate de gadolinium et des (U)SPIO (Kleinschnitz et al. 2003; Engberink et al. 2008). Malgré le nombre importants de points post-ischémie explorés (entre J0 et J14), peu d'animaux ont été suivis de manière longitudinale, ceux-ci étant la plupart du temps sacrifiés après l'IRM pour confrontation avec l'immunohistologie. Les analyses *post-mortem* comprennent en général un immunomarquage pour détecter les cellules phagocytaires (ED1) et une coloration au Bleu de Perls pour

détecter le Fer. La concordance spatiale entre les macrophages, le Fer, et l'hyposignal RM est bien documentée en périphérie de la lésion pour le modèle de photothrombose à J6 (Saleh et al. 2004b). Un double marquage sur les mêmes coupes a de plus confirmé l'internalisation du Fer dans les macrophages (Kleinschnitz et al. 2003). La colocalisation semblait plus approximative avec le modèle d'électrocoagulation (Rausch et al. 2001). De plus, dans tous les cas, l'immunomarquage ED1 des macrophages restait plus étendu que celui du Fer.

Le Tableau 4 fait la synthèse des travaux publiés à ce jour à notre connaissance avec un modèle transitoire. Les résultats sont contradictoires et d'autant plus difficiles à analyser conjointement que les protocoles diffèrent en tous points (en particulier concernant les nanoparticules de Fer utilisées et le moment de l'injection). La première étude (Rausch et al. 2002) présente les résultats les plus inattendus, avec l'observation d'un hypersignal T1 transitoire à l'intérieur de la lésion, sans concordance avec un éventuel hyposignal T2, bien que travaillant à haut champ (4,7T). De plus, le marquage du Fer au bleu de Perls ne s'est révélé positif qu'à J7, soit 5 jours après l'apparition de l'hypersignal, et en périphérie de la lésion uniquement. Les auteurs avancent deux hypothèses pour expliquer ces résultats : (1) les USPIO seraient relarguées par les macrophages recrutés pour la cicatrisation avant d'être pris en charge et éliminés par des macrophages recrutés secondairement et (2) le bleu de Perls ne serait sensible au Fer des USPIO qu'après dégradation de l'enrobage en Dextran, une opération enzymatique qui nécessiterait plusieurs jours. La seconde étude (Kim et al. 2008) présente des résultats plus conformes à ceux obtenus dans le modèle permanent, avec une apparition d'hyposignaux T2 post-ischémie relativement tardive. Cependant, ces observations n'ont pas pu être reproduites par une équipe indépendante (Farr et al. 2008) et demandent donc à être confirmés. Par ailleurs, une étude réalisée chez la souris dans les 3 jours suivant l'ischémie-reperfusion confirme la prédominance de la réponse microgliale aux stades aigu et subaigu en comparaison avec l'infiltration monocytaire, quasi-inexistante et non détectée en IRM à l'aide des USPIO (Denes 2007). Il est à noter cependant que la dose utilisée dans cette étude était particulièrement faible (160  $\mu\text{mol/kg}$ ) et donc pas nécessairement optimale pour une détection IRM.

Enfin, la troisième étude (Henning et al. 2009) présente une méthodologie originale basée d'une part sur le fait que les nanoparticules d'oxyde de Fer injectées par voie intraveineuse vont cibler entre autres cellules phagocytaires celles de la moelle osseuse (Simon et al. 2005), et d'autre part sur l'hypothèse d'un renouvellement des macrophages résidents dans le système nerveux central à partir des cellules progénitrices de la moelle osseuse (Priller et al. 2001). Dans ce contexte, l'injection de SPIO (Feridex®, appelé Endorem® en Europe) a été réalisée 7 jours avant le modèle d'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne dans le but de pré-marquer les macrophages dérivés de la moelle osseuse. Un hyposignal T2/T2\* a été observé en périphérie de la lésion à partir du quatrième jour post-reperfusion chez les rats « pré-chargés », contrairement aux rats « post-chargés » (ayant eux reçu une injection de SPIO à la même dose 5 minutes après l'occlusion). Un autre résultat intéressant de l'étude concernait la nature de la sous-population de macrophages marqués. L'immunomarquage non-spécifique ED1 classiquement utilisé pour détecter les macrophages (comprenant les monocytes, les macrophages et la microglie activée) coïncidait en grande partie avec l'immunomarquage IBA, supposé être spécifique de la microglie activée. De même que pour les études précédentes, le marquage au bleu de Perls ne concernait qu'une faible proportion de cellules. De plus, celles-ci étaient ED1<sup>-</sup> mais ED2<sup>+</sup>, un marqueur des macrophages bien différenciés dont l'expression se limitait à la zone péri-lésionnelle. Enfin, les cellules ED2<sup>+</sup> correspondaient à des sous-groupes spécifiques de macrophages résidents (non-microgliaux) : macrophages péri-vasculaires, méningés, et présents dans les plexus choroïdes. Bien que les mécanismes exacts de marquage cellulaire par les SPIO et de migrations des cellules marquées dans le système nerveux central ne soient pas élucidés dans cette étude, l'approche proposée est élégante en cela qu'elle permet de s'affranchir de la question de la diffusion passive des SPIO. D'autres études indépendantes sont néanmoins nécessaires afin de confirmer ces résultats.

## **Etudes cliniques**

La première étude clinique a été publiée en 2004 par Saleh *et al* (Saleh et al. 2004a). Dans cette étude, les USPIO (Ferumoxtran-10) étaient injectés chez 10 patients présentant un AVC ischémique à la fin de la première semaine (6 à 9 jours) suivant la survenue des symptômes. L'IRM était réalisée à 1,5T avant l'injection puis une première fois entre 24h et 36h post-injection et une deuxième fois entre 48h et 72h. Un réhaussement parenchymateux sur les images pondérées T1 a été observé dans la majorité des cas (8 patients sur 10). En revanche, les effets T2/T2\* n'étaient pas observés systématiquement et ils semblaient associés aux vaisseaux sanguins. De même que dans les études expérimentales, il n'y avait pas de superposition entre les régions présentant une rupture de la BHE (documentée par le réhaussement T1 suite à l'injection d'un chélate de gadolinium) et les régions se réhaussant à la suite de l'injection des USPIO. Les auteurs en déduisaient que la prise de contraste due aux USPIO représentait l'infiltration de macrophages marqués magnétiquement.

Au cours d'une seconde étude, cette même équipe a étendu l'exploration de la réponse inflammatoire post-ischémique à un stade plus précoce (Saleh et al. 2007) : les USPIO étaient injectés 2 à 3 jours après la survenue des symptômes et les IRM étaient réalisées avant l'injection puis à différents temps après : 24h-36h, 48h-72h, 7-8 jours et 10-11 jours. Sur les 9 patients inclus dans l'analyse finale, seulement 3 ont montré des changements de signal sur les images post-injection. Aucun de ces patients ne présentait de réhaussement post-gadolinium. De la même manière que précédemment, les changements de signal consistaient en un réhaussement sur l'imagerie pondérée T1, avec une augmentation du réhaussement entre les 2 premiers examens post-injection, puis une diminution sur les 2 derniers. L'hétérogénéité de réponse aux USPIO pour des lésions similaires était interprétée par les auteurs comme reflétant l'hétérogénéité interindividuelle de la réaction inflammatoire post-ischémique. Cette interprétation est séduisante, car la méthode IRM pourrait alors aider à la sélection des patients candidats pour un traitement anti-inflammatoire. Cependant d'autres facteurs de variabilité interindividuelle (tels que génétiques, systémiques...), potentiellement confondants, pourraient expliquer les différences observées et il convient donc de considérer ces petites séries avec prudence.

Des études cliniques indépendantes étaient nécessaires afin de confirmer les résultats obtenus avec cette approche chez les patients présentant un AVC ischémique. Nous présenterons dans ce mémoire les résultats obtenus au sein de notre équipe représentant les deux autres études cliniques publiées à ce jour.

Modèle animal			Produit de contraste			IRM			Référence
Espèce	Souche	Modèle	Nom	Dose ( $\mu\text{mol/kg}$ )	Temps	Champ	Séquences	Temps d'imagerie	
Rat	Fischer	EC	Sinerem®	100	T0+5h	4,7T	Cartographie T2	J0, J1, J2, J4, J7	(Rausch et al. 2001)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyposignal T2 transitoire de J1 à J4 d'abord en périphérie de la lésion puis au centre</li> <li>- Codistribution de l'hyposignal avec le marquage histologique des macrophages (ED1) et du Fer (Bleu de Perls)</li> </ul>									
Rat	Wistar	PT	Resovist®	200	IRM-24h	1,5T	T2, 3D CISS, Gd-T1	J1 à J9, J11, J12, J14	(Kleinschnitz et al. 2003)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyposignal T2 transitoire de J5 à J8 d'abord en périphérie de la lésion puis au centre</li> <li>- Réhaussement global de la lésion après injection de Gd à tous les temps post-pMCAO</li> <li>- Codistribution de l'hyposignal avec le marquage histologie des macrophages (ED1) et du Fer (Bleu de Perls)</li> </ul>									
Rat	Wistar	PT	Sinerem®	300	IRM-24h	7T	3D T2*	J6	(Schroeter et al. 2004)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyposignal T2* à J6 en périphérie de la lésion</li> <li>- Codistribution de l'hyposignal avec le marquage histologique des macrophages (ED1) et du Fer (Bleu de Perls réhaussé)</li> </ul>									
Rat	Wistar	PT	Sinerem®	300	IRM-24h	7T	T2*, 3D T2*	J6	(Saleh et al. 2004b)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyposignal T2* à J6 en périphérie de la lésion</li> <li>- Codistribution de l'hyposignal avec le marquage histologie des macrophages (ED1) et du Fer (Bleu de Perls réhaussé)</li> </ul>									
Rat	Wistar	PT	Resovist®	300	T0, T0+2h, T0+24h	1,5T	T2, 3D CISS	J1, J2, J5, J7, J14	(Kleinschnitz et al. 2005)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Injection à T0 : hypersignal T2 transitoire de J1 à J2 en périphérie de la lésion et hyposignal de J0 à J5 au centre de la lésion ; Localisation intravasculaire du Fer dans toute la lésion</li> <li>- Injection à T0+2h : hyposignal T2 en périphérie de la lésion ; Localisation intravasculaire du Fer en périphérie de la lésion</li> <li>- Injection à T0+24h : pas de variation de signal</li> </ul>									
Rat	Lewis	PT	Sinerem®	300	IRM-24h	4,7T	Carto T2, T2, Gd-T1	J6, J8, J11	(Engberink et al. 2008)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyposignal T2 transitoire à J6 au centre de la lésion</li> <li>- Réhaussement global de la lésion après injection de Gd à J6</li> <li>- Détection des macrophages (ED1) dans la lésion et détection du Fer (Bleu de Perls) dans certaines parties de la lésion</li> </ul>									

EC- Electrocoagulation ; PT- Photothrombose ; SD- Sprague Dawley ; T0 = Temps au moment de l'occlusion, T0+5h = 5h après l'occlusion ; IRM-24h = 24h avant l'IRM ; Gd-T1 : séquence pondérée T1 avec injection d'un chélate de gadolinium (pour évaluer l'intégrité de la BHE)

**Tableau 3- Synthèse bibliographique de l'IRM réhaussée avec les nanoparticules d'oxyde de Fer dans le modèle d'occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne (permanent middle cerebral artery occlusion, pMCAO)**

Modèle animal			Produit de contraste			IRM			Référence
Espèce	Souche	Durée (min)	Nom	Dose ( $\mu\text{mol/kg}$ )	Temps	Champ	Séquences	Temps d'imagerie	
Rat	Fischer	30	Sinerem®	300	T0+5h	4,7T	T2, T1	J0, J1, J2, J3, J4, J7	(Rausch et al. 2002)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas d'hyposignal T2 tout au long de l'expérience ; Hypersignal T1 transitoire à J2</li> <li>- Détection des macrophages (ED1) dans la lésion dès J1 en augmentation jusqu'à J7 ; Détection du Fer (Bleu de Perls) en périphérie de la lésion à J7 uniquement</li> </ul>									
Souris	C57Bl6	30 / 60	Sinerem®	160	IRM-2h	7T	T2, Gd-T1	J0, J1, J2, J3	(Denes et al. 2007)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas d'hyposignal T2</li> <li>- Réhaussement global de la lésion après injection de Gd à J1, J2 et J3 (injecté en même temps que les USPIO)</li> <li>- Activation de la microglie démontrée par une panoplie de marqueurs immunohistologiques mais infiltration monocytaire quasi-inexistante</li> </ul>									
Rat	SD	60	Resovist®	200	IRM-24h	3T	T2, 3D T2*, Gd-T1	J1 à J5, J6, J8, J10, J14	(Kim et al. 2008)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyposignal T2/T2* transitoire de J3 à J4 dans certaines parties de la lésion</li> <li>- Réhaussement global de la lésion après injection de Gd à J3</li> <li>- Détection des macrophages (ED1) dans la lésion à J3 et J4 ; Détection du Fer (Bleu de Perls) à J3 et J4 en concordance avec les zones en hyposignal T2/T2*, à proximité des vaisseaux sanguins</li> </ul>									
Rat	SHR	30	Endorem®	286	T0-7j	7T	Cartos T2, 3D T2*	J1, J2, J3, J4, J7	(Henning et al. 2009)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyposignal T2/T2* maximal à J4 et constant jusqu'à J7 en périphérie de la lésion</li> <li>- Colocalisation entre marquage non-spécifique des macrophages (ED1) et marquage de la microglie activée (IBA) dans l'ensemble de la lésion ; Colocalisation entre marquage des macrophages bien différenciés (ED2) et marquage du Fer (Bleu de Perls) au niveau des méninges, des plexus choroïdes et des régions péri-vasculaires en zone péri-lésionnelle</li> </ul>									

Tous les modèles d'ischémie cérébrale focale transitoires ont été réalisés avec le modèle de filament intraluminal ; SD- Sprague Dawley ; SHR- Spontaneous hypertensive rat ; T0 = temps au moment de la reperfusion, T0+5h = 5h après la reperfusion ; IRM-24h = 24h avant l'IRM ; Gd-T1 : séquence pondérée avec injection d'un chélate de gadolinium (pour évaluer l'intégrité de la BHE)

**Tableau 4- Synthèse bibliographique de l'IRM réhaussée avec les nanoparticules d'oxyde de Fer dans le modèle d'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)**

### ***Marquage ex vivo des cellules phagocytaires***

L'inconvénient majeur du marquage *in vivo* des macrophages réside dans le fait que l'hypothèse d'une prise en charge exclusive des (U)SPIO par les macrophages est controversée : en effet, une partie des nanoparticules pourrait diffuser passivement dans le cerveau à la faveur d'une rupture de la BHE. Un hyposignal T2/T2\* pourrait alors être attribué à tort à une activation macrophagique dans la région concernée. Cette limite pourrait être surmontée en partie en marquant les cellules avant de les injecter chez l'animal. A notre connaissance, une seule étude a été publiée à ce jour en rapportant l'utilisation de macrophages marqués *ex vivo* chez des rats ischémiés (Engberink et al. 2008). Dans cette étude, 4 rats avaient reçu 5 millions de monocytes marqués avec des SPIO par voie intraveineuse, 5 jours après l'induction de l'ischémie cérébrale par photothrombose. L'IRM a été effectuée à 4,7T avant injection puis 24h, 72h et 120h après. Bien qu'à mon sens l'examen visuel des images pondérées T2\* ainsi que des colorations au bleu de Perls ne soit pas très convaincante, l'analyse quantitative (qui mesure le pourcentage de voxels en hyposignal par rapport à la ligne de base) montre une dynamique de prise de contraste significativement différente en comparaison avec les animaux contrôles (non-injectés ou injectés avec des USPIO libres). D'après les auteurs, les différences observées entre les groupes plaident en faveur d'un processus actif d'infiltration des monocytes marqués dans la lésion. Le biais évident de ce type d'approche provient du fait qu'il n'est pas possible de savoir si le phénomène observé reflète effectivement le comportement des monocytes endogènes.

Enfin, il convient de signaler ici que la vaste majorité des études réalisées en marquant des cellules *ex vivo* chez des animaux présentant une ischémie cérébrale concerne l'utilisation de cellules à des fins thérapeutiques : progéniteurs des zones sous-ventriculaires (Zhang et al. 2003; Jiang et al. 2005; Cicchetti et al. 2007; Athiraman et al. 2009), cellules souches embryonnaires (Hoehn et al. 2002; Modo et al. 2004), mésenchymateuses (Walczak et al. 2008; Lee et al. 2009), dérivées des cellules spléniques (Stroh et al. 2006) ou adipeuses (Rice et al. 2007).

