



HAL
open science

Développements méthodologiques en IRM: du laboratoire au champ

Guilhem Pages

► **To cite this version:**

Guilhem Pages. Développements méthodologiques en IRM: du laboratoire au champ. Ingénierie des aliments. Université Clermont Auvergne, 2019. tel-02790086

HAL Id: tel-02790086

<https://hal.inrae.fr/tel-02790086>

Submitted on 5 Jun 2020

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



UNIVERSITÉ CLERMONT-AUVERGNE
Ecole doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement

ANNEE 2019

MEMOIRE D'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Présenté et soutenu publiquement le 27/09/2019 par

Guilhem PAGÈS

**DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES EN IRM :
DU LABORATOIRE AU CHAMP**

Jury

Rapporteurs :

Professeur	Sami JANNIN	Université Claude Bernard Lyon 1	France
Professeur	Nicolas GIRAUD	Université de Paris	France
Professeur	Dimitrios SAKELLARIOU	Katholieke Universiteit Leuven	Belgique
Docteur	Julien VALETTE	C.E.A., Fontenay-aux-Roses	France
		Ingénieur-Chercheur	

Examineurs :

Docteur	Jean-Marie BONNY	I.N.R.A, Theix	France
		Directeur de recherche	
Docteur	Marie-Christine RALET-RENARD	I.N.R.A. Nantes	France
		Directrice de recherche	

Responsable tutélaire :

Docteur	Anne-Marie DELORT	Université Clermont-Auvergne	France
		Directrice de recherche au C.N.R.S.	



UNIVERSITÉ CLERMONT-AUVERGNE
Ecole doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement

ANNEE 2019

MEMOIRE D'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Présenté et soutenu publiquement le 27/09/2019 par

Guilhem PAGÈS

**DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES EN IRM :
DU LABORATOIRE AU CHAMP**

Jury

Rapporteurs :

Professeur	Sami JANNIN	Université Claude Bernard Lyon 1	France
Professeur	Nicolas GIRAUD	Université de Paris	France
Professeur	Dimitrios SAKELLARIOU	Katholieke Universiteit Leuven	Belgique
Docteur	Julien VALETTE	C.E.A., Fontenay-aux-Roses	France
		Ingénieur-Chercheur	

Examineurs :

Docteur	Jean-Marie BONNY	I.N.R.A, Theix	France
		Directeur de recherche	
Docteur	Marie-Christine RALET-RENARD	I.N.R.A. Nantes	France
		Directrice de recherche	

Responsable tutélaire :

Docteur	Anne-Marie DELORT	Université Clermont-Auvergne	France
		Directrice de recherche au C.N.R.S.	

***A Stefano, à Bob,**
En plus de vos recherches en RMN,
vous aviez un autre point commun ... la gourmandise !*

***A Benjamin,**
Bientôt autant de temps sous que sur Terre,
19 ans après coquin de sort...*

A Tino

Pour se consoler

La veuve prit un moineau

Qu'elle acheta à Gino

Elle ne savait pas

Qu'il s'envolerait si tôt

Elle ne savait pas

Qu'elle en tomberait pour Gino

Elle ne savait pas

Qu'on pouvait crever et revivre à nouveau

(Christian Olivier)

Et à toi que je ne connais pas encore

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements iront évidemment aux différentes personnes m'ayant fait confiance au cours de ces années alors thank you very Philip KUCHEL, tack så mycket István FURÓ, സന്ദിლ Sendhil VELAN et merci Myriam MALET-MARTINO. Ces différentes expériences ont été une occasion unique pour continuer à apprendre la RMN, acquérir de nouvelles compétences, améliorer ma pratique de l'anglais, découvrir de nouvelles cultures et voyager (sur ce de dernier point, un bémol sera mis sur le travail avec Myriam mais un remerciement particulier concernera plutôt le retour au Pays).

Depuis mon arrivée dans l'unité QuaPA, les directions m'ont témoigné un soutien sans faille, je remercie donc Alain KONDJAYAN (directeur d'unité lors de ma prise de fonction) et la direction actuelle, Véronique SANTE-LHOUELLIER et Pierre-Sylvain MIRADE.

Je tiens à remercier M Sami JANNIN, Nicolas GIRAUD, Julien VALETTE et Dimitrios SAKELLARIOU pour avoir accepté d'être rapporteur de mon mémoire. Je remercie également M^{me} Anne-Marie DELORT d'avoir endossé, avec des délais courts, le rôle de responsable tutélaire. Merci à Jean-Marie BONNY et Marie-Christine RALET-RENARD d'être examinateurs de mon HDR.