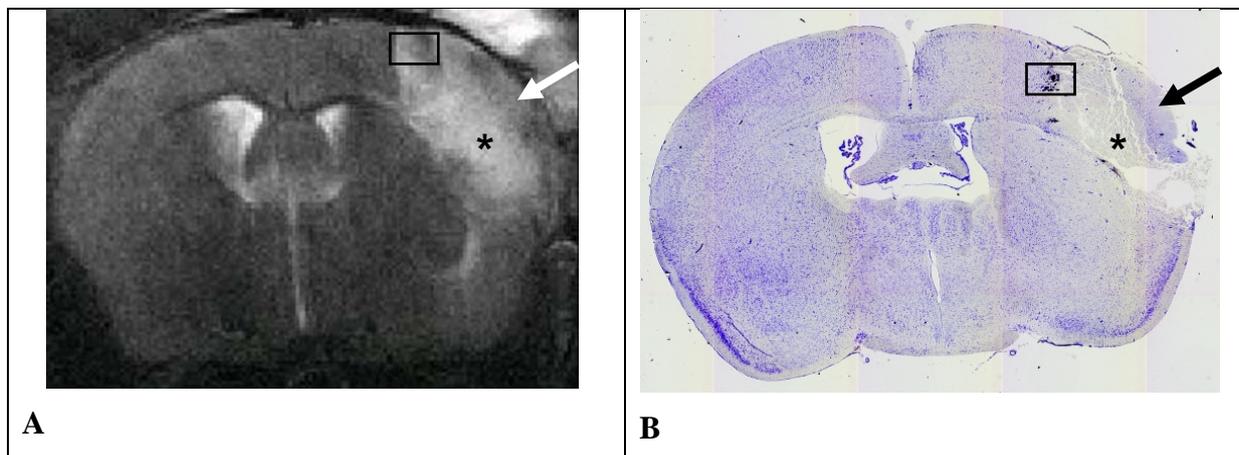
## **3.2. Travaux de recherche**

### ***3.2.1. Rôle des récepteurs nucléaires PPAR au décours de l'ischémie cérébrale***

La première étude que nous avons menée à bien chez le petit animal à notre retour de post-doctorat dans l'équipe Ischémie cérébrale avait pour objectif d'étudier le rôle des récepteurs nucléaires PPAR au décours de l'ischémie cérébrale en IRM, dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Desvergne du Centre de Génomique Intégrative de l'université de Lausanne (Suisse) et de la thèse de science de Jean-Baptiste Pialat (Ingénierie Médicale et Biologique) (Pialat et al. 2007). Des études préalables avaient montré le rôle de protection contre l'inflammation des récepteurs nucléaires PPAR (*Peroxisome Proliferator Activated Receptors*, famille de récepteurs comprenant trois sous-ensembles : PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  et PPAR $\delta/\gamma$ ) (Deplanque et al. 2003; Arsenijevic et al. 2006). Néanmoins, cet effet protecteur n'avait pas été montré de manière longitudinale suite à une ischémie cérébrale. Dans ce contexte, nous avons défini un protocole simple permettant le suivi IRM des lésions chez la souris présentant une occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne. La souris pèse dix fois moins que le rat (volume du cerveau : environ 1 cm<sup>3</sup>), ce qui introduit des difficultés spécifiques pour l'imagerie. L'intérêt de travailler chez la souris plutôt que chez le rat provient du grand nombre de modèles transgéniques disponible pour cet animal, notamment les modèles de souris mutante pour le récepteur PPAR mis à disposition par notre partenaire.

Nous avons travaillé à très haut champ (7T, aimant de la plateforme d'imagerie du petit animal Animage, Cermep, Lyon) afin d'obtenir une résolution spatiale dans le plan inférieure à 100  $\mu\text{m}$  dans un délai d'imagerie raisonnable (3 minutes pour une image pondérée T2 couvrant l'ensemble du cerveau en 15 coupes de 1 mm avec une résolution dans le plan de 78  $\mu\text{m}$ ). Nous avons dans un premier comparé les observations IRM avec l'immunohistologie afin de valider les séquences utilisées pour la mesure du volume de lésion (Figure 24). Enfin, nous avons montré, à l'aide d'une étude longitudinale de 14 jours post-ischémie, que les souris dépourvues de récepteurs PPAR $\alpha$  ou PPAR $\beta$  (souris KO *knock-out*) présentaient un volume lésionnel significativement plus important pour tous les temps post-ischémie (test ANOVA pour les valeurs répétées) que les souris contrôles exprimant le récepteur. Ces résultats suggéraient un rôle neuroprotecteur de PPAR $\alpha$  et PPAR $\beta$  (Pialat et al. 2007), appréhendé pour la première fois à notre connaissance en IRM de manière longitudinale.

La principale limite de cette étude est liée à la différence de fond génétique entre les souris PPAR $\beta$  KO et les souris contrôles, contrairement aux souris PPAR $\alpha$ . Cela est dû à une fragilité placentaire entraînant un fort taux de mort embryonnaire chez les souris PPAR $\beta$  KO et qui empêche les croisements nécessaires à l'établissement d'un fond génétique homogène. Le problème est alors posé de savoir s'il n'existerait pas une cause autre que la mutation du gène PPAR $\beta$  susceptible d'expliquer les différences de taille de lésion, par exemple une petite variation de la configuration artérielle cérébrale (organisation du cercle de Willis, position et diamètre des artères) ou une différence de perfusion cérébrale. Néanmoins, aucune différence n'a été observée dans le système vasculaire entre les souris PPAR $\beta$  KO et les souris contrôles dans l'étude publiée par Arsenijevic et al (Arsenijevic et al. 2006). Une autre limite importante provient du fait que dans notre étude la caractérisation des phénomènes liés aux PPAR était indirecte, basée sur des mesures de volumes lésionnels. L'hypothèse selon laquelle les différences observées seraient en rapport avec la régulation des phénomènes inflammatoires n'est pas donc élucidée par ce type d'approche, d'où l'intérêt de développer une technique IRM dédiée spécifiquement à la détection de la neuroinflammation.



**Figure 24- Correspondance entre la lésion détectée en IRM à J3 et la lésion détectée en histopathologie.**

*A- Imagerie pondérée T2, la lésion apparaît en hypersignal. B- Coloration au Cresyl violet de la même coupe chez le même animal. L'IRM permet de mettre en évidence l'hétérogénéité de la lésion, avec une partie superficielle (flèche) et une partie plus profonde (astérisque). Les régions de signal hypointense à l'intérieur de la lésion (boîte) correspondent à des microhémorragies. Reproduit de (Pialat et al. 2007).*

### 3.2.2. *IRM de la neuroinflammation ischémique chez la souris*

Ces travaux représentent également une partie du travail de thèse de Jean-Baptiste Pialat. L'objectif de cette étude (Wiert et al. 2007c) était double : d'une part, développer et valider une méthode de détection de la neuroinflammation post-ischémique basée sur le marquage *in vivo* des macrophages chez la souris (tous les travaux ayant été publiés chez le rat à ce moment-là), et d'autre part explorer la fenêtre 0h-72h post-ischémie (correspondant à une fenêtre thérapeutique potentiellement plus intéressante comparée aux temps tardifs). Nous avons par conséquent défini un protocole où les USPIO (Ferumoxtran-10, Sinerem®, Guerbet, France) étaient injectés par voie intraveineuse 5h après une occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne par électrocoagulation. Nous avons observé sur les cartographies T2 un hyposignal localisé à la périphérie du foyer lésionnel dans les 12 premières heures post-ischémie, puis dans le corps calleux (fibres de substance blanche connectant les deux hémisphères cérébraux), s'étendant progressivement jusqu'à l'hémisphère opposé à la lésion dans les 72 heures. L'image pondérée T1 acquise en écho de gradient montre quant à elle un hypersignal transitoire dans le corps calleux à 24h, évoluant progressivement en hyposignal aux temps plus tardifs. Les contrôles histologiques retrouvaient dans ces mêmes régions la présence de cellules macrophagiques activées avec du Fer en situation intracellulaire (Figure 25). Ces données représentent à notre connaissance les premières preuves de concept de l'imagerie cellulaire de l'inflammation post-ischémique chez la souris au niveau international, ouvrant la voie à l'étude des souris transgéniques.

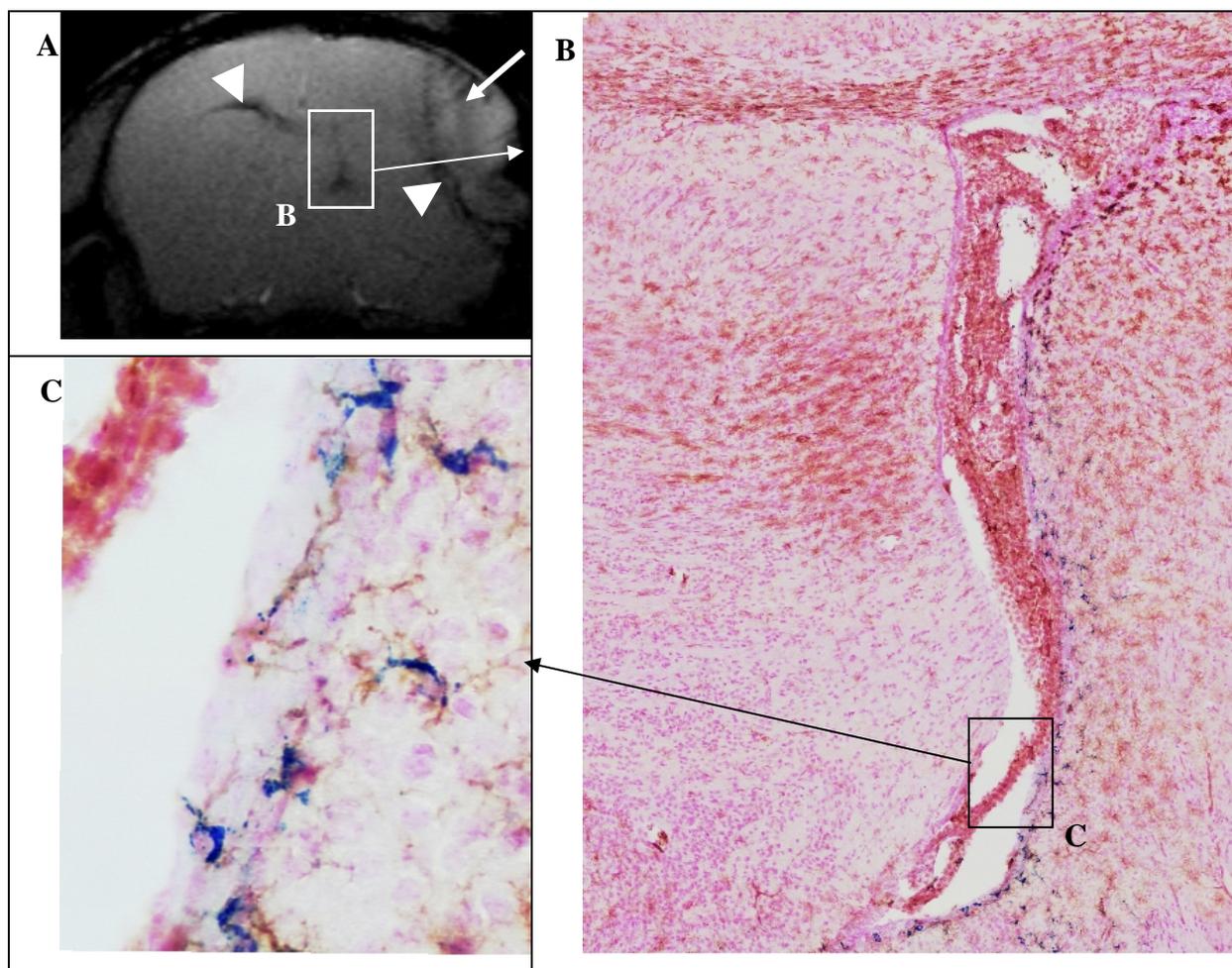
Les résultats montrant la présence d'un hyposignal en périphérie de la lésion sont concordants avec ceux observés par les autres équipes chez le rat (Rausch et al. 2001; Saleh et al. 2004b; Kleinschnitz et al. 2005). En revanche, les variations de signal mises en évidence à distance du foyer de nécrose (dans le corps calleux notamment, avec des anomalies y compris au niveau de l'hémisphère controlatéral), et correspondant immunohistologiquement à une activation macrophagique, n'avaient encore jamais été décrites à notre connaissance en IRM. D'autres moyens d'investigation tels que l'analyse histologique (Rupalla et al. 1998; Schroeter et al. 1999) ou plus récemment le PET scan (Gerhard et al. 2005), avaient en revanche déjà démontré l'existence de cette inflammation cérébrale « globale », intervenant en réaction à la lésion. Plus récemment, une activation microgliale précoce a été rapportée dans un modèle d'ischémie transitoire chez la souris, au niveau du corps calleux et de la paroi du ventricule latéral ipsilatéral, en accord avec nos résultats (Denes et al. 2007). Les mécanismes de marquages des cellules phagocytaires par les USPIO dans les régions extra-lésionnelles mériteraient cependant d'être clarifiés : en effet, il ne devrait pas y avoir d'infiltration monocytaire ni de rupture de barrière en dehors de la lésion. Nous reviendrons sur ces questions dans la discussion des deux études réalisées ultérieurement.

Cette étude présente un certain nombre de limites. Il existe en effet des facteurs confondants dans l'interprétation des signaux RM liées aux USPIO : nanoparticules circulantes ou « piégées » dans les vaisseaux sanguins, diffusion passive des USPIO à travers une BHE endommagée, microhémorragies, accumulation de Fer endogène dans les macrophages... Bendszus *et al* (Bendszus et al. 2007) ont par exemple argumenté que les hyposignaux détectés en périphérie de la lésion pourraient provenir de la formation de microthrombi. Cette hypothèse nous semble plausible puisque nous avons également obtenu un marquage au bleu de Perls dans les vaisseaux sanguins dans cette région aux stades précoces (<12h), en accord avec leurs observations (Wiert et al. 2007b). Néanmoins notre modèle est différent du modèle de photothrombose utilisé par cette équipe, de même que les nanoparticules de Fer utilisées (USPIO vs SPIO). L'avantage des USPIO par rapport aux SPIO provient du fait qu'elles ne sont pas immédiatement reconnues par le système phagocytaire mononucléé (foie, rate). Leur demi-vie plasmatique est par conséquent plus

longue, ce qui permet de cibler des tissus moins facilement accessibles tels que le cerveau. A l'inverse, leur petite taille pourrait dans un même temps favoriser leur extravasation cérébrale en cas de dommages de la BHE. Si une rupture de barrière a bel et bien été démontrée en périphérie de la lésion en imagerie T1 couplée à l'administration d'un chélate de gadolinium, il s'est en revanche révélé difficile de mettre en évidence la présence de Fer libre à l'aide du bleu de Perls (c'est-à-dire une coloration non associée à des noyaux ou à des vaisseaux sanguin). Cela pourrait provenir de la préparation des cerveaux (la perfusion par le paraformaldéhyde étant susceptible de « laver » les particules libres du parenchyme cérébral en cas de BHE endommagée), mais aussi de limites intrinsèque à la technique du bleu de Perls, qui est connue pour être une méthode peu sensible (Schroeter et al. 2004). Certains auteurs ont également avancé le fait que l'enrobage de la nanoparticule serait un obstacle à la détection de l'ion ferrique par le bleu de Perls, d'où une plus grande sensibilité après internalisation cellulaire et dégradation de cet enrobage (Rausch et al. 2002). Sur la base de nos résultats, il n'a donc pas été possible de conclure avec certitude quant à la biodistribution (intravasculaire, interstitielle ou intracellulaire) des nanoparticules de Fer aux stades précoces de l'ischémie (<24h).

Même dans le cas d'une localisation intraphagocytaire, la question se pose concernant la nature des cellules impliquées. En effet, dans ce modèle, l'activation microgliale débute à la 3<sup>ème</sup> heure post-ischémie tandis que l'infiltration de monocytes n'est pas détectée avant 24h, et reste relativement faible en comparaison de l'activité microgliale pendant les 3 premiers jours (Tanaka et al. 2003). L'IRM, tout comme l'immunohistologie, ne permet pas de déterminer si les cellules marquées par les nanoparticules d'oxyde de Fer correspondent à cellules phagocytaires résidentes (qui aurait ingéré les USPIO suite à leur extravasation) ou à des macrophages périphériques (ou les deux). Cela constitue la principale limite de notre approche, puisque le rôle de ces deux sous-types cellulaires pourrait être différent. Une fois de plus, c'est le problème de la perméabilité de la BHE aux USPIO qui est principalement en cause, puisque qu'en présence d'une BHE intacte les USPIO ne se retrouvent pas dans le cerveau et par conséquent ont moins de chance de marquer les macrophages résidents. Des modèles d'ischémie cérébrale focale moins agressifs, tels que la photothrombose ou les modèles utilisant un filament intraluminal, pourraient par conséquent être mieux adaptés pour étudier plus spécifiquement l'infiltration monocyttaire à l'aide des USPIO. Cependant le modèle de photothrombose n'induit pas de zone de pénombre et présente par conséquent un intérêt limité pour l'évaluation des thérapies neuroprotectrices. Par ailleurs, il est intéressant d'établir un parallèle entre notre étude et l'étude publiée au même moment dans la même fenêtre horaire dans un modèle transitoire chez la souris, où l'infiltration monocyttaire n'était détectée que de manière marginale en immunohistologie, et pas du tout en IRM réhaussée avec les USPIO (Schroeter et al. 2004). Cela renforce de manière indirecte l'hypothèse de l'entrée dans le cerveau d'une grande partie des (U)SPIO en raison d'altérations de la BHE dans notre étude. La différence principale avec les travaux pré-cités résidait dans la dose de Fer que nous avons utilisée, qui était 12 fois plus élevée, et par conséquent beaucoup plus propice à un ciblage des tissus moins accessibles tels que le cerveau.

Mais ces réserves concernant l'identification formelle du type de macrophage impliqué ne doivent pas faire oublier que la possibilité de cartographier en IRM la distribution des cellules phagocytaires à J2 et J3 après l'ischémie représente en soit un résultat important, qui pourrait avoir des implications pour l'évaluation de nouvelles thérapeutiques.



**Figure 25- IRM réhaussé avec les USPIO et immunohistologie 72h post-ischémie.**

A- IRM d'un cerveau de souris, 72h après l'induction de l'ischémie (flèche) et l'injection intraveineuse de nanoparticules de Fer. Noter l'hyposignal en périphérie de la lésion, le long du ventricule latéral du côté de la lésion et dans le corps calleux du côté opposé à la lésion (têtes de flèche). B- Coupe histologique correspondant à la boîte dans A, après sacrifice de l'animal. Les cellules marrons représentent les macrophages activés (immunomarquage F4/80), la coloration bleu indique la présence de Fer (Bleu de Perls). Noter la co-localisation des macrophages activés contenant du Fer avec l'hyposignal RM. C- Agrandissement de la boîte dans B, démontrant l'intracellularité du Fer, associé aux cellules macrophagiques (marrons) dont la morphologie amiboïde est caractéristique de leur état d'activation et de leur capacité de migration. Reproduit de (Wiert et al. 2007c).

### 3.2.3. *Interprétation des signaux RM précoces liés aux USPIO*

Ces travaux ont été réalisés par Virginie Desestret dans le cadre de sa thèse de Neurosciences (Desestret et al. 2009). Nous nous sommes intéressés dans cette étude à l'interprétation des signaux RM liés aux USPIO dans les premières 24h post-ischémie, afin de tester l'hypothèse d'une entrée des USPIO dans le cerveau à la faveur de la rupture de la BHE. Pour cela, nous avons confronté les modifications du signal RM et la distribution histologique du Fer (bleu de Perls sur cerveaux perfusés ou congelés) et des cellules phagocytaires (immunomarquage F4/80) à 6h et 24h après occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne chez la souris. Parallèlement, la BHE a été évaluée de manière longitudinale en IRM (séquence pondérée T1 couplée à l'injection d'un chélate de gadolinium) et à l'aide d'une approche histologique séquentielle. Enfin, des prélèvements sanguins ont été réalisés à différents temps afin de rechercher des monocytes circulants ayant phagocyté le produit de contraste.

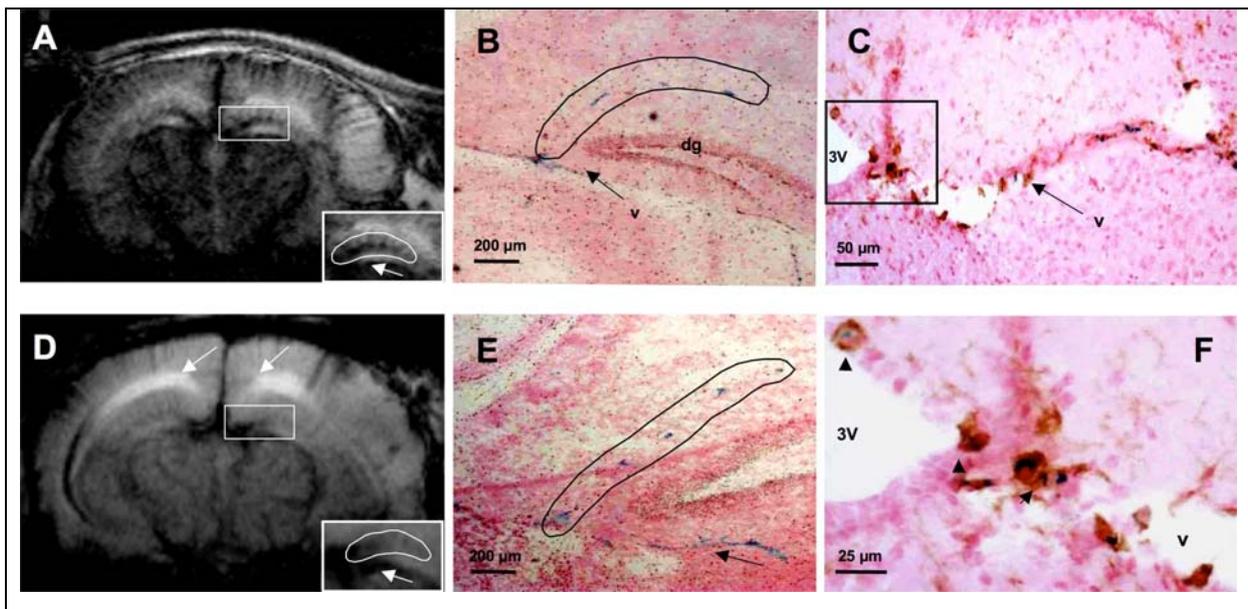
L'intérêt de ce protocole est qu'il permet d'écarter l'hypothèse de l'infiltration par des macrophages périphériques, sur la base d'arguments chronologiques (celle-ci n'étant pas intervenir dans les première 2 heures post-ischémie). D'après le mécanisme couramment admis (captation des USPIO par le système mononucléé phagocytaire, clairance du secteur vasculaire lors des premières 24 heures, puis migration au sein des tissus lésés de monocytes périphériques marqués magnétiquement), les USPIO devraient donc se retrouver à ce stade exclusivement dans les vaisseaux sanguins : soit sous une forme libre (en raison de leur longue rémanence vasculaire), soit en périphérie de la lésion dans des microthrombi en formation, soit dans les monocytes sanguins. De même que pour l'étude précédente, un marquage intravasculaire au bleu de Perls a bien été détecté en périphérie de la lésion, sans qu'il ne soit toutefois possible de déterminer la distribution exacte des nanoparticules d'oxyde de Fer (dans le plasma, dans les cellules dans les vaisseaux ou des vaisseaux, dans des thrombi...). En revanche, aucun marquage n'a été retrouvé dans les monocytes circulants analysés à partir de prélèvements sanguins. Ce résultat va à l'encontre d'une étude réalisée avec le même produit de contraste chez les patients présentant une sclérose en plaque (Vellinga et al. 2008). Néanmoins, dans cette étude, la proportion de macrophages marqués, tout comme l'intensité du marquage, était très faibles. Ce faible marquage se retrouve également dans nos résultats *in vitro* où des macrophages dérivés de la moelle osseuse ont été incubés avec des USPIO à la concentration plasmatique.

Nous avons observé de surcroît des colorations au bleu de Perls extravasculaires, bien que de manière très marginale : d'une part du Fer libre en périphérie de la lésion et d'autre part du Fer internalisé dans des cellules phagocytaires. La détection de Fer libre était éparse et rendue plus évidente par la congélation des cerveaux en comparaison avec la technique consistant à perfuser le cerveau avant sacrifice. Engbering et al (Engberink et al. 2008) représente la seule équipe à notre connaissance rapportant également la présence de Fer libre après injection intraveineuse de USPIO au sein d'une lésion ischémique (il est à noter que les cerveaux étaient aussi préparés par congélation). Cependant, dans notre étude, toutes les modifications de signal RM n'étaient pas parallélisées par un marquage au bleu de Perls. En particulier, les hypersignaux T1 retrouvés dans le corps calleux à 24h (en accord avec l'étude précédente) ne correspondaient à aucune coloration, alors que cet hypersignal n'était pas observé chez les souris contrôles (opérées non injectées). Nous avons déjà noté ce phénomène lors de l'étude précédente (Wiart et al. 2007c). L'hypothèse que nous avons avancée alors était que pour produire un hypersignal T1 à haut champ (7T), les particules devaient être libres, en interaction avec les protons du milieu environnant, plutôt qu'internalisées. Cette hypothèse n'a toujours pas pu être vérifiée dans cette nouvelle étude, pour les mêmes raisons techniques liées au bleu de Perls. Néanmoins, elle est étayée par un

nouvel argument : la progression d'un milieu œdémateux au niveau du corps calleux à partir du côté ipsilatéral vers le côté controlatéral. Ce phénomène, qui est appuyé par des considérations mécanistiques (il permettrait la résorption de l'œdème vasogénique), a été mis en évidence dans notre étude par la progression d'un hypersignal sur les images pondérées T2 acquises chez les animaux contrôles (n'ayant pas reçu de USPIO), retrouvée à l'identique sur les analyses histologiques des IgG (macromolécules plasmatiques qui ne se retrouvent pas dans le parenchyme cérébral si la BHE est intacte). Les USPIO ayant diffusés dans la lésion suite aux dommages de la BHE pourraient donc se retrouver transportés par ce flux œdémateux et être internalisés dans un second temps en raison de l'activation microgliale dans cette région. Nous reviendrons dans la partie suivante sur les arguments IRM allant également dans le sens de cette interprétation. Une façon de résoudre la question de la compartimentalisation ou non des USPIO à ce stade serait de réaliser une analyse par microscopie électronique. Il s'agit de l'une de nos perspectives, avec la thèse de Marilena Marinescu actuellement en cours.

Les rares cellules macrophagiques ayant phagocyté précocement les USPIO ont été retrouvés dans des localisations particulières, à proximité des régions baignées par le liquide céphalo-rachidien (LCR). Il s'agit par conséquent vraisemblablement de macrophages résidents tels que les macrophages méningés et périvasculaires. Il convient de préciser que ces cellules étaient également présentes chez les souris opérées mais non injectées, ce qui laisse supposer que leur activation n'était pas une réaction à l'injection des USPIO. Le LCR apparaît donc comme une voie de diffusion potentielle des USPIO dans le parenchyme cérébral suite à une ischémie. Cette voie a d'ailleurs été utilisée avec succès pour marquer les cellules progénitrices des zones sous-ventriculaires et suivre leur migration dans le bulbe olfactif chez des rats adultes (Shapiro et al. 2006; Sumner et al. 2009) et dans un modèle d'hypoxie-ischémie chez le rat nouveau-né (Yang et al. 2008), à l'aide de l'injection de MPIOs (*microsized particles of iron oxides*) en intra-ventriculaire. Henning et al (Henning et al. 2009) ont récemment publié une étude chez le rat hypertendu avec un modèle d'ischémie-reperfusion montrant l'implication précoce des macrophages périvasculaires, méningés et associés aux plexus choroïdes. Un rôle central de cette population particulière de macrophages résidents du système nerveux central a par ailleurs été mis en évidence dans d'autres pathologies neuroinflammatoires, telles que la sclérose en plaque et ses modèles expérimentaux (EAE) (Polfliet et al. 2001).

Ainsi, à la phase aigüe et subaigüe de l'ischémie cérébrale, avec le modèle d'occlusion permanente par électrocoagulation utilisé dans notre étude, il semble que les USPIO se retrouvent dans le cerveau via une perturbation des barrières sang/LCR/cerveau, y compris à distance de la lésion ischémique, et impliquant une sous-population phagocytaire particulière au niveau de ces barrières. La mise en évidence d'une entrée non spécifique des nanoparticules d'oxyde de Fer dans le parenchyme cérébral ischémié pourrait remettre en cause en partie l'interprétation des images plus tardives, puisqu'une prise en charge locale par la microglie activée des USPIO ayant librement diffusé est également envisageable. L'élucidation de ces mécanismes est cruciale pour que la méthode puisse être appliquée en clinique à grande échelle. Au niveau IRM, l'approche pourrait être améliorée de deux manières : d'une part en développant des séquences capables de discriminer les USPIO libres des USPIO internalisés par les cellules et d'autre part, en quantifiant l'intensité de la réponse macrophagique.



**Figure 26- IRM réhaussé avec les USPIO, et immunohistologie 6h et 24h post-ischémie.**

A) Coupe axiale écho de gradient pondérée T1 à 6h post-ischémie. L'insert montre un agrandissement de la boîte placée sur le 3<sup>ème</sup> ventricule et l'hippocampe, avec la couche moléculaire et lacunaire de l'hippocampe encerclée et le velum interpositum pointé par une flèche qui apparaissent en hyposignal (voir histologie en B) ; B) La coloration au bleu de Perls révèle la présence de Fer dans les vaisseaux de la couche moléculaire et lacunaire de l'hippocampe et dans le velum interpositum. C) Le double marquage bleu de Perls et F4/80 pour les macrophages montre de rares macrophages marqués au Fer dans la zone périépendymaire du 3<sup>ème</sup> ventricule. D-E) Mêmes images que A-C à 24h post-ischémie. Noter le corps calleux apparaissant en hypersignal à 24h post-ischémie (flèches). dg- dentatus gyrus, v- velum interpositum, 3V- 3<sup>ème</sup> ventricule. Reproduit de (Desestret et al. 2009).

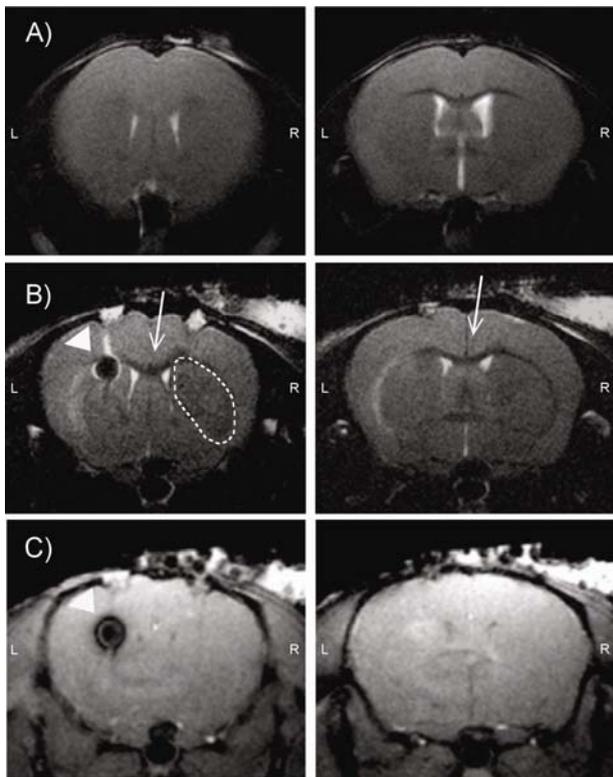
### 3.2.4. Quantification du signal RM des USPIO

Ces travaux ont été réalisés par Jean-Christophe Brisset dans le cadre de sa thèse d'Ingénierie Médicale et Biologique (Brisset et al. 2009). L'objectif était de mesurer l'effet de l'internalisation des USPIO dans les macrophages sur les propriétés de relaxivité T1, T2 et T2\* en IRM à haut champ (4,7T et 7T). Deux produits de contraste ont été évalués : le Ferumoxtran-10 (Sinerem®, Guerbet, France) et les NPMA (nanoparticules de maghémite anioniques, UMR CNRS 7612, France). L'étude a été menée sur des fantômes d'agarose contenant des USPIO libres ou des macrophages (issus de cultures primaires de moelle osseuse) marqués avec les USPIO, à différentes concentrations, ainsi que sur des souris injectées avec des macrophages marqués en intra-cérébral de manière stéréotaxique. L'étude *in vitro* a montré que la relation entre la concentration en Fer et les relaxivités respectives r1, r2 et r2\* était linéaire dans une gamme allant de 0 à 36 mM. La relaxivité r1 du Ferumoxtran-10 libre diminuait considérablement entre 4,7T et 7T, tandis que la relaxivité r2 diminuait modérément, en accord avec le profil NMRD (Corot et al. 2006). Le même résultat a été retrouvé pour les NPMA libres, mais avec une diminution encore plus marquée. Pour un champ donné, l'internalisation des USPIO entraînait une diminution des relaxivités r1 et r2 et une augmentation des relaxivités r2\*. Ces résultats étaient en accord avec ceux publiés aux champs cliniques de 1,5T et 3T (Billotey et al. 2003; Simon et al. 2006). L'étude *in vivo* a mis en évidence une adéquation relative entre la mesure quantitative du T2 et le nombre de cellules injectées. Ces résultats obtenus sur un petit nombre d'animaux (N=4) sont très préliminaires et actuellement complétés par une étude incluant un plus grand nombre de souris et une gamme de concentration plus étendue.

L'analyse quantitative représente l'un des objectifs encore non atteint de l'IRM réhaussée avec les USPIO pour le suivi de l'inflammation et des thérapeutiques ciblant la réponse inflammatoire. Les études *in vitro* présentent des limites évidentes pour aborder ce problème : le signal RM étant très dépendant du micro-environnement (distribution des nanoparticules, densité des protons environnants, température, macromolécules, etc), il est fort probable que les valeurs mesurées dans des tubes d'agarose ne reflètent pas fidèlement la situation *in vivo*. Néanmoins, les études *in vitro* présentent l'avantage de permettre l'étude de l'effet de la concentration, de la compartimentalisation, et de la nature de la nanoparticule d'oxyde de Fer, sur les propriétés du signal RM dans des conditions contrôlées. Le développement d'un modèle *in vivo* pour l'étude de ces propriétés apparaît particulièrement complexe. Nous avons injecté des particules libres et des macrophages marqués dans le cerveau de souris saines de manière stéréotaxique, mais il s'est avéré que les particules libres diffusaient rapidement dans le parenchyme, rendant difficile la définition de régions d'intérêt pour la quantification. En dépit des limites évoquées, le résultat suggérant qu'il serait possible de déduire l'ordre de grandeur du nombre de cellules présentes dans le cerveau à partir de la valeur du T2 (en se basant sur les courbes de calibration obtenues *in vitro*) est encourageant. Cependant l'utilisation d'une telle approche impose de savoir si les hyposignaux sont liés à du Fer internalisé ou à des particules libres (puisque les courbes de calibration diffèrent en fonction de la compartimentalisation de l'agent de contraste).