Evidemment, ce travail a été réalisé en collaboration avec des chercheurs et étudiants des différents laboratoires avec lesquels j'ai collaboré, co-auteur la plupart du temps de mes publications, qu'ils en soient remerciés. En relisant ma production scientifique, je m'aperçois que quelques personnes clefs manquent : Bill BUBB, Peter STILBS, Marianne GIESECKE, Fredrik HALLBERG, Jadegoud YALIGAR et Stéphane BALAYSSAC ; qu'ils trouvent dans ces quelques lignes ma reconnaissance. Que tous les étudiants avec lesquels j'ai pu travailler, échanger et partager de bons moments se reconnaissent dans cette phrase. J'oublie forcément des personnes, je leur prie de bien vouloir m'excuser.

Depuis bientôt cinq ans, j'ai la chance de travailler dans un environnement unique au cœur de la chaîne des Puys, patrimoine mondial de l'UNESCO. Le lieu d'exercice est certes important mais le travail de chercheur se réalise en équipe et il est important que bienveillance, entraide et compassion¹ soient des mots qui résonnent dans l'équipe. Il ne pouvait en être autrement dans une plateforme d'IRM. Un grand merci donc à Jean-Marie BONNY pour sa bienveillance et son aide à la construction de ce projet. L'équipe étant limitée, il m'est facile de remercier l'ensemble des titulaires (par genre puis ordre alphabétique pour éviter toute jalousie !) : Carine CHASSAIN, Sylvie CLERJON, Cécile KELLER, Leslie MAZUEL, Abdlatif BEN MOUSSA et Amidou TRAORE pour leur aide et leur bonne humeur au quotidien.

Pour assurer un travail efficace, il est indispensable que la balance entre vie professionnelle et vie personnelle soit bien équilibrée. Les hasards de la vie sont ainsi faits que j'ai la chance d'avoir deux couples d'amis qui se sont également « égarés » dans le centre de la France permettant de continuer de passer de bonnes soirées avec Fanny & Doumé et Murielle & Cyrille. Aux moments sympas plus rares avec les copains que nous voyons moins souvent (ils se reconnaîtront !).

Un grand merci à toute ma famille pour le soutien qu'ils m'apportent au jour le jour et pour tous leurs encouragements.

Enfin, merci à Stéphanie pour tout ce que nous avons partagé et pour avoir accepté de continuer l'aventure à l'étranger...

¹ Il s'agit là d'une référence à la devise du Président de centre, Jean-Baptiste Coulon

SOMMAIRE

1. Curriculum Vitae	15
1.1. Identité	17
1.2. Titres universitaires	17
1.3. Expériences professionnelles	18
1.4. Prix et récompenses	19
1.5. Gestion de projets de recherche	19
1.6. Formation à la recherche	20
1.6.1. Thèses de doctorat	20
1.6.2. Stages de master	21
1.7. Rayonnement scientifique	21
1.7.1. Expertise	21
1.7.2. Diffusion vers la société	22
1.7.3. Collaborations	22
1.8. Activités d'enseignement	22
1.9. Responsabilités administrative	23
1.10. Production scientifique	24
1.10.1. Chapitres de livres	24
1.10.2. Articles scientifiques avec comité de lecture	24
1.10.3. Communications orales	30
1.10.4. Séminaires	31
1.10.5. Communications par posters	32
2. Activités de recherche	37
2.1. Introduction	39
2.2. Optimisation de la mesure du coefficient de diffusion par RMN	40
2.2.1. La « RMN Chromatographique »	43
2.2.2. Un nouvel échantillonnage de l'intensité des gradients de champ magnétique	50
2.2.3. Réduction de la durée de l'expérience : application à de la diffusion restreinte	54
2.2.4. Une diffusion sur toute la planète	59
2.3. Des méthodes (semi-)quantitatives du glucose dans des systèmes complexes	59
2.3.1. Le CEST en bref	61
2.3.2. Digestion <i>in vitro</i> de l'amidon	63
2.3.3. Métabolisme énergétique <i>in vivo</i>	66
2.3.4. Le plein d'énergie	68
2.4. Quantification en RMN hyperpolarisée	69
2.4.1. Les problématiques de la quantification en RMN hyperpolarisée	72
2.4.2. Quantification de cinétiques <i>in vitro</i>	73
2.4.3. Comment estimer simplement et facilement les constantes cinétiques en utilisant un modèle simplifié	75
2.4.4. Une relaxation rapide	76
2.5. Synthèse	77
3. Projet de recherche	79
3.1. Introduction	81
3.2. Développement de contrastes métaboliques en IRM à haut-champ magnétique	83