Au cours de cette première étude, nous avons évalué des séquences conventionnelles (écho de spin et écho de gradient, pondérées T1 ou T2/T2\*) pour voir s'il était possible de déterminer la compartimentalisation des USPIO en se basant sur des différences de signal RM. Il a été intéressant de noter que les USPIO libres produisaient un hypersignal sur la séquence écho de gradient T1 et que les USPIO internalisés par les macrophages produisaient un hyposignal sur la même séquence, en raison des artefacts de susceptibilité magnétique générés par la compartimentalisation. Cela allait dans le sens de notre interprétation des données *in vivo* dans le corps calleux, avec une première phase d'hypersignal (24h post-

ischémie), qui pourrait correspondre à des particules libres, et une deuxième phase d'hyposignal, correspondant à des particules ingérés par les macrophages. De plus, à 7T, l'internalisation des USPIO avait pour effet d'abolir la relaxivité  $r_1$  (*quench*). Cependant l'étude *in vivo* n'a pas pu reproduire ce résultat, et ce malgré l'apparition d'un hyposignal T2 le long du corps calleux du côté de l'injection des particules libres chez l'une des souris : l'imagerie pondérée T1 en écho de gradient ne montrait quant à elle aucun changement de signal en comparaison avec les souris contrôle (*Figure 27*). La différence avec les études expérimentales menées précédemment est que les souris étaient ici saines et non ischémisées. Il est possible que l'effet T1 observé chez les souris ischémisées provenait du fait que le corps calleux était beaucoup plus riche en eau que chez les souris saines, en raison de l'œdème provoqué par la lésion. A l'inverse, le fait que les particules libres ne soient pas détectées sur cette séquence est plutôt prometteur, car cela confirme le fait que l'IRM serait beaucoup plus sensible aux USPIO quand ils sont compartimentalisés, c'est-à-dire quand ils marquent la réaction inflammatoire.



**Figure 27- Injections stéréotaxiques d'USPIO libres et de macrophages marqués avec les USPIO dans le cerveau de la souris saine**

A) Deux coupes consécutives obtenues en imagerie pondérée T2 chez une souris contrôle injectée avec du sérum physiologique dans l'hémisphère droit et des cellules non marquées dans l'hémisphère gauche.

B) Mêmes niveaux de coupe en pondération T2 chez une souris injectée avec des USPIO libres à droite et des macrophages marqués à la même concentration à gauche. Noter la dispersion des USPIO libres dans le striatum et le faible effet T2 résultant (pointillés) en regard de l'hyposignal franc généré par les macrophages marqués (tête de flèche). La flèche indique un hyposignal le long du corps calleux vraisemblablement dû à la diffusion des particules libres.

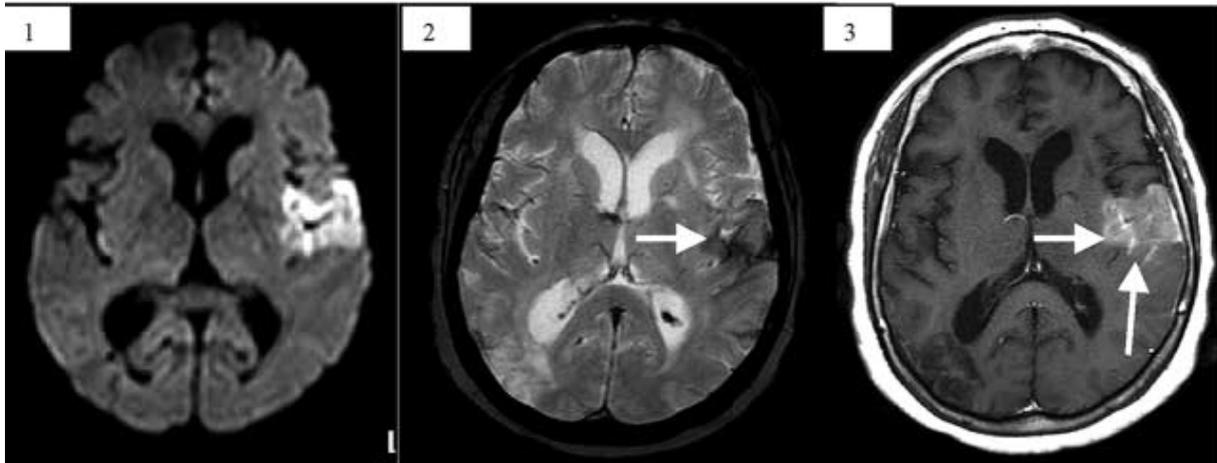
C) Mêmes niveaux de coupe en pondération T1 chez la même souris qu'en B. Les particules libres ne sont visibles ni dans le striatum, ni dans le corps calleux tandis que les macrophages marqués génèrent un artefact typique en incidence axiale (« cible »).

R- right et L- left. Reproduit de (Brisset et al. 2009).

L'étape suivante va consister à s'intéresser aux séquences de contraste positif pour la détection des macrophages marqués, qui exploitent les distorsions de champ magnétique induites par un fort gradient de susceptibilité magnétique (Mani et al. 2006). Ce travail est en cours et ne sera pas détaillé ici. Il constitue la deuxième partie de la thèse de Jean-Christophe Brisset.

### 3.2.5. Translation clinique de la technique IRM réhaussée avec les USPIO

L'approche expérimentale a été complétée par deux études cliniques, les nanoparticules de Fer utilisée (Sinerem® du laboratoire Guerbet, Aulnay-sous-bois, France) pouvant être administrées chez l'Homme. Ces travaux représentent une partie du travail de thèse de sciences (Ingénierie Médicale et Biologique) de Tae-Hee Cho. Dans la première étude (Nighoghossian et al. 2007), les USPIO étaient injectés 6 jours après l'AVC ischémique, et l'IRM était réalisée 72h après l'injection. Chez les 10 patients inclus, la réponse aux USPIO était hétérogène et ne semblait pas déterminée par le volume de la lésion initiale. De même que pour l'étude clinique de Saleh *et al* (Saleh et al. 2004a), un réhaussement parenchymateux sur les images pondérées T1 a été observé dans la majorité des cas (9 patients sur 10), tandis que les effets T2/T2\* n'étaient pas observés systématiquement (5 patients sur 10) (Figure 28). Par ailleurs, il n'y avait pas de relation entre les régions présentant une rupture de barrière évaluée par la prise de contraste avec un chélate de gadolinium et les régions présentant une prise de contraste due aux USPIO : par exemple 3 patients sans rupture de barrière ont présenté un réhaussement T1 suite à l'injection de USPIO, tandis qu'un patient avec une rupture de barrière sévère n'a pas présenté de changements de signal liés aux USPIO. Dans la seconde étude (Cho et al. 2007), les USPIO étaient injectés 2 jours après la survenue des symptômes et l'IRM réalisée 48h après l'injection. Un hypersignal T1 a été observé dans la lésion chez un seul patient parmi les 5 inclus dans l'étude. Ce patient présentait une rupture de la BHE évaluée par l'injection d'un produit de contraste à base de gadolinium, plus étendue que le volume de réhaussement T1 lié aux USPIO. Ces résultats confirment ceux obtenus par nos collègues allemands dans une fenêtre d'exploration plus précoce, avec une proportion moindre de réponses aux USPIO (Saleh et al. 2007).



**Figure 28- IRM réhaussée avec les USPIO : étude clinique**

1) Imagerie de diffusion chez une patiente présentant un AVC, 6 jours après la survenue des symptômes (lésion en hypersignal) avant l'injection de USPIO ; 2) Imagerie pondérée T2\* à J9 (3 jours après l'injection de USPIO) ; 3) Imagerie pondérée T1 à J9. Noter les prises de contraste liées aux USPIO (flèches).

L'interprétation des images chez les patients est basée en grande partie sur les données expérimentales. Puisque les USPIO ont été retrouvés dans les macrophages suite à une ischémie cérébrale, les changements de signaux observés chez les patients pourraient par conséquent refléter la réponse neuroinflammatoire post-ischémique. Il existe cependant plusieurs obstacles à une translation directe du petit animal à l'homme. D'abord se pose la question de la représentativité du modèle animal par rapport à la pathologie humaine. Ensuite

se pose la question de la fenêtre d'exploration : en effet, dans une perspective de traitement, il est plus attrayant d'intervenir dans les premiers jours, voire les premières heures, suivant la survenue des symptômes, d'où le nombre d'études expérimentales réalisées aux stades aigu et subaigu. Cependant, ces protocoles ne sont pas toujours transposables chez l'Homme. Enfin se pose le problème de l'interprétation des signaux RM en fonction du champ utilisé. Les expérimentations chez l'animal sont effectuées à très haut champ en comparaison avec les études cliniques, ce qui influence évidemment les propriétés de relaxation. Cela pourrait expliquer la raison pour laquelle toutes les études expérimentales détectent des chutes de signal liés aux effets T2\*, tandis que les études cliniques retrouvent plutôt des réhaussements de signal liés aux effets T1. Par ailleurs, il semble que les USPIO internalisés dans les cellules soient effectivement détectables par effet T1 à 1,5T (Daldrup-Link et al. 2003). Cela montre l'intérêt de compléter les études expérimentales par des études à plus bas champs (2T ou 1,5T). De plus, une meilleure compréhension des mécanismes d'entrée des USPIO dans le cerveau ischémié pourrait aider à mieux définir les protocoles cliniques, tandis que le développement de séquences dédiées à la détection et à la quantification des macrophages internalisés devrait faciliter l'interprétation et l'analyse longitudinale des images. Autant d'objectifs qui constituent les perspectives de notre travail.

### 3.3. Perspectives

Au cours de ces 4 dernières années, nous avons développé et validé une méthode d'évaluation de la neuroinflammation post-ischémique chez la souris, et nous avons contribué à l'interprétation des protocoles cliniques utilisant la même approche. Pour les années à venir, nous entendons poursuivre notre travail dans le domaine de l'**imagerie cellulaire** de l'**AVC** selon 2 axes :

- 1) Marquage *in vivo* des macrophages : en travaillant sur la **détection** des macrophages marqués magnétiquement, la **quantification** de l'intensité de la réponse, l'évaluation de **traitements visant à réduire la réaction inflammatoire**, ainsi que la **biotransformation** des USPIO ;
- 2) Marquage *ex vivo* des macrophages : en travaillant sur le **suivi longitudinal** de **petites quantités de cellules** dans le cerveau, et sur la relation entre l'administration de macrophages et l'évolution des lésions ischémiques.

## 4. Perspectives de recherche

Notre objectif principal pour le prochain quadriennal est d'étudier le rôle des macrophages au décours de l'ischémie cérébrale (**imagerie cellulaire**) et d'évaluer des stratégies de neuroprotection (**imagerie pharmacologique**), à l'aide de techniques d'imagerie et de produits de contraste innovants - l'objectif à long terme étant de coupler les deux approches. Dans cette perspective, nous avons défini quatre actions de recherche, impliquant trois étudiants en thèse et un post-doctorant, dont j'assure le co-encadrement :

### 1) Thèse de Tae-Hee Cho (2007-2010, HCL)

Directeur de thèse : Pr Nighoghossian

L'objectif est d'évaluer chez le rongeur l'impact neuroprotecteur de l'AceDoPC, une nouvelle forme de l'acide docosahexaénoïque (DHA ou oméga-3 d'origine animale) brevetée en 2006 par l'équipe du Pr Lagarde (U870 Inserm). En effet, il a été montré que le DHA avait des propriétés neuroprotectrices suite à une ischémie cérébrale (Belayev et al. 2005; Belayev et al. 2009). L'AceDoPC pourrait avoir un effet renforcé, car son statut lipophile permet un plus grand transport dans le cerveau. Cet effet sera évalué à l'aide d'une étude randomisée, en utilisant l'IRM multimodale pour sélectionner les animaux, normaliser les lésions au regard de la zone à risque de nécrose et suivre leur évolution de manière non invasive. Les cerveaux seront analysés en *post-mortem* afin d'analyser la réaction inflammatoire dans le groupe traité et non traité, et de doser la Neuroprotectin D1, un métabolite neuroprotecteur du DHA. Une première étude comparant les effets de l'injection de DHA avec l'injection de sérum physiologique a montré une diminution des tailles de lésion mesurées en IRM, ainsi qu'une amélioration des scores neurologiques (travaux faisant l'objet d'une présentation orale au congrès de l'ESMRMB 2009<sup>1</sup> et d'un poster au congrès du WMI 2009<sup>2</sup>).

#### Collaborations :

U870 Inserm, Lyon (Michel Lagarde)

#### Financement :

ANR PNRA NEUROPROTECT 2008-2010

<sup>1</sup>Fabien Chauveau, Tae-Hee Cho, Adrien Riou, Pierre Aguetz, Madeleine Picq, Michel Lagarde, Yves Berthezène, Norbert Nighoghossian, Marlène Wiart. MRI evaluation of the neuroprotective effect of docosahexanoic acid after stroke. In: ESMRMB congress; 2009, October, 1<sup>th</sup>-3<sup>th</sup>, Antalya, Turkey.

<sup>2</sup>Fabien Chauveau, Tae-Hee Cho, Adrien Riou, Pierre Aguetz, Madeleine Picq, Michel Lagarde, Yves Berthezène, Norbert Nighoghossian, Marlène Wiart. MRI evaluation of the neuroprotective effect of docosahexanoic acid after stroke. In: *World Molecular Imaging Congress*; 2009, September 23<sup>th</sup>-26<sup>th</sup>, Montreal, Canada.

## 2) Thèse d'Adrien Riou (2008-2011, Allocation Doctorale de Recherche du Cluster 11 « Handicap Vieillessement Neurosciences » de la région Rhône Alpes)

Directeur de thèse : Pr Berthezène

L'objectif est de valider une stratégie de thérapie cellulaire basée sur l'activation M2 des macrophages dérivés de la moelle osseuse, dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat. Les macrophages M2 présentent des propriétés anti-inflammatoires car ils produisent des facteurs tels que IL-10, TGF- $\beta$  et IL-1Ra. Ils sont également impliqués dans l'angiogenèse et ont des capacités de réparation et de remodelage du tissu endommagé. Spécifiquement, le but est d'injecter par voie intra-artérielle des macrophages M2 marqués magnétiquement avec les NPMA, puis de les suivre en IRM à différents temps post-injection afin de déterminer : (i) la migration cellulaire, (2) la modulation de la réaction inflammatoire (diminution, augmentation ou absence d'effet) et (3) le devenir des lésions ischémiques. L'effet neuroprotecteur sera de plus évalué par des tests neurologiques et les cerveaux analysés en immunohistologie à la fin de l'expérience. Les résultats préliminaires obtenus lors de la première année de thèse ont montré la faisabilité du protocole (*Figure 29*).

Financement :

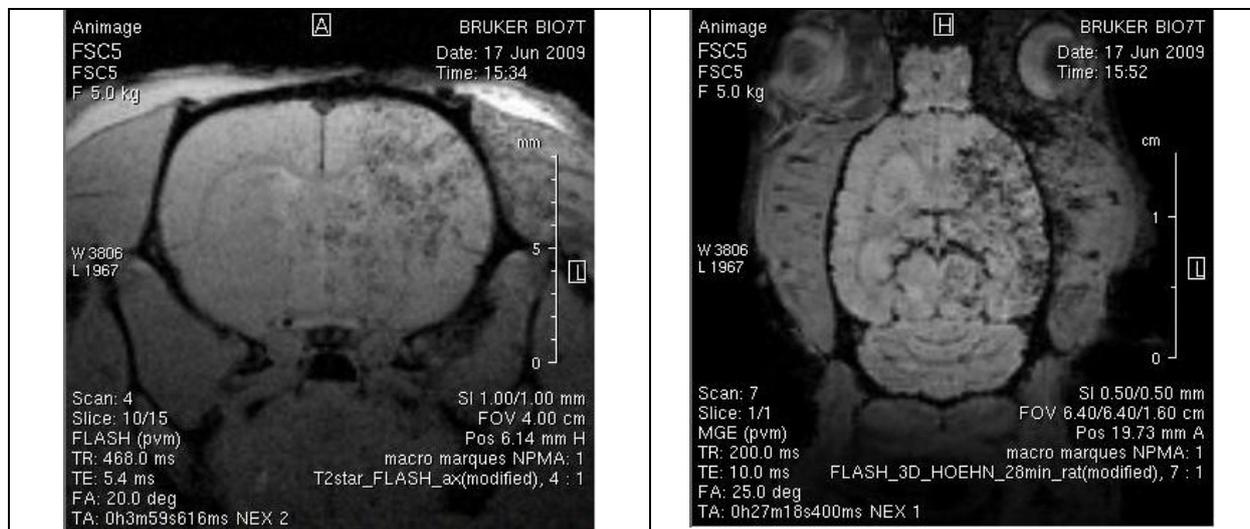
ANR TecSan INFLAM 2007-2010

Collaborations :

U842 Inserm, Lyon : Serge Nataf, Jérôme Honnorat

UMR CNRS 7612, Paris : Christine Ménager

U836 Inserm, Grenoble : Emmanuel Barbier, Chantal Rémy



**Figure 29- IRM pondérée T2\* suite à l'injection de macrophages marqués dans un modèle d'ischémie- reperfusion chez un rat**

*Incidence axiale (droite, imagerie multicoupe) et coronale (gauche, imagerie 3D). Noter les hyposignaux liés à la présence de macrophages marqués avec les NPMA dans l'hémisphère droit du côté de la lésion.*

### 3) Thèse de Marilena Marinescu (2008-2011, Allocation Doctorale de Recherche du Ministère de la Recherche et de la Technologie)

Directeur de thèse : Pr Berthezène, en co-encadrement avec Mme Blanchin (UMR CNRS 5586)

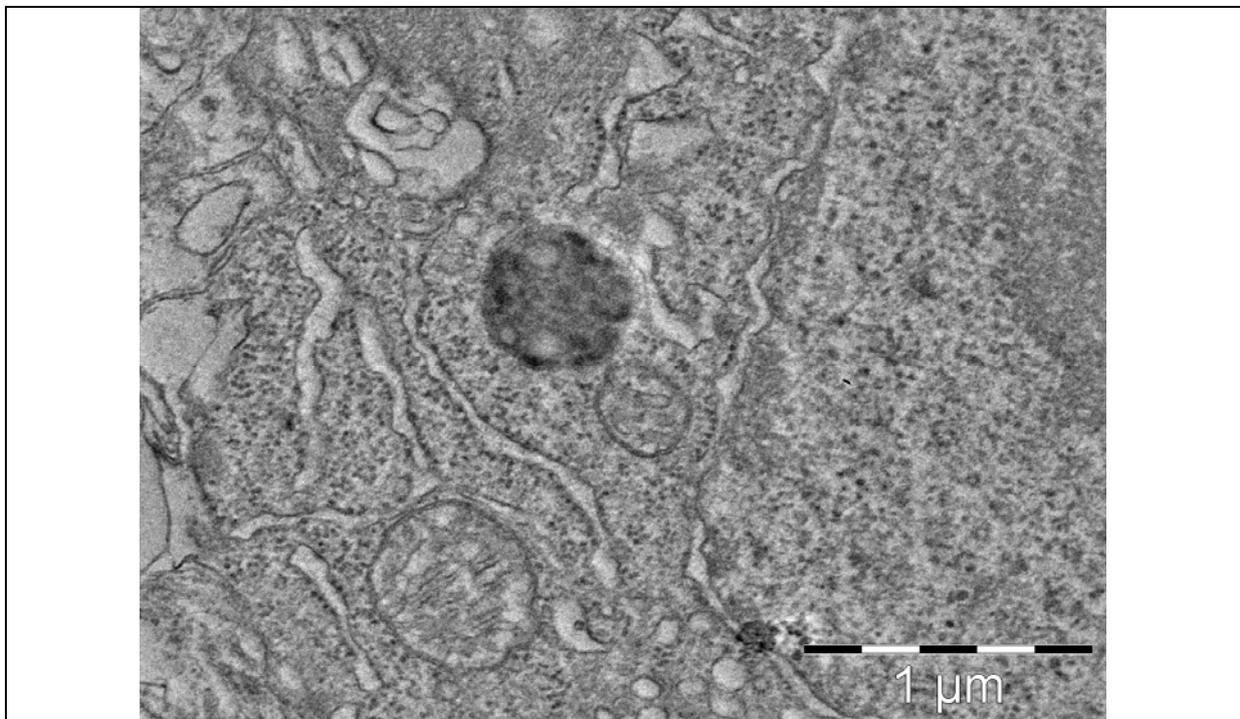
L'objectif est de développer une méthode exploratoire faisant appel aux techniques physiques telles que la microscopie électronique (en mode imagerie et diffusion), permettant la détection et la caractérisation structurale de nanoparticules d'oxyde de Fer utilisées comme marqueurs magnétiques pour l'IRM de l'inflammation. Spécifiquement, des techniques avancées de préparation et d'analyse *post-mortem* seront développées afin de déterminer : (1) la morphologie, la taille et la structure des nanoparticules, (2) leur biodistribution cérébrale (intravasculaire ou intraparenchymateuse, intra ou extracellulaire, etc) après administration intraparenchymateuse, intraveineuse ou intraartérielle et (3) leurs interactions avec le biosystème, notamment les acteurs de l'inflammation, et leurs biotransformations. Les résultats préliminaires obtenus lors de la première année de thèse ont permis d'identifier les macrophages marqués avec les NPMA et injectés de manière stéréotaxique dans le cerveau (Figure 30).

#### Collaborations :

UMR CNRS 5586, Lyon : Marie-Geneviève Blanchin  
U842 Inserm, Lyon : Serge Nataf, Jérôme Honnorat

#### Financements :

ANR TecSan INFLAM 2007-2010



**Figure 30- Microscopie électronique haute résolution d'un lysosome cellulaire contenant du Fer**

#### **4) Post-doctorat de Fabien Chauveau (2008-2010, post-doc CNRS et projet I-Know)**

L'objectif de ce travail est d'évaluer chez le rongeur l'effet neuroprotecteur du post-conditionnement ischémique, à l'aide de l'IRM multimodale, de la même manière que pour l'étude concernant l'AceDoPC. Le post-conditionnement est une stratégie héritée du domaine cardiologique où il suscite actuellement un intérêt croissant provenant des travaux pionniers au niveau expérimental (Argaud et al. 2005) et clinique (Piot et al. 2008) réalisés par nos collègues de l'équipe du Pr. Ovize sur le Groupement Hospitalier Est. Le post-conditionnement consiste à réaliser mécaniquement de brèves périodes d'ischémie/reperfusion contrôlées lors de la reperfusion, pour limiter les dégâts inhérents à celle-ci. Au niveau de la circulation cérébrale, la preuve de concept de ce post-conditionnement *ischémique* a récemment été démontrée (Xing et al. 2008). Le post-conditionnement *pharmacologique* permet également d'assurer cet effet protecteur par l'injection de cyclosporine A (CsA), ce qui ouvre des perspectives cliniques beaucoup plus favorables. L'utilisation clinique de la CsA dans l'infarctus du myocarde connaît un grand retentissement (Hausenloy and Yellon 2008), et son action neuroprotectrice est documentée chez l'animal (Yu et al. 2004).

#### Collaborations :

EMI-U0226 Inserm, Lyon, France : Michel Ovize

## 5. Conclusion

La prise en charge des AVC ischémiques a bénéficié au cours de ces dix dernières années de deux avancées majeures : d'une part, le **traitement thrombolytique**, et d'autre part, la mise à disposition des cliniciens de nouvelles techniques d'imagerie cérébrale, telles que **l'IRM de perfusion/diffusion**, permettant d'améliorer la sélection des patients candidats à la thrombolyse. Ces éléments ont permis une réduction globale de la morbidité ; toutefois le traitement thrombolytique demeure limité à une fenêtre temporelle étroite, et bénéficie de fait à une faible proportion de patients. Dans ce contexte, l'IRM pourrait jouer un rôle supplémentaire, en permettant la stratification des patients éligibles pour un **traitement neuroprotecteur**.

De nombreuses stratégies neuroprotectrices ont été développées afin de bloquer les cascades de réactions menant les cellules vers la mort cellulaire lors d'un AVC ischémique (Dirnagl et al. 1999). Cependant, bien que les agents neuroprotecteurs développés jusqu'à présent aient donné des résultats prometteurs lors des études précliniques sur le rongeur, ils se sont révélés inefficaces voire néfastes lors des essais cliniques (Young et al. 2007). Les raisons les plus couramment invoquées pour expliquer ces échecs persistants sont : la complexité et l'intrication des mécanismes impliqués dans la cascade ischémique, la faible proportion de patients bénéficiant des techniques avancées d'imagerie, et les difficultés méthodologiques posées par le traitement statistique de ces essais thérapeutiques. Une surestimation des effets neuroprotecteurs obtenus sur les modèles animaux est également soupçonnée (Savitz and Fisher 2007), et explique une importante littérature consacrée à l'amélioration de la **qualité méthodologique** des études chez l'animal (Dittmar et al. 2006; Sena et al. 2007; Macleod et al. 2009). A ce sujet, l'emploi de **l'IRM dans les études pré-cliniques** pourrait constituer un outil de choix pour :

- **Renforcer les critères d'inclusion :**
  - Angiographie RM : vérification de l'occlusion
  
- **Mieux contrôler la variabilité inter-groupe (pendant l'occlusion) :**
  - Diffusion : taille initiale de lésion
  - Perfusion : paramètres hémodynamiques associés au déficit de perfusion
  - Mismatch perfusion-diffusion : évaluation de la zone à risque de nécrose
  
- **Réaliser le suivi longitudinal des dommages tissulaires :**
  - Séquence pondérée T2 : détection de l'œdème vasogénique
  - Séquence pondérée T2\* : détection des microhémorragies
  - Séquence pondérée T1 avec injection d'un produit de contraste à base de gadolinium : évaluation de la barrière hématoencéphalique

Notre objectif est de compléter cet arsenal par des techniques permettant le **suivi de cellules marquées magnétiquement**, afin d'appréhender la dynamique de la réaction inflammatoire, et, à terme, de tester l'effet neuroprotecteur de traitements ciblant l'inflammation. Cette réalisation demande de développer une méthodologie d'investigation spécifique que nous proposons de réaliser à haut champ (7T ou 4,7T), mais aussi dans des conditions plus proches de la clinique (1,5T ou 2T). Ces expériences s'appuient évidemment sur le plateau scientifique et technique de la plateforme d'imagerie lyonnaise (Cermep : aimants 1,5T et 7T) ainsi que du laboratoire Creatis LRMN (aimants 4,7T et 2T), mais

également sur les compétences médicales, biologiques, biochimiques, et physiques des collaborations établies. Nous disposons à ce jour dans l'équipe de deux **modèles animaux d'ischémie cérébrale focale** : un modèle d'électrocoagulation de l'artère cérébrale moyenne chez la souris (modèle permanent) et un modèle d'occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne chez le rat (modèle permanent ou transitoire). Nous sommes en train d'acquiescer un troisième modèle, récemment décrit par une équipe française (Orset et al. 2007), où l'occlusion procède d'une injection *in situ* de thrombine, ce qui permet une reperfusion par le traitement thrombolytique utilisé cliniquement. Ce modèle, très proche de la physiopathologie humaine, devrait renforcer la pertinence clinique des résultats expérimentaux.

**En conclusion**, pour le clinicien, les perspectives de ce travail sont de mieux comprendre la physiopathologie de l'AVC ischémique, d'améliorer la performance diagnostique, et d'adapter la stratégie thérapeutique. De plus, les outils d'imagerie développés dans le cadre de notre projet pourront être directement transférés pour l'exploration d'autres pathologies neurologiques : maladie d'Alzheimer, Parkinson, sclérose en plaque, épilepsie... Dans le futur, la question est de savoir si la translation de l'imagerie cellulaire en clinique pourra être réalisée en toute innocuité.

## Références

- Abdullah, S. S., J. B. Pialat, M. Wiart, F. Duboeuf, J. Y. Mabrut, B. Bancel, A. Rode, C. Ducerf, J. Baulieux and Y. Berthezene (2008). "Characterization of hepatocellular carcinoma and colorectal liver metastasis by means of perfusion MRI." J Magn Reson Imaging 28(2): 390-395.
- Agarwal, R., S. M. Brunelli, K. Williams, M. D. Mitchell, H. I. Feldman and C. A. Umscheid (2008). "Gadolinium-based contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis: a systematic review and meta-analysis." Nephrol Dial Transplant.
- Al Faraj, A., G. Lacroix, H. Alsaïd, D. Elgrabi, V. Stupar, F. Robidel, S. Gaillard, E. Canet-Soulas and Y. Cremillieux (2008). "Longitudinal <sup>3</sup>He and proton imaging of magnetite biodistribution in a rat model of instilled nanoparticles." Magn Reson Med 59(6): 1298-303.
- Alger, J. R., T. J. Schaewe, T. C. Lai, A. J. Frew, P. M. Vespa, M. Etchepare, D. S. Liebeskind, J. L. Saver and S. C. Kidwell (2009). "Contrast agent dose effects in cerebral dynamic susceptibility contrast magnetic resonance perfusion imaging." J Magn Reson Imaging 29(1): 52-64.
- Anastase, S., D. Letourneur and J. Jozefonvicz (1996). "Affinity chromatography of human anti-dextran antibodies. Isolation of two distinct populations." J Chromatogr B Biomed Appl 686(2): 141-50.
- Argaud, L., O. Gateau-Roesch, O. Raisky, J. Loufouat, D. Robert and M. Ovize (2005). "Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition." Circulation 111(2): 194-7.
- Arsenijevic, D., F. de Bilbao, J. Plamondon, E. Paradis, P. Vallet, D. Richard, W. Langhans and P. Giannakopoulos (2006). "Increased infarct size and lack of hyperphagic response after focal cerebral ischemia in peroxisome proliferator-activated receptor beta-deficient mice." J Cereb Blood Flow Metab 26(3): 433-45.
- Astrup, J., B. K. Siesjo and L. Symon (1981). "Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra." Stroke 12(6): 723-5.
- Athiraman, H., Q. Jiang, G. L. Ding, L. Zhang, Z. G. Zhang, L. Wang, A. S. Arbab, Q. Li, S. Panda, K. Ledbetter, A. M. Rad and M. Chopp (2009). "Investigation of relationships between transverse relaxation rate, diffusion coefficient, and labeled cell concentration in ischemic rat brain using MRI." Magn Reson Med 61(3): 587-94.
- Bardutzky, J., Q. Shen, N. Henninger, S. Schwab, T. Q. Duong and M. Fisher (2007). "Characterizing tissue fate after transient cerebral ischemia of varying duration using quantitative diffusion and perfusion imaging." Stroke 38(4): 1336-44.
- Barone, F. C. and A. A. Parsons (2000). "Therapeutic potential of anti-inflammatory drugs in focal stroke." Expert Opin Investig Drugs 9(10): 2281-306.
- Becker, K. J. (2001). "Targeting the central nervous system inflammatory response in ischemic stroke." Curr Opin Neurol 14(3): 349-53.
- Belayev, L., L. Khoutorova, K. D. Atkins and N. G. Bazan (2009). "Robust Docosahexaenoic Acid-Mediated Neuroprotection in a Rat Model of Transient, Focal Cerebral Ischemia." Stroke.
- Belayev, L., V. L. Marcheselli, L. Khoutorova, E. B. Rodriguez de Turco, R. Busto, M. D. Ginsberg and N. G. Bazan (2005). "Docosahexaenoic acid complexed to albumin elicits high-grade ischemic neuroprotection." Stroke 36(1): 118-23.
- Benderbous, S., C. Corot, P. Jacobs and B. Bonnemain (1996). "Superparamagnetic agents: physicochemical characteristics and preclinical imaging evaluation." Acad Radiol 3 Suppl 2: S292-4.

- Bendszus, M., C. Kleinschnitz and G. Stoll (2007). "Iron-enhanced MRI in ischemic stroke: intravascular trapping versus cellular inflammation." Stroke 38(5): e12; author reply e13.
- Berthezene, Y., P. Croisille, M. Wiart, N. Howarth, C. Houzard, O. Faure, P. Douek, M. Amiel and D. Revel (1999). "Prospective comparison of MR lung perfusion and lung scintigraphy." J Magn Reson Imaging 9(1): 61-8.
- Billotey, C., C. Wilhelm, M. Devaud, J. C. Bacri, J. Bittoun and F. Gazeau (2003). "Cell internalization of anionic maghemite nanoparticles: quantitative effect on magnetic resonance imaging." Magn Reson Med 49(4): 646-54.
- Bjornerud, A., T. Bjerner, L. O. Johansson and H. K. Ahlstrom (2003). "Assessment of myocardial blood volume and water exchange: theoretical considerations and in vivo results." Magn Reson Med 49(5): 828-37.
- Bongartz, G. (2007). "Imaging in the time of NFD/NSF: do we have to change our routines concerning renal insufficiency?" MAGMA 20(2): 57-62.
- Bongartz, G., D. Weishaupt and M. Mayr (2008). "Nouveaux problèmes avec les produits de contraste dans l'insuffisance rénale: fibrose systémique néphrogène due au gadolinium." Forum Med Suisse 8(16): 116-122.
- Bonnemain, B. (1998). "Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications. A review." J Drug Target 6(3): 167-74.
- Bourrinet, P., H. H. Bengel, B. Bonnemain, A. Dencausse, J. M. Idee, P. M. Jacobs and J. M. Lewis (2006). "Preclinical safety and pharmacokinetic profile of ferumoxtran-10, an ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent." Invest Radiol 41(3): 313-24.
- Brasch, R. C., A. Gossmann, T. H. Helbich, N. Kuriyama, T. P. Roberts, D. M. Shames, N. van Bruggen, M. F. Wendland and M. A. Israel (2002). "Can a small-molecular gadolinium contrast agent be applied successfully with dynamic MRI to quantitatively define brain tumor microvascular responses to angiogenesis inhibition?" Acad Radiol 9 Suppl 2: S326-7.
- Brisset, J. C., V. Desestret, S. Marcellino, E. Devillard, F. Chauveau, F. Lagarde, S. Nataf, N. Nighoghossian, Y. Berthezene and M. Wiart (2009). "Quantitative effects of cell internalization of two types of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles at 4.7T and 7T." European Radiology (In press).
- Bruening, R., C. Berchtenbreiter, N. Holzknecht, M. Essig, R. H. Wu, A. Simmons, A. Heuck, A. Maschek, M. Meusel, S. C. Williams, T. Cox, M. V. Knopp and M. Reiser (2000). "Effects of three different doses of a bolus injection of gadodiamide: assessment of regional cerebral blood volume maps in a blinded reader study." AJNR Am J Neuroradiol 21(9): 1603-10.
- Brunecker, P., M. Endres, C. H. Nolte, J. Schultze, S. Wegener, G. J. Jungehulsing, B. Muller, C. M. Kerskens, J. B. Fiebach, A. Villringer and J. Steinbrink (2008). "Evaluation of an AIF correction algorithm for dynamic susceptibility contrast-enhanced perfusion MRI." Magn Reson Med 60(1): 102-10.
- Bulte, J. W., A. S. Arbab, T. Douglas and J. A. Frank (2004). "Preparation of magnetically labeled cells for cell tracking by magnetic resonance imaging." Methods Enzymol 386: 275-99.
- Buxton, R. B., L. R. Frank, E. C. Wong, B. Siewert, S. Warach and R. R. Edelman (1998). "A general kinetic model for quantitative perfusion imaging with arterial spin labeling." Magn Reson Med 40(3): 383-96.
- Canet, E., D. Revel, R. Forrat, C. Baldy-Porcher, M. de Lorgeril, L. Sebbag, J. P. Vallee, D. Didier and M. Amiel (1993). "Superparamagnetic iron oxide particles and positive