3.2.1. L'IRM CEST	83
3.2.2. La DNP par dissolution	85
3.3. L'IRM <i>in situ</i>	87
3.4. Résumé	90
4. Conclusion	91
Références bibliographiques	95
Abréviations	103
Liste des tableaux	105
Liste des figures	107

1. CURRICULUM VITAE

1.1. IDENTITE

Etat civil

Guilhem Pagès
Nationalité française
Né à Toulouse (31) le 17 novembre 1979

Situation professionnelle

Ingénieur de recherche en conception et développement en expérimentation
BAP C – Sciences de l'ingénieur et instrumentation scientifique
Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)
Département caractérisation et élaboration des produits issus de l'agriculture (CEPIA)
Unité de recherche propre INRA Qualité des Produits Animaux (UR370 QuaPA)
Plateforme d'imagerie AgroResonance

Adresse professionnelle

INRA site de Theix
Plateforme AgroResonance
63122 Saint-Genès-Champanelle
France

Téléphone

+33 (0)4 73 62 41 75

Email

guilhem.pages@inra.fr

1.2. TITRES UNIVERSITAIRES

- 2006** **Doctorat** en Chimie Moléculaire et Molécules Bioactives, Mention Très Honorable, Université P. Cézanne, Marseille
Directeur de thèse : Professeur Stefano Caldarelli
Titre : La « RMN Chromatographique »
- 2002** **Ingénieur** de l'Ecole Nationale Supérieure de Synthèses, de Procédés et d'Ingénierie Chimiques d'Aix-Marseille (ENSSPICAM), option Synthèse Organique Industrielle, Mention Bien
Université Paul Cézanne, Marseille
- 2002** **DEA Chimie Moléculaire et Molécules Bioactives**, option Synthèse Organique Industrielle, Mention Assez-Bien
Université Paul Cézanne, Marseille
- 1999** **DUT de Chimie**, option chimie, orientation qualité, Mention Assez-Bien
Université Paul Sabatier, Toulouse

1.3. EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

- Depuis 10/2014** **Plateforme AgroResonance, UR 370 QuaPA, INRA, Saint-Genès-Champagnelle**
Ingénieur de recherche
- Développe les mesures RMN en dehors du laboratoire pour répondre à des problématiques en agroécologie
 - Généralise l'utilisation du contraste CEST en IRM avec des applications à la fois en médecine et en science de l'aliment
 - Optimise et écrit des protocoles RMN/IRM pour répondre aux problématiques des clients
 - Responsable d'un processus de la norme ISO 9001
- 09/2014** **Groupe de RMN Biomédicale, UMR 5068, Université Paul Sabatier, Toulouse**
03/2014 **Contrat Post-Doctoral** dans l'équipe du **Professeur Myriam Malet-Martino**
- Optimisation des mesures de diffusion par RMN pour déformuler des mélanges complexes
 - Caractérisation de l'adultération dans les compléments alimentaires par RMN de paillasse
- 02/2014** **Singapore BioImaging Consortium, A*STAR, Singapour**
02/2011 **Senior Research Fellow** dans l'équipe du **Professeur Philip W Kuchel**
- Etude de métabolismes par RMN du ^{13}C hyperpolarisé
 - Développement d'une technique d'imagerie pour mesurer l'activité du cerveau
 - Maintenance du spectromètre RMN et de l'hyperpolariseur
- 01/2011** **Institut Royal de Technology (KTH), Département de Chimie-Physique, Stockholm**
02/2010 **Contrat Post-Doctoral** dans l'équipe du **Professeur István Fűrő**
- Caractérisation de la diffusion de l'eau dans le bois
 - Etude des réactions chimiques entre le bois et des huiles végétales
 - Développement de séquences d'impulsions pour mesurer la diffusion dans des milieux complexes
- 12/2009** **School of Molecular and Microbial Biosciences, Université de Sydney, Sydney**
01/2007 **Contrat Post-Doctoral** dans l'équipe du **Professeur Philip W Kuchel**
- Développement de séquences d'impulsions RMN pour mesurer rapidement le coefficient de diffusion
 - Etudes cinétiques de l'évolution de la forme des globules rouges
 - Etude de la digestion de l'amidon par RMN et RMN électrophorétique
 - Caractérisation de peptides du canal hERG (cœur)
- 10/2006** **Jeune Equipe 2421 TRACES, Université Paul Cézanne, Marseille**
10/2003 **Thèse** financée par la région PACA et le laboratoire pharmaceutique DISTRI B3
- Développement d'une méthode par RMN avec une sonde HRMAS permettant de ralentir sélectivement la mobilité des molécules
 - Mise au point d'une méthode de dosage des principes actifs du millepertuis par CLHP à l'aide de plans d'expériences