- enhancement for myocardial perfusion studies assessed by subsecond T1-weighted MRI." Magn Reson Imaging 11(8): 1139-45.
- Canet, E. P., C. Casali, A. Desenfant, M. Y. An, C. Corot, J. F. Obadia, D. Revel and M. F. Janier (2000). "Kinetic characterization of CMD-A2-Gd-DOTA as an intravascular contrast agent for myocardial perfusion measurement with MRI." Magn Reson Med 43(3): 403-9.
- Carne, S., W. Mai, A. Mazzadi, M. Janier, D. Revel, I. Magnin, M. Wiart, B. Neyran and E. Canet-Soulas (2006). "Importance of parametric mapping and deconvolution in analyzing magnetic resonance myocardial perfusion images." Invest Radiol 41(4): 374-83.
- Chambon, C., O. Clement, A. Le Blanche, E. Schouman-Claeys and G. Frija (1993). "Superparamagnetic iron oxides as positive MR contrast agents: in vitro and in vivo evidence." Magn Reson Imaging 11(4): 509-19.
- Cho, T. H., N. Nighoghossian, M. Wiart, V. Desestret, S. Cakmak, Y. Berthezene, L. Derex, G. Louis-Tisserand, J. Honnorat, J. C. Froment and M. Hermier (2007). "USPIO-enhanced MRI of neuroinflammation at the sub-acute stage of ischemic stroke: preliminary data." Cerebrovasc Dis 24(6): 544-6.
- Chou, Y. C., M. M. Teng, W. Y. Guo, J. C. Hsieh and Y. T. Wu (2007). "Classification of hemodynamics from dynamic-susceptibility-contrast magnetic resonance (DSC-MR) brain images using noiseless independent factor analysis." Med Image Anal 11(3): 242-53.
- Christian, T. F., D. W. Rettmann, A. H. Aletras, S. L. Liao, J. L. Taylor, R. S. Balaban and A. E. Arai (2004). "Absolute myocardial perfusion in canines measured by using dual-bolus first-pass MR imaging." Radiology 232(3): 677-84.
- Cicchetti, F., R. E. Gross, J. W. Bulte, M. Owen, I. Chen, M. Saint-Pierre, X. Wang, M. Yu and A. L. Brownell (2007). "Dual-modality in vivo monitoring of subventricular zone stem cell migration and metabolism." Contrast Media Mol Imaging 2(3): 130-8.
- Clement, O. and A. Luciani (2004). "Imaging the lymphatic system: possibilities and clinical applications." Eur Radiol 14(8): 1498-507.
- Conturo, T. E., E. Akbudak, M. S. Kotys, M. L. Chen, S. J. Chun, R. M. Hsu, C. C. Sweeney and J. Markham (2005). "Arterial input functions for dynamic susceptibility contrast MRI: requirements and signal options." J Magn Reson Imaging 22(6): 697-703.
- Corot, C., K. G. Petry, R. Trivedi, A. Saleh, C. Jonkmanns, J. F. Le Bas, E. Blezer, M. Rausch, B. Brochet, P. Foster-Gareau, D. Baleriaux, S. Gaillard and V. Dousset (2004). "Macrophage imaging in central nervous system and in carotid atherosclerotic plaque using ultrasmall superparamagnetic iron oxide in magnetic resonance imaging." Invest Radiol 39(10): 619-25.
- Corot, C., P. Robert, J. M. Idee and M. Port (2006). "Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging." Adv Drug Deliv Rev 58(14): 1471-504.
- Corot, C., P. Robert, E. Lancelot, P. Prigent, S. Ballet, I. Guilbert, J. S. Raynaud, I. Raynal and M. Port (2008). "Tumor imaging using P866, a high-relaxivity gadolinium chelate designed for folate receptor targeting." Magn Reson Med 60(6): 1337-46.
- Cuenod, C., I. Leconte, N. Siauve, A. Resten, C. Dromain, B. Poulet, F. Frouin, O. Clement and G. Frija (2001). "Early changes in liver perfusion caused by occult metastases in rats: detection with quantitative CT." Radiology 218(2): 556-61.
- Daldrup-Link, H. E., M. Rudelius, R. A. Oostendorp, M. Settles, G. Piontek, S. Metz, H. Rosenbrock, U. Keller, U. Heinzmann, E. J. Rummeny, J. Schlegel and T. M. Link (2003). "Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents." Radiology 228(3): 760-7.

- Daldrup, H. E., D. M. Shames, W. Hussein, M. F. Wendland, Y. Okuhata and R. C. Brasch (1998). "Quantification of the extraction fraction for gadopentetate across breast cancer capillaries." Magn Reson Med 40(4): 537-43.
- Danton, G. H. and W. D. Dietrich (2003). "Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke." J Neuropathol Exp Neurol 62(2): 127-36.
- Denes, A., R. Vidyasagar, J. Feng, J. Narvainen, B. W. McColl, R. A. Kauppinen and S. M. Allan (2007). "Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice." J Cereb Blood Flow Metab 27(12): 1941-53.
- Dennie, J., J. B. Mandeville, J. L. Boxerman, S. D. Packard, B. R. Rosen and R. M. Weisskoff (1998). "NMR imaging of changes in vascular morphology due to tumor angiogenesis." Magn Reson Med 40(6): 793-9.
- Deplanque, D., P. Gele, O. Petrucci, I. Six, C. Furman, M. Bouly, S. Nion, B. Dupuis, D. Leys, J. C. Fruchart, R. Cecchelli, B. Staels, P. Duriez and R. Bordet (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  activation as a mechanism of preventive neuroprotection induced by chronic fenofibrate treatment." J Neurosci 23(15): 6264-71.
- Derex, L., M. Hermier, P. Adeleine, J. B. Pialat, M. Wiart, Y. Berthezene, J. C. Froment, P. Trouillas and N. Nighoghossian (2004a). "Influence of the site of arterial occlusion on multiple baseline hemodynamic MRI parameters and post-thrombolytic recanalization in acute stroke." Neuroradiology 46(11): 883-7.
- Derex, L., M. Hermier, P. Adeleine, J. B. Pialat, M. Wiart, Y. Berthezene, F. Philippeau, J. Honnorat, J. C. Froment, P. Trouillas and N. Nighoghossian (2005). "Clinical and imaging predictors of intracerebral haemorrhage in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator." J Neurol Neurosurg Psychiatry 76(1): 70-5.
- Derex, L., N. Nighoghossian, M. Hermier, J. B. Pialat, M. Wiart, F. Philippeau, P. Adeleine, J. Honnorat, J. C. Froment, Y. Berthezene and P. Trouillas (2004b). "Magnetic Resonance Imaging: Significance of Early Ischemic Changes on Computed Tomography." Cerebrovasc Dis 18(3): 232-235.
- Desestret, V., J. C. Brisset, S. Moucharrafi, E. Devillard, S. Nataf, J. Honnorat, N. Nighoghossian, Y. Berthezene and M. Wiart (2009). "Early-stage investigations of ultrasmall superparamagnetic iron oxide-induced signal change after permanent middle cerebral artery occlusion in mice." Stroke 40(5): 1834-41.
- Ding, G., Q. Jiang, L. Li, L. Zhang, Z. G. Zhang, K. A. Ledbetter, S. Panda, S. P. Davarani, H. Athiraman, Q. Li, J. R. Ewing and M. Chopp (2008). "Magnetic resonance imaging investigation of axonal remodeling and angiogenesis after embolic stroke in sildenafil-treated rats." J Cereb Blood Flow Metab 28(8): 1440-8.
- Dirnagl, U., C. Iadecola and M. A. Moskowitz (1999). "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view." Trends Neurosci 22(9): 391-7.
- Dittmar, M. S., B. Vatankhah, N. P. Fehm, G. Schuierer, U. Bogdahn, M. Horn and F. Schlachetzki (2006). "Fischer-344 rats are unsuitable for the MCAO filament model due to their cerebrovascular anatomy." J Neurosci Methods 156(1-2): 50-4.
- Doerfler, A., T. Engelhorn, S. Heiland, M. Knauth, I. Wanke and M. Forsting (2000). "MR contrast agents in acute experimental cerebral ischemia: potential adverse impacts on neurologic outcome and infarction size." J Magn Reson Imaging 11(4): 418-24.
- Donahue, K. M., R. M. Weisskoff and D. Burstein (1997). "Water diffusion and exchange as they influence contrast enhancement." J Magn Reson Imaging 7(1): 102-10.
- Dousset, V., C. Delalande, L. Ballarino, B. Quesson, D. Seilhan, M. Cousemacq, E. Thiaudiere, B. Brochet, P. Canioni and J. M. Caille (1999). "In vivo macrophage activity imaging in the central nervous system detected by magnetic resonance." Magn Reson Med 41(2): 329-33.

- Driehuys, B., G. P. Cofer, J. Pollaro, J. B. Mackel, L. W. Hedlund and G. A. Johnson (2006). "Imaging alveolar-capillary gas transfer using hyperpolarized  $^{129}\text{Xe}$  MRI." Proc Natl Acad Sci U S A 103(48): 18278-83.
- Duhamel, G., P. Choquet, E. Grillon, L. Lamalle, J. L. Leviel, A. Ziegler and A. Constantinesco (2001). "Xenon-129 MR imaging and spectroscopy of rat brain using arterial delivery of hyperpolarized xenon in a lipid emulsion." Magn Reson Med 46(2): 208-12.
- Ellinger, R., C. Kremser, M. F. Schocke, C. Kolbitsch, J. Griebel, S. R. Felber and F. T. Aichner (2000). "The impact of peak saturation of the arterial input function on quantitative evaluation of dynamic susceptibility contrast-enhanced MR studies." J Comput Assist Tomogr 24(6): 942-8.
- Engberink, R. D., E. L. Blezer, E. I. Hoff, S. M. van der Pol, A. van der Toorn, R. M. Dijkhuizen and H. E. de Vries (2008). "MRI of monocyte infiltration in an animal model of neuroinflammation using SPIO-labeled monocytes or free USPIO." J Cereb Blood Flow Metab 28(4): 841-51.
- Engelhorn, T., A. Doerfler, M. Forsting, G. Heusch and R. Schulz (2005). "Does a relative perfusion measure predict cerebral infarct size?" AJNR Am J Neuroradiol 26(9): 2218-23.
- Evelhoch, J. L. (1999). "Key factors in the acquisition of contrast kinetic data for oncology." J Magn Reson Imaging 10(3): 254-9.
- Farr, T., M. Hoehn and J. Seehafer (2008). Imaging macrophage infiltration of ischemic tissue is not possible following transient middle cerebral artery occlusion. International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Toronto (Canada).
- Fishbane, S., V. D. Ungureanu, J. K. Maesaka, C. J. Kaupke, V. Lim and J. Wish (1996). "The safety of intravenous iron dextran in hemodialysis patients." Am J Kidney Dis 28(4): 529-34.
- Gerhard, A., J. Schwarz, R. Myers, R. Wise and R. B. Banati (2005). "Evolution of microglial activation in patients after ischemic stroke: a [ $^{11}\text{C}$ ](R)-PK11195 PET study." Neuroimage 24(2): 591-5. Epub 2004 Nov 18. Write to the Help Desk NCBI | NLM | NIH Department of Health & Human Services Privacy Statement | Freedom of Information Act | Disclaimer.
- Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." Nat Rev Immunol 3(1): 23-35.
- Greenway, C. V. and R. D. Stark (1971). "Hepatic vascular bed." Physiol Rev 51(1): 23-65.
- Guzman, R., N. Uchida, T. M. Bliss, D. He, K. K. Christopherson, D. Stellwagen, A. Capela, J. Greve, R. C. Malenka, M. E. Moseley, T. D. Palmer and G. K. Steinberg (2007). "Long-term monitoring of transplanted human neural stem cells in developmental and pathological contexts with MRI." Proc Natl Acad Sci U S A 104(24): 10211-6.
- Harisinghani, M. G., J. Barentsz, P. F. Hahn, W. M. Deserno, S. Tabatabaei, C. H. van de Kaa, J. de la Rosette and R. Weissleder (2003). "Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer." N Engl J Med 348(25): 2491-9.
- Hartman, K. B., S. Laus, R. D. Bolskar, R. Muthupillai, L. Helm, E. Toth, A. E. Merbach and L. J. Wilson (2008). "Gadonanotubes as ultrasensitive pH-smart probes for magnetic resonance imaging." Nano Lett 8(2): 415-9.
- Hausenloy, D. J. and D. M. Yellon (2008). "Time to take myocardial reperfusion injury seriously." N Engl J Med 359(5): 518-20.
- Heiss, W. D. and I. Podreka (1993). "Role of PET and SPECT in the assessment of ischemic cerebrovascular disease." Cerebrovasc Brain Metab Rev 5(4): 235-63.
- Henning, E. C., C. A. Ruetzler, M. R. Gaudinski, T. C. Hu, L. L. Latour, J. M. Hallenbeck and S. Warach (2009). "Feridex preloading permits tracking of CNS-resident

- macrophages after transient middle cerebral artery occlusion." J Cereb Blood Flow Metab.
- Henninger, N. and M. Fisher (2007). "Stimulating circle of Willis nerve fibers preserves the diffusion-perfusion mismatch in experimental stroke." Stroke 38(10): 2779-86.
- Henoumont, C., V. Henrotte, S. Laurent, L. Vander Elst and R. N. Muller (2008). "Synthesis of a new gadolinium complex with a high affinity for human serum albumin and its manifold physicochemical characterization by proton relaxation rate analysis, NMR diffusometry and electrospray mass spectrometry." J Inorg Biochem 102(4): 721-30.
- Hermier, M., A. S. Ibrahim, M. Wiart, P. Adeleine, F. Cotton, P. Dardel, L. Derex, Y. Berthezene, N. Nighoghossian and J. C. Froment (2003a). "The delayed perfusion sign at MRI." J Neuroradiol 30(3): 172-9.
- Hermier, M., N. Nighoghossian, L. Derex, P. Adeleine, M. Wiart, Y. Berthezene, F. Cotton, J. B. Pialat, P. Dardel, J. Honnorat, P. Trouillas and J. C. Froment (2003b). "Hypointense transcerebral veins at T2\*-weighted MRI: a marker of hemorrhagic transformation risk in patients treated with intravenous tissue plasminogen activator." J Cereb Blood Flow Metab 23(11): 1362-70.
- Hoehn, M., E. Kustermann, J. Blunk, D. Wiedermann, T. Trapp, S. Wecker, M. Focking, H. Arnold, J. Hescheler, B. K. Fleischmann, W. Schwindt and C. Buhrlé (2002). "Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat." Proc Natl Acad Sci U S A 99(25): 16267-72.
- Hofmeijer, J., J. Schepers, H. B. van der Worp, L. J. Kappelle and K. Nicolay (2005). "Comparison of perfusion MRI by flow-sensitive alternating inversion recovery and dynamic susceptibility contrast in rats with permanent middle cerebral artery occlusion." NMR Biomed 18(6): 390-4.
- Hossmann, K. A. (1994). "Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia." Ann Neurol 36(4): 557-65.
- Huang, G., J. Diakur, Z. Xu and L. I. Wiebe (2008). "Asialoglycoprotein receptor-targeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles." Int J Pharm 360(1-2): 197-203.
- Iadecola, C. (1997). "Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury." Trends Neurosci 20(3): 132-9.
- Iadecola, C. and M. Alexander (2001). "Cerebral ischemia and inflammation." Curr Opin Neurol 14(1): 89-94.
- Inaba, T. (1992). "Quantitative measurements of prostatic blood flow and blood volume by positron emission tomography." J Urol 148(5): 1457-60.
- Ito, H., I. Kanno and H. Fukuda (2005). "Human cerebral circulation: positron emission tomography studies." Ann Nucl Med 19(2): 65-74.
- Jerosch-Herold, M., R. T. Seethamraju, C. M. Swingen, N. M. Wilke and A. E. Stillman (2004). "Analysis of myocardial perfusion MRI." J Magn Reson Imaging 19(6): 758-70.
- Jerosch-Herold, M., N. Wilke, Y. Wang, G. R. Gong, A. M. Mansoor, H. Huang, S. Gurchumelidze and A. E. Stillman (1999). "Direct comparison of an intravascular and an extracellular contrast agent for quantification of myocardial perfusion. Cardiac MRI Group." Int J Card Imaging 15(6): 453-64.
- Jiang, Q., Z. G. Zhang, G. L. Ding, L. Zhang, J. R. Ewing, L. Wang, R. Zhang, L. Li, M. Lu, H. Meng, A. S. Arbab, J. Hu, Q. J. Li, D. S. Pourabdollah Nejad, H. Athiraman and M. Chopp (2005). "Investigation of neural progenitor cell induced angiogenesis after embolic stroke in rat using MRI." Neuroimage 28(3): 698-707.

- Judd, R. M., S. B. Reeder and K. May-Newman (1999). "Effects of water exchange on the measurement of myocardial perfusion using paramagnetic contrast agents." Magn Reson Med 41(2): 334-42.
- Justicia, C., P. Ramos-Cabrer and M. Hoehn (2008). "MRI detection of secondary damage after stroke: chronic iron accumulation in the thalamus of the rat brain." Stroke 39(5): 1541-7.
- Kao, Y. H., W. Y. Guo, Y. T. Wu, K. C. Liu, W. Y. Chai, C. Y. Lin, Y. S. Hwang, A. Jy-Kang Liou, H. M. Wu, H. C. Cheng, T. C. Yeh, J. C. Hsieh and M. Mu Huo Teng (2003). "Hemodynamic segmentation of MR brain perfusion images using independent component analysis, thresholding, and Bayesian estimation." Magn Reson Med 49(5): 885-94.
- Kim, J., D. I. Kim, S. K. Lee, D. J. Kim, J. E. Lee and S. K. Ahn (2008). "Imaging of the inflammatory response in reperfusion injury after transient cerebral ischemia in rats: correlation of superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging with histopathology." Acta Radiol 49(5): 580-8.
- Kleinschnitz, C., M. Bendszus, M. Frank, L. Solymosi, K. V. Toyka and G. Stoll (2003). "In vivo monitoring of macrophage infiltration in experimental ischemic brain lesions by magnetic resonance imaging." J Cereb Blood Flow Metab 23(11): 1356-61.
- Kleinschnitz, C., A. Schutz, I. Nolte, T. Horn, M. Frank, L. Solymosi, G. Stoll and M. Bendszus (2005). "In vivo detection of developing vessel occlusion in photothrombotic ischemic brain lesions in the rat by iron particle enhanced MRI." J Cereb Blood Flow Metab 25(11): 1548-55.
- Knutsson, L., F. Stahlberg and R. Wirestam (2004). "Aspects on the accuracy of cerebral perfusion parameters obtained by dynamic susceptibility contrast MRI: a simulation study." Magn Reson Imaging 22(6): 789-98.
- Kotys, M. S., E. Akbudak, J. Markham and T. E. Conturo (2007). "Precision, signal-to-noise ratio, and dose optimization of magnitude and phase arterial input functions in dynamic susceptibility contrast MRI." J Magn Reson Imaging 25(3): 598-611.
- Larsson, H. B., S. Rosenbaum and T. Fritz-Hansen (2001). "Quantification of the effect of water exchange in dynamic contrast MRI perfusion measurements in the brain and heart." Magn Reson Med 46(2): 272-81.
- Laurent, S., D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst and R. N. Muller (2008). "Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications." Chem Rev 108(6): 2064-110.
- Lee, E. S., J. Chan, B. Shuter, L. G. Tan, M. S. Chong, D. L. Ramachandra, G. S. Dawe, J. Ding, S. H. Teoh, O. Beuf, A. Briguet, K. Chiu Tam, M. Choolani and S. C. Wang (2009). "Microgel Iron Oxide Nanoparticles for Tracking Human Fetal Mesenchymal Stem Cells Through Magnetic Resonance Imaging." Stem Cells 27(8): 1921-1931.
- Lehrmann, E., T. Christensen, J. Zimmer, N. H. Diemer and B. Finsen (1997). "Microglial and macrophage reactions mark progressive changes and define the penumbra in the rat neocortex and striatum after transient middle cerebral artery occlusion." J Comp Neurol 386(3): 461-76.
- Lindsberg, P. J., O. Carpen, A. Paetau, M. L. Karjalainen-Lindsberg and M. Kaste (1996). "Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke." Circulation 94(5): 939-45.
- Lombardi, M., R. A. Jones, J. Westby, G. Torheim, T. E. Southon, O. Haraldseth, C. Michelassi, J. Kvaerness, P. A. Rinck and A. L'Abbate (1999). "Use of the mean transit time of an intravascular contrast agent as an exchange-insensitive index of myocardial perfusion." J Magn Reson Imaging 9(3): 402-8.

- Ludemann, L., B. Schmitt, P. Podrabsky, B. Schnackenburg, J. Bock and M. Gutberlet (2007). "Usage of the T1 effect of an iron oxide contrast agent in an animal model to quantify myocardial blood flow by MRI." *Eur J Radiol* 62(2): 247-56.
- Macleod, M. R., M. Fisher, V. O'Collins, E. S. Sena, U. Dirnagl, P. M. Bath, A. Buchan, H. B. van der Worp, R. Traystman, K. Minematsu, G. A. Donnan and D. W. Howells (2009). "Good laboratory practice: preventing introduction of bias at the bench." *Stroke* 40(3): e50-2.
- Magnusson, P., E. Johansson, S. Mansson, J. S. Petersson, C. M. Chai, G. Hansson, O. Axelsson and K. Golman (2007). "Passive catheter tracking during interventional MRI using hyperpolarized <sup>13</sup>C." *Magn Reson Med* 57(6): 1140-7.
- Mani, V., K. C. Briley-Saebo, V. V. Itskovich, D. D. Samber and Z. A. Fayad (2006). "Gradient echo acquisition for superparamagnetic particles with positive contrast (GRASP): sequence characterization in membrane and glass superparamagnetic iron oxide phantoms at 1.5T and 3T." *Magn Reson Med* 55(1): 126-35.
- Mansson, S., E. Johansson, P. Magnusson, C. M. Chai, G. Hansson, J. S. Petersson, F. Stahlberg and K. Golman (2006). "<sup>13</sup>C imaging-a new diagnostic platform." *Eur Radiol* 16(1): 57-67.
- Melani, A., M. Gianfriddo, M. G. Vannucchi, S. Cipriani, P. G. Baraldi, M. G. Giovannini and F. Pedata (2006). "The selective A2A receptor antagonist SCH 58261 protects from neurological deficit, brain damage and activation of p38 MAPK in rat focal cerebral ischemia." *Brain Res* 1073-1074: 470-80.
- Meng, X., M. Fisher, Q. Shen, C. H. Sotak and T. Q. Duong (2004). "Characterizing the diffusion/perfusion mismatch in experimental focal cerebral ischemia." *Ann Neurol* 55(2): 207-12.
- Metz, S., S. Lohr, M. Settles, A. Beer, K. Woertler, E. J. Rummeny and H. E. Daldrup-Link (2006). "Ferumoxtran-10-enhanced MR imaging of the bone marrow before and after conditioning therapy in patients with non-Hodgkin lymphomas." *Eur Radiol* 16(3): 598-607.
- Miles, K. A. (1991). "Measurement of tissue perfusion by dynamic computed tomography." *Br J Radiol* 64(761): 409-12.
- Modo, M., K. Mellodew, D. Cash, S. E. Fraser, T. J. Meade, J. Price and S. C. Williams (2004). "Mapping transplanted stem cell migration after a stroke: a serial, in vivo magnetic resonance imaging study." *Neuroimage* 21(1): 311-7.
- Muller, M., P. Reimer, D. Wiedermann, T. Allkemper, C. Marx, B. Tombach, E. J. Rummeny, K. Shamsi, T. Balzer and P. E. Peters (1998). "[T1-weighted dynamic MRI with new superparamagnetic iron oxide particles (Resovist): results of a phantom study as well as 25 patients]." *Rofo* 168(3): 228-36.
- Neyran, B., M. F. Janier, C. Casali, D. Revel and E. P. Canet Soulas (2002). "Mapping myocardial perfusion with an intravascular MR contrast agent: Robustness of deconvolution methods at various blood flows." *Magn Reson Med* 48(1): 166-79.
- Nighoghossian, N., Y. Berthezene, P. Adeleine, M. Wiart, J. Damien, L. Derex, R. Itti, J. C. Froment and P. Trouillas (1999). "Effects of subcortical cerebrovascular lesions on cortical hemodynamic parameters assessed by perfusion magnetic resonance imaging." *Cerebrovasc Dis* 9(3): 136-41.
- Nighoghossian, N., M. Hermier, Y. Berthezene, M. Wiart, L. Derex, J. Honnorat, P. Trouillas, F. Turjman and J. C. Froment (2001). "Early diagnosis of hemorrhagic transformation: diffusion/perfusion-weighted MRI versus CT scan." *Cerebrovasc Dis* 11(3): 151-6.
- Nighoghossian, N., M. Wiart, S. Cakmak, Y. Berthezene, L. Derex, T. H. Cho, C. Nemoz, F. Chapuis, G. L. Tisserand, J. B. Pialat, P. Trouillas, J. C. Froment and M. Hermier

- (2007). "Inflammatory response after ischemic stroke: a USPIO-enhanced MRI study in patients." Stroke 38(2): 303-7.
- Orset, C., R. Macrez, A. R. Young, D. Panthou, E. Angles-Cano, E. Maubert, V. Agin and D. Vivien (2007). "Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion." Stroke 38(10): 2771-8.
- Ostergaard, L., A. G. Sorensen, K. K. Kwong, R. M. Weisskoff, C. Gyldensted and B. R. Rosen (1996a). "High resolution measurement of cerebral blood flow using intravascular tracer bolus passages. Part II: Experimental comparison and preliminary results." Magn Reson Med 36(5): 726-36.
- Ostergaard, L., R. M. Weisskoff, D. A. Chesler, C. Gyldensted and B. R. Rosen (1996b). "High resolution measurement of cerebral blood flow using intravascular tracer bolus passages. Part I: Mathematical approach and statistical analysis." Magn Reson Med 36(5): 715-25.
- Padhani, A. R. (2003). "MRI for assessing antivasular cancer treatments." Br J Radiol 76(Spec No 1): S60-80.
- Padhani, A. R., C. J. Gapinski, D. A. Macvicar, G. J. Parker, J. Suckling, P. B. Revell, M. O. Leach, D. P. Dearnaley and J. E. Husband (2000). "Dynamic contrast enhanced MRI of prostate cancer: correlation with morphology and tumour stage, histological grade and PSA." Clin Radiol 55(2): 99-109.
- Parac-Vogt, T. N., K. Kimpe, S. Laurent, C. Pierart, L. V. Elst, R. N. Muller and K. Binnemans (2006). "Paramagnetic liposomes containing amphiphilic bisamide derivatives of Gd-DTPA with aromatic side chain groups as possible contrast agents for magnetic resonance imaging." Eur Biophys J 35(2): 136-44.
- Paternostro, G., P. G. Camici, A. A. Lammerstma, N. Marinho, R. R. Baliga, J. S. Kooner, G. K. Radda and E. Ferrannini (1996). "Cardiac and skeletal muscle insulin resistance in patients with coronary heart disease. A study with positron emission tomography." J Clin Invest 98(9): 2094-9.
- Pialat, J. B., T. H. Cho, O. Beuf, E. Joye, S. Moucharaffie, J. B. Langlois, C. Nemoz, M. Janier, Y. Berthezene, N. Nighoghossian, B. Desvergne and M. Wiart (2007). "MRI monitoring of focal cerebral ischemia in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-deficient mice." NMR Biomed 20(3): 335-342.
- Pialat, J. B., M. Wiart, N. Nighoghossian, P. Adeleine, L. Derex, M. Hermier, J. C. Froment and Y. Berthezene (2005). "Evolution of lesion volume in acute stroke treated by intravenous t-PA." J Magn Reson Imaging 22(1): 23-8.
- Piot, C., P. Croisille, P. Staat, H. Thibault, G. Rioufol, N. Mewton, R. Elbelghiti, T. T. Cung, E. Bonnefoy, D. Angoulvant, C. Macia, F. Raczka, C. Sportouch, G. Gahide, G. Finet, X. Andre-Fouet, D. Revel, G. Kirkorian, J. P. Monassier, G. Derumeaux and M. Ovize (2008). "Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction." N Engl J Med 359(5): 473-81.
- Pochon, S., R. Hyacinthe, J. Terrettaz, F. Robert, M. Schneider and H. Tournier (1997). "Long circulating superparamagnetic particles with high T2 relaxivity." Acta Radiol Suppl 412: 69-72.
- Polfliet, M. M., P. J. Zwijnenburg, A. M. van Furth, T. van der Poll, E. A. Dopp, C. Renardel de Lavalette, E. M. van Kesteren-Hendriks, N. van Rooijen, C. D. Dijkstra and T. K. van den Berg (2001). "Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis." J Immunol 167(8): 4644-50.
- Preda, A., V. Novikov, M. Moglich, E. Floyd, K. Turetschek, D. M. Shames, T. P. Roberts, C. Corot, W. O. Carter and R. C. Brasch (2005). "Magnetic resonance characterization of tumor microvessels in experimental breast tumors using a slow clearance blood pool

- contrast agent (carboxymethyldextran-A2-Gd-DOTA) with histopathological correlation." Eur Radiol 15(11): 2268-75.
- Price, C. J., E. A. Warburton and D. K. Menon (2003). "Human cellular inflammation in the pathology of acute cerebral ischaemia." J Neurol Neurosurg Psychiatry 74(11): 1476-84.
- Priller, J., A. Flugel, T. Wehner, M. Boentert, C. A. Haas, M. Prinz, F. Fernandez-Klett, K. Prass, I. Bechmann, B. A. de Boer, M. Frotscher, G. W. Kreutzberg, D. A. Persons and U. Dirnagl (2001). "Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment." Nat Med 7(12): 1356-61.
- Raatschen, H. J., Y. Fu, D. M. Shames, M. F. Wendland and R. C. Brasch (2006). "Magnetic resonance imaging enhancement of normal tissues and tumors using macromolecular Gd-based cascade polymer contrast agents: preclinical evaluations." Invest Radiol 41(12): 860-7.
- Rausch, M., D. Baumann, U. Neubacher and M. Rudin (2002). "In-vivo visualization of phagocytotic cells in rat brains after transient ischemia by USPIO." NMR Biomed 15(4): 278-83.
- Rausch, M., P. Hiestand, D. Baumann, C. Cannet and M. Rudin (2003). "MRI-based monitoring of inflammation and tissue damage in acute and chronic relapsing EAE." Magn Reson Med 50(2): 309-14.
- Rausch, M., A. Sauter, J. Frohlich, U. Neubacher, E. W. Radu and M. Rudin (2001). "Dynamic patterns of USPIO enhancement can be observed in macrophages after ischemic brain damage." Magn Reson Med 46(5): 1018-22.
- Raynal, I., P. Prigent, S. Peyramaure, A. Najid, C. Rebuffi and C. Corot (2004). "Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10." Invest Radiol 39(1): 56-63.
- Reimer, P. and B. Tombach (1998). "Hepatic MRI with SPIO: detection and characterization of focal liver lesions." Eur Radiol 8(7): 1198-204.
- Rempp, K. A., G. Brix, F. Wenz, C. R. Becker, F. Guckel and W. J. Lorenz (1994). "Quantification of regional cerebral blood flow and volume with dynamic susceptibility contrast-enhanced MR imaging." Radiology 193(3): 637-41.
- Rice, H. E., E. W. Hsu, H. Sheng, D. A. Evenson, A. J. Freemerman, K. M. Safford, J. M. Provenzale, D. S. Warner and G. A. Johnson (2007). "Superparamagnetic iron oxide labeling and transplantation of adipose-derived stem cells in middle cerebral artery occlusion-injured mice." AJR Am J Roentgenol 188(4): 1101-8.
- Rupalla, K., P. R. Allegrini, D. Sauer and C. Wiessner (1998). "Time course of microglia activation and apoptosis in various brain regions after permanent focal cerebral ischemia in mice." Acta Neuropathol (Berl) 96(2): 172-8.
- Saito, K., H. Shindo, T. Ozuki, A. Ishikawa, F. Kotake, Y. Shimazaki and K. Abe (2005). "Perfusion study of hypervascular hepatocellular carcinoma with SPIO." Magn Reson Med Sci 4(4): 151-8.
- Saleh, A., M. Schroeter, C. Jonkmanns, H. P. Hartung, U. Modder and S. Jander (2004a). "In vivo MRI of brain inflammation in human ischaemic stroke." Brain 127(Pt 7): 1670-7.
- Saleh, A., M. Schroeter, A. Ringelstein, H. P. Hartung, M. Siebler, U. Modder and S. Jander (2007). "Iron oxide particle-enhanced MRI suggests variability of brain inflammation at early stages after ischemic stroke." Stroke 38(10): 2733-7.
- Saleh, A., D. Wiedermann, M. Schroeter, C. Jonkmanns, S. Jander and M. Hoehn (2004b). "Central nervous system inflammatory response after cerebral infarction as detected by magnetic resonance imaging." NMR Biomed 17(4): 163-9.