- 09/2003 Laboratoire Pharmaceutique DISTRIB3**, Marseille
- 09/2002 Chargé de mission**
- Participation à la partie technique d'un dossier d'AMM
 - Mise au point et développement de méthodes analytiques
- 09/2002 UMR 6516 Synthèse, Catalyse et Chiralité**, Université Paul Cézanne, Marseille
- 02/2002 Stage de fin d'études en école d'ingénieur**
- Synthèse et caractérisation de supports chromatographiques
 - Dosage de principes actifs par CLHP sur colonne monolithique
- 10/2001 Sanofi~Synthélabo**, Laboratoire de Mise au point de Procédés, Montpellier
- 07/2001 Stage de début de dernière année d'école d'ingénieur**
- Mise au point de stratégies de synthèse
 - Transposition dans un atelier pilote
- 07/1999 Pierre Fabre**, Centre de Développement Chimique et Industriel, Gaillac
- 04/1999 Stage de fin d'IUT**
- Transposition de voies de synthèse

1.4. PRIX ET RECOMPENSES

- 2006** MRC award for young scientist, 1 500 €
- 2005** 3ème prix du poster au congrès Chemometric (Lille), 2 livres
- 2003** Bourse de thèse du conseil régional Provence-Alpes-Côte d'Azur, 3 ans

1.5. GESTION DE PROJETS DE RECHERCHE

Depuis l'obtention de mon doctorat, j'ai eu pour souci constant de trouver des financements pour mener à bien mes projets de recherche. J'ai obtenu des subventions lors de mes séjours en Australie et Singapour. Depuis mon arrivée à l'INRA, j'ai répondu à différents appels d'offre (avec plus ou moins de succès) pour assurer le financement de mes projets de recherche. Ces financements proviennent tant du niveau local (I-SITE), que régional (ligue régionale contre le cancer) et national (participant à un projet ANR).

- 2018 Projet EMERGENCE financé par I-SITE CAP 20-25**, porteur, 1 an, 30 000€
Augmenter la sensibilité de l'imagerie du ^{13}C hyperpolarisé par polarisation croisée : premières démonstrations in vivo
- 2018 Programme I-SITE CAP 20-25**, financement d'une bourse de thèse
Développement et validation d'un nouveau capteur pour mesurer in situ et localement les quantités et flux d'eau dans les agroécosystèmes
- 2017 Ligue Régionale contre le cancer**, co-porteur, 2 ans, 40 000€ dont 20 000€ pour l'IRM
Développement d'une méthode d'imagerie innovante contrastant les caractéristiques du microenvironnement du chondrosarcome: Diagnostic et suivi de nouvelles prodrogues bispécifiques
- 2017 Agence Nationale pour la Recherche**, participant, 4 ans, 757 000€ dont 40 000€ pour les études IRM
GlutN : Blé et pains spécifiques pour résoudre la sensibilité au gluten

- 2016 Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale**, participant, 3 ans, 200 000€ dont 17 000€ pour le développement du contraste CEST
Vers la sélection de variétés de blés au gluten plus digestible ?
- 2013 JCO Exploratory Grant (A*STAR, Singapour)**, co-porteur, 1 an, 133 000 SGD\$ (~85 000€)
Enabling multi-nuclear dynamic nuclear polarization - nuclear magnetic resonance (DNP-NMR)
- 2009 University of Sydney Bridging Support Grant**, porteur, 1 an, 20 000 AUSS\$ (~13 000€)
NMR diffusion and exchange spectroscopy for studying chemical transformation in heterogeneous biochemical systems

1.6. FORMATION A LA RECHERCHE

Durant mes quinze années de recherche, j'ai continuellement formé des étudiants à et par la recherche, du niveau de DUT jusqu'à l'encadrement quotidien de doctorants. J'ai ainsi pu faire découvrir mon métier à quelques étudiants. En contrepartie, ces personnes m'ont permis de faire avancer mes travaux de recherche et d'explorer différentes trajectoires que je n'aurais pu accomplir tout seul.

Les tableaux ci-dessous présentent les différents étudiants que j'ai encadrés au cours de leur thèse ou lors d'un de leur stage de master. Lorsque le nom des étudiants est en rouge cela signifie que les travaux de l'étudiant ont été valorisés sous la forme d'au moins une communication scientifique.

1.6.1. THÈSES DE DOCTORAT

Au cours de mes différentes expériences postdoctorales, j'ai eu l'opportunité d'encadrer un étudiant en thèse lors de mon séjour en Australie. Actuellement, je co-encadre deux étudiantes qui ont commencées leur thèse à l'automne 2018. Le tableau ci-dessous résume ces trois thèses.

Etudiant	Dates	Direction (encadrement)	Sujet
Anthony Dona	2007-2010	P.W. Kuchel & R.G. Gilbert (G. Pagès)	<i>Quantitative kinetics of starch digestion : nuclear magnetic resonance and numerical analysis</i>
Roxanne Autissier	10/2018 -	E. Miot-Noirault & A. Traoré (G. Pagès & L. Mazuel)	<i>Développement en imagerie multimodale pour une amélioration de la prise en charge des patients en oncologie</i>
Nour El Sabbagh	10/2018 -	F. Durif & J.M. Bonny (G. Pagès & C. Chassain)	<i>Exploration du métabolisme des noyaux gris centraux en spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du ^{13}C couplée à des techniques d'hyperpolarisation</i>

1.6.2. STAGES DE MASTER

Depuis l'obtention en 2002 de mon diplôme d'ingénieur, j'ai encadré une vingtaine d'étudiants de niveaux M1 ou M2.

Etudiant	Année	Durée	Formation	Université
Delphine Espana	2003	4 mois	Ingénieur ENSSPICAM (2 ^{ème} année)	Marseille
Karine Playv	2003	4 mois	M1 Chimie analytique	Marseille
Cédric Courtois	2003	6 mois	Ingénieur ENSSPICAM (3 ^{ème} année)	Marseille
Laure Guichet	2003-2004	2 jours/semaine	M1 Formulation	Marseille
Mathieu Adam-Beret	2003-2004	2 jours/semaine	M1 Formulation	Marseille
Nathalie Padoly	2004-2005	2 jours/semaine	M1 Formulation	Marseille
Michael Mazarin	2004	6 mois	Ingénieur ENSSPICAM (3 ^{ème} année)	Marseille
Isabel Latorre	2005	6 mois	M2 Chimie analytique	Marseille
Laetitia Brillon	2005-2006	2 jours/semaine	M1 Formulation	Marseille
Gregory Excoffier	2006	6 mois	M2 Chimie analytique	Marseille
Jean-Pierre Placial	2008	4 mois	ENS	Cachan
Maxime Doods	2008	4 mois	Institut Polytechnique	Beauvais
Alice Bonny	2014	6 mois	M2 Chimie santé	Toulouse
Amaël Morisse	2015	5 mois	M1 Chimie analytique	Nantes
Amina Chorfi	2016	6 mois	Polytech (3 ^{ème} année)	Clermont-Ferrand
Yiliang Min	2017	5 mois	UTC (2 ^{ème} année)	Compiègne
Charbel Assaf	2018	6 mois	M2 Physique & imagerie	Strasbourg
Nour El Sabbagh	2018	6 mois	M2 Physique & imagerie	Strasbourg
Khalid Beneddine	2018	6 mois	M2 Technologies biomédicales	Clermont-Ferrand
Magali Nuixe	2019	6 mois	UTC (3 ^{ème} année)	Compiègne
Youssef Chahid	2019	6 mois	M2 Physique médicale	Rennes
Rim Aliouissi	2019	6 mois	M2 Technologies biomédicales	Clermont-Ferrand

1.7. RAYONNEMENT SCIENTIFIQUE

1.7.1. EXPERTISE

Rapporteur pour les revues

Analyst / Angew. Chem.-Int. Ed.
 Micropor. Mesopor. Mat. /Magn. Reson. Chem.
 Org. Process Res. Dev. / Plos One
 Postharvest Biol. Technol. / RSC Adv. / Sci. Adv.

Evaluateur pour l'Israel Science Foundation (ISF)

1.7.2. DIFFUSION VERS LA SOCIÉTÉ

- 2019** Animateur aux Journées Portes Ouvertes du site de Theix du centre INRA
2015 Animateur aux Journées Portes Ouvertes du site de Theix du centre INRA
2011 Organisateur d'une partie du « Student Challenge » de Singapour
2005 Animateur à la Fête de la Science sur le thème « encres et pigments »

1.7.3. COLLABORATIONS

- 2007** Pr. Jamie Vandenberg, Victor Chang Cardiac Research Institute, Sydney
Détermination structurale de peptides de la protéine hERG
- 2010** Pr. Matt Johansson, Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm
Caractérisation RMN de l'oxydation d'huiles végétales utilisées pour protéger le bois
- 2012** Pr. Marc Garland, Institute of Chemical and Engineering Sciences (A*STAR), Singapour
Déconvolution du signal RMN de l'urée hyperpolarisé pour une meilleure estimation des constantes cinétiques
- 2015** Pr. Patrick Giraudeau, Université de Nantes
Utilisation de la RMN ultra-rapide pour étudier l'oxydation des acides aminés
- 2018** Dr. Hélène Ratiney, CNRS, Lyon
Méthodes de reconstruction pour l'imagerie du ^{13}C hyperpolarisé
- 2018** Pr. Sami Jannin, Université Claude Bernard, Lyon
Développement de la polarisation croisée sur un hyperpolariseur HyperSense

1.8. ACTIVITÉS D'ENSEIGNEMENT

De par mon parcours professionnel axé principalement sur des activités de recherche, la majorité de mes enseignements a été réalisée au cours de mes années de doctorat. Ayant construit mon réseau professionnel au niveau local depuis mes quatre ans à l'INRA, je viens de commencer quelques interventions lors de cette année universitaire 2018-2019 en tant que personnalité extérieure dans la licence professionnelle de chimie analytique et le M2 de technologies médicale.

- 2019** Cours de résonance magnétique nucléaire
 6h à des L3 Pro de chimie analytique
- 2019** Cours de résonance magnétique nucléaire
 2h à des M2 technologies médicale
- 2005 et 2006** Travaux dirigés sur l'arbitrage au Basket-Ball assurés dans le cadre de vacation
 24h à des étudiants de L1 et L2
- 2003 à 2006** Travaux Pratiques de chimie analytique assurés dans le cadre de vacances
 50h à des étudiants de M1
 20h à des professionnels en formation continue au CNAM

Cours de résonance magnétique nucléaire

Début 2019, j'ai donné 4 cours de RMN à des L3 professionnel de chimie analytique à l'université de Clermont Auvergne en tant qu'intervenant extérieur. Le but était de compléter la formation reçue en début d'année universitaire (RMN du liquide) et d'aborder notamment les techniques qu'ils pourraient être amenés à rencontrer dans un environnement professionnel. Les cours se sont donc focalisés sur (1) la RMN d'échantillons (semi-)solides, (2) la relaxométrie, (3) l'instrumentation et (4) l'IRM.

J'ai également donné le 1^{er} cours du module d'IRM du M2 technologies médicale de l'université Clermont Auvergne. J'ai enseigné les notions de base de la RMN à ces étudiants.

- **TP de chimie analytique**

Dans le cadre de la formation initiale, j'ai assuré 50 heures de T.P. (10 séances de 5h) pour des étudiants de 2^{ème} année d'école d'ingénieur chimiste (ENSSPICAM) et de Master 1 à l'Université Paul-Cézanne. Le but principal de ces T.P. consistait à familiariser les étudiants aux diverses techniques analytiques (chromatographiques, spectroscopiques) et aux différentes méthodes de quantification (étalonnages internes, externes et ajouts dosés) ainsi que d'exercer un regard critique sur leurs résultats.

Dans le cadre de la formation continue, j'ai assuré 20 heures de T.P. (4 séances de 5h) pour des techniciens de laboratoire suivant la formation en génie analytique du CNAM. Le but de ces T.P. était de mettre en pratique les connaissances théoriques acquises en cours et de les confronter aux différents problèmes (cohérence des résultats, problèmes matériels) qu'ils peuvent rencontrer dans