- Savitz, S. I. and M. Fisher (2007). "Future of neuroprotection for acute stroke: in the aftermath of the SAINT trials." Ann Neurol 61(5): 396-402.
- Scaroni, R., N. Tambasco, G. Cardaioli, L. Parnetti, F. Paloni, B. Boranga and G. P. Pelliccioli (2006). "Multimodal use of computed tomography in early acute stroke, part 2." Clin Exp Hypertens 28(3-4): 427-31.
- Schilling, M., M. Besselmann, C. Leonhard, M. Mueller, E. B. Ringelstein and R. Kiefer (2003). "Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice." Exp Neurol 183(1): 25-33.
- Schroeter, M., C. Franke, G. Stoll and M. Hoehn (2001). "Dynamic changes of magnetic resonance imaging abnormalities in relation to inflammation and glial responses after photothrombotic cerebral infarction in the rat brain." Acta Neuropathol 101(2): 114-22.
- Schroeter, M., S. Jander, O. W. Witte and G. Stoll (1999). "Heterogeneity of the microglial response in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex." Neuroscience 89(4): 1367-77.
- Schroeter, M., A. Saleh, D. Wiedermann, M. Hoehn and S. Jander (2004). "Histochemical detection of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) contrast medium uptake in experimental brain ischemia." Magn Reson Med 52(2): 403-6.
- Schulze, E., J. T. Ferrucci, Jr., K. Poss, L. Lapointe, A. Bogdanova and R. Weissleder (1995). "Cellular uptake and trafficking of a prototypical magnetic iron oxide label in vitro." Invest Radiol 30(10): 604-10.
- Schwab, J. M., T. D. Nguyen, R. Meyermann and H. J. Schluesener (2001). "Human focal cerebral infarctions induce differential lesional interleukin-16 (IL-16) expression confined to infiltrating granulocytes, CD8+ T-lymphocytes and activated microglia/macrophages." J Neuroimmunol 114(1-2): 232-41.
- Sena, E., H. B. van der Worp, D. Howells and M. Macleod (2007). "How can we improve the pre-clinical development of drugs for stroke?" Trends Neurosci 30(9): 433-9.
- Shapiro, E. M., O. Gonzalez-Perez, J. Manuel Garcia-Verdugo, A. Alvarez-Buylla and A. P. Koretsky (2006). "Magnetic resonance imaging of the migration of neuronal precursors generated in the adult rodent brain." Neuroimage 32(3): 1150-7.
- Simon, G. H., J. Bauer, O. Saborovski, Y. Fu, C. Corot, M. F. Wendland and H. E. Daldrup-Link (2006). "T1 and T2 relaxivity of intracellular and extracellular USPIO at 1.5T and 3T clinical MR scanning." Eur Radiol 16(3): 738-45.
- Simon, G. H., H. J. Raatschen, M. F. Wendland, J. von Vopelius-Feldt, Y. Fu, M. H. Chen and H. E. Daldrup-Link (2005). "Ultrasmall superparamagnetic iron-oxide-enhanced MR imaging of normal bone marrow in rodents: original research original research." Acad Radiol 12(9): 1190-7.
- Simonsen, C. Z., L. Ostergaard, D. F. Smith, P. Vestergaard-Poulsen and C. Gyldensted (2000). "Comparison of gradient- and spin-echo imaging: CBF, CBV, and MTT measurements by bolus tracking." J Magn Reson Imaging 12(3): 411-6.
- Sipola, P., K. Lauerma, M. Husso-Saastamoinen, J. T. Kuikka, E. Vanninen, T. Laitinen, H. Manninen, P. Niemi, K. Peuhkurinen, P. Jaaskelainen, M. Laakso, J. Kuusisto and H. J. Aronen (2003). "First-pass MR imaging in the assessment of perfusion impairment in patients with hypertrophic cardiomyopathy and the Asp175Asn mutation of the alpha-tropomyosin gene." Radiology 226(1): 129-37. .
- St Lawrence, K. S. and T. Y. Lee (1998). "An adiabatic approximation to the tissue homogeneity model for water exchange in the brain: I. Theoretical derivation." J Cereb Blood Flow Metab 18(12): 1365-77.

- Streit, W. J. (2002). "Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS." Glia 40(2): 133-9.
- Stroh, A., C. Faber, T. Neuberger, P. Lorenz, K. Sieland, P. M. Jakob, A. Webb, H. Pilgrimm, R. Schober, E. E. Pohl and C. Zimmer (2005). "In vivo detection limits of magnetically labeled embryonic stem cells in the rat brain using high-field (17.6 T) magnetic resonance imaging." Neuroimage 24(3): 635-45.
- Stroh, A., C. Zimmer, N. Werner, K. Gertz, K. Weir, G. Kronenberg, J. Steinbrink, S. Mueller, K. Sieland, U. Dirnagl, G. Nickenig and M. Endres (2006). "Tracking of systemically administered mononuclear cells in the ischemic brain by high-field magnetic resonance imaging." Neuroimage 33(3): 886-97.
- Sumner, J. P., E. M. Shapiro, D. Maric, R. Conroy, A. P. Koretsky, E. M. Shapiro, O. Gonzalez-Perez, J. Manuel Garcia-Verdugo, A. Alvarez-Buylla and A. P. Koretsky (2009). "In vivo labeling of adult neural progenitors for MRI with micron sized particles of iron oxide: quantification of labeled cell phenotype  
Magnetic resonance imaging of the migration of neuronal precursors generated in the adult rodent brain." Neuroimage 44(3): 671-8.
- Svensson, J., S. Mansson, E. Johansson, J. S. Petersson and L. E. Olsson (2003). "Hyperpolarized <sup>13</sup>C MR angiography using trueFISP." Magn Reson Med 50(2): 256-62.
- Tambasco, N., R. Scaroni, F. Corea, G. Silvestrelli, A. Rossi, V. Bocola and L. Parnetti (2006). "Multimodal use of computed tomography in early acute stroke, part 1." Clin Exp Hypertens 28(3-4): 421-6.
- Tanaka, R., M. Komine-Kobayashi, H. Mochizuki, M. Yamada, T. Furuya, M. Migita, T. Shimada, Y. Mizuno and T. Urabe (2003). "Migration of enhanced green fluorescent protein expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mouse brain following permanent focal ischemia." Neuroscience 117(3): 531-9.
- Tang, T. Y., S. P. Howarth, S. R. Miller, M. J. Graves, U. K.-I. JM, Z. Y. Li, S. R. Walsh, A. J. Patterson, P. J. Kirkpatrick, E. A. Warburton, K. Varty, M. E. Gaunt and J. H. Gillard (2008). "Correlation of carotid atheromatous plaque inflammation using USPIO-enhanced MR imaging with degree of luminal stenosis." Stroke 39(7): 2144-7.
- Taupitz, M., S. Wagner, J. Schnorr, I. Kravec, H. Pilgrimm, H. Bergmann-Fritsch and B. Hamm (2004). "Phase I clinical evaluation of citrate-coated monocrySTALLINE very small superparamagnetic iron oxide particles as a new contrast medium for magnetic resonance imaging." Invest Radiol 39(7): 394-405.
- Taylor, A. M., J. R. Panting, J. Keegan, P. D. Gatehouse, D. Amin, P. Jhooti, G. Z. Yang, S. McGill, E. D. Burman, J. M. Francis, D. N. Firmin and D. J. Pennell (1999). "Safety and preliminary findings with the intravascular contrast agent NC100150 injection for MR coronary angiography." J Magn Reson Imaging 9(2): 220-7.
- Tofts, P. S., G. Brix, D. L. Buckley, J. L. Evelhoch, E. Henderson, M. V. Knopp, H. B. Larsson, T. Y. Lee, N. A. Mayr, G. J. Parker, R. E. Port, J. Taylor and R. M. Weisskoff (1999). "Estimating kinetic parameters from dynamic contrast-enhanced T(1)-weighted MRI of a diffusible tracer: standardized quantities and symbols." J Magn Reson Imaging 10(3): 223-32.
- Tombach, B., P. Reimer, C. Bremer, T. Allkemper, M. Engelhardt, M. Mahler, W. Ebert and W. Heindel (2004). "First-pass and equilibrium-MRA of the aortoiliac region with a superparamagnetic iron oxide blood pool MR contrast agent (SH U 555 C): results of a human pilot study." NMR Biomed 17(7): 500-6.
- Tomimoto, H., I. Akiguchi, H. Wakita, A. Kinoshita, A. Ikemoto, S. Nakamura and J. Kimura (1996). "Glial expression of cytokines in the brains of cerebrovascular disease patients." Acta Neuropathol 92(3): 281-7.

- Vallee, J. P., M. Ivancevic, F. Lazeyras, L. Kasuboski, P. Chatelain, A. Righetti and D. Didier (2003). "Use of high flip angle in T1-prepared FAST sequences for myocardial perfusion quantification." *Eur Radiol* 13(3): 507-14. Epub 2002 Sep 7.
- van der Zijden, J. P., P. van Eijnsden, R. A. de Graaf and R. M. Dijkhuizen (2008). "1H/13C MR spectroscopic imaging of regionally specific metabolic alterations after experimental stroke." *Brain* 131(Pt 8): 2209-19.
- Varallyay, C. G., L. L. Muldoon, S. Gahramanov, Y. J. Wu, J. A. Goodman, X. Li, M. M. Pike and E. A. Neuwelt (2009). "Dynamic MRI using iron oxide nanoparticles to assess early vascular effects of antiangiogenic versus corticosteroid treatment in a glioma model." *J Cereb Blood Flow Metab*.
- Vellinga, M. M., R. D. Oude Engberink, A. Seewann, P. J. Pouwels, M. P. Wattjes, S. M. van der Pol, C. Pering, C. H. Polman, H. E. de Vries, J. J. Geurts and F. Barkhof (2008). "Pluriformity of inflammation in multiple sclerosis shown by ultra-small iron oxide particle enhancement." *Brain* 131(Pt 3): 800-7.
- Viallon, M., Y. Berthezene, M. Decorps, M. Wiart, V. Callot, M. Bourgeois, H. Humblot, A. Briguet and Y. Cremillieux (2000). "Laser-polarized (3)He as a probe for dynamic regional measurements of lung perfusion and ventilation using magnetic resonance imaging." *Magn Reson Med* 44(1): 1-4.
- Wagner, S., J. Schnorr, H. Pilgrimm, B. Hamm and M. Taupitz (2002). "Monomer-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as contrast medium for magnetic resonance imaging: preclinical in vivo characterization." *Invest Radiol* 37(4): 167-77.
- Walczak, P., J. Zhang, A. A. Gilad, D. A. Kedziorek, J. Ruiz-Cabello, R. G. Young, M. F. Pittenger, P. C. van Zijl, J. Huang and J. W. Bulte (2008). "Dual-Modality Monitoring of Targeted Intraarterial Delivery of Mesenchymal Stem Cells After Transient Ischemia." *Stroke*.
- Wang, C., G. W. Miller, T. A. Altes, E. E. de Lange, G. D. Cates, Jr., J. F. Mata, J. R. Brookeman and J. P. Mugler, 3rd (2008). "Extending the range of diffusion times for regional measurement of the 3He ADC in human lungs." *Magn Reson Med* 59(3): 673-8.
- Weber, R., S. Wegener, P. Ramos-Cabrer, D. Wiedermann and M. Hoehn (2005). "MRI detection of macrophage activity after experimental stroke in rats: new indicators for late appearance of vascular degradation?" *Magn Reson Med* 54(1): 59-66.
- Weissleder, R., G. Elizondo, J. Wittenberg, C. A. Rabito, H. H. Bengel and L. Josephson (1990). "Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging." *Radiology* 175(2): 489-93.
- Wiart, M., Y. Berthezene, P. Adeleine, P. Feugier, P. Trouillas, J. C. Froment and N. Nighoghossian (2000). "Vasodilatory response of border zones to acetazolamide before and after endarterectomy : an echo planar imaging-dynamic susceptibility contrast-enhanced MRI study in patients with high-grade unilateral internal carotid artery stenosis." *Stroke* 31(7): 1561-5.
- Wiart, M., S. Carne, W. Mai, H. B. Larsson, B. Neyran and E. Canet-Soulas (2006). "In vivo quantification of regional myocardial blood flow: validity of the fast-exchange approximation for intravascular T1 contrast agent and long inversion time." *Magn Reson Med* 56(2): 340-7.
- Wiart, M., L. Curiel, A. Gelet, D. Lyonnet, J. Y. Chapelon and O. Rouviere (2007a). "Influence of perfusion on high-intensity focused ultrasound prostate ablation: A first-pass MRI study." *Magn Reson Med* 58(1): 119-27.
- Wiart, M., N. Davoust, V. Desestret, N. Nighoghossian and Y. Berthezene (2007b). "Response to Letter by Bendszus et al." *Stroke*.

- Wuart, M., N. Davoust, J. B. Pialat, V. Desestret, S. Moucharaffie, T. H. Cho, M. Mutin, J. B. Langlois, O. Beuf, J. Honnorat, N. Nighoghossian and Y. Berthezene (2007c). "MRI monitoring of neuroinflammation in mouse focal ischemia." Stroke 38(1): 131-7.
- Wuart, M., L. S. Fournier, V. Y. Novikov, D. M. Shames, T. P. Roberts, Y. Fu, D. R. Shalinsky and R. C. Brasch (2004). "Magnetic resonance imaging detects early changes in microvascular permeability in xenograft tumors after treatment with the matrix metalloprotease inhibitor prinomastat." Technol Cancer Res Treat 3(4): 377-82.
- Wuart, M., N. Rognin, Y. Berthezene, N. Nighoghossian, J. C. Froment and A. Baskurt (2001). "Perfusion-based segmentation of the human brain using similarity mapping." Magn Reson Med 45(2): 261-8.
- Wismuller, A., A. Meyer-Baese, O. Lange, M. F. Reiser and G. Leinsinger (2006). "Cluster analysis of dynamic cerebral contrast-enhanced perfusion MRI time-series." IEEE Trans Med Imaging 25(1): 62-73.
- Wu, Y. T., Y. C. Chou, W. Y. Guo, T. C. Yeh and J. C. Hsieh (2007). "Classification of spatiotemporal hemodynamics from brain perfusion MR images using expectation-maximization estimation with finite mixture of multivariate gaussian distributions." Magn Reson Med 57(1): 181-91.
- Xing, B., H. Chen, M. Zhang, D. Zhao, R. Jiang, X. Liu and S. Zhang (2008). "Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat." Stroke 39(8): 2362-9.
- Yach, D., C. Hawkes, C. L. Gould and K. J. Hofman (2004). "The global burden of chronic diseases: overcoming impediments to prevention and control." JAMA 291(21): 2616-22.
- Yang, J., J. Liu, G. Niu, Y. Liu and E. X. Wu (2008). "Magnetic resonance imaging of migrating neuronal precursors in normal and hypoxic-ischemic neonatal rat brains by intraventricular MPIO labeling." Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2008: 363-6.
- Young, A. R., C. Ali, A. Duretete and D. Vivien (2007). "Neuroprotection and stroke: time for a compromise." J Neurochem 103(4): 1302-9.
- Yu, G., D. C. Hess and C. V. Borlongan (2004). "Combined cyclosporine-A and methylprednisolone treatment exerts partial and transient neuroprotection against ischemic stroke." Brain Res 1018(1): 32-7.
- Zhang, Z., M. Chopp and C. Powers (1997). "Temporal profile of microglial response following transient (2 h) middle cerebral artery occlusion." Brain Res 744(2): 189-98.
- Zhang, Z. G., Q. Jiang, R. Zhang, L. Zhang, L. Wang, P. Arniego, K. L. Ho and M. Chopp (2003). "Magnetic resonance imaging and neurosphere therapy of stroke in rat." Ann Neurol 53(2): 259-63.
- Zinderman, C. E., L. Landow and R. P. Wise (2006). "Anaphylactoid reactions to Dextran 40 and 70: reports to the United States Food and Drug Administration, 1969 to 2004." J Vasc Surg 43(5): 1004-9.

## Annexes

Brisset, J. C., V. Desestret, S. Marcellino, E. Devillard, F. Chauveau, F. Lagarde, S. Nataf, N. Nighoghossian, Y. Berthezene and M. Wiart (2009). "Quantitative effects of cell internalization of two types of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles at 4.7T and 7T." European Radiology (In press).

Desestret, V., J. C. Brisset, S. Moucharraffie, E. Devillard, S. Nataf, J. Honnorat, N. Nighoghossian, Y. Berthezene and M. Wiart (2009). "Early-stage investigations of ultrasmall superparamagnetic iron oxide-induced signal change after permanent middle cerebral artery occlusion in mice." Stroke 40(5): 1834-41.

Wiart, M., N. Davoust, J. B. Pialat, V. Desestret, S. Moucharraffie, T. H. Cho, M. Mutin, J. B. Langlois, O. Beuf, J. Honnorat, N. Nighoghossian and Y. Berthezene (2007c). "MRI monitoring of neuroinflammation in mouse focal ischemia." Stroke 38(1): 131-7.

Nighoghossian, N., M. Wiart, S. Cakmak, Y. Berthezene, L. Derex, T. H. Cho, C. Nemoz, F. Chapuis, G. L. Tisserand, J. B. Pialat, P. Trouillas, J. C. Froment and M. Hermier (2007). "Inflammatory response after ischemic stroke: a USPIO-enhanced MRI study in patients." Stroke 38(2): 303-7.

Wiart, M., L. Curiel, A. Gelet, D. Lyonnet, J. Y. Chapelon and O. Rouviere (2007a). "Influence of perfusion on high-intensity focused ultrasound prostate ablation: A first-pass MRI study." Magn Reson Med 58(1): 119-27.

Wiart, M., S. Carne, W. Mai, H. B. Larsson, B. Neyran and E. Canet-Soulas (2006). "In vivo quantification of regional myocardial blood flow: validity of the fast-exchange approximation for intravascular T1 contrast agent and long inversion time." Magn Reson Med 56(2): 340-7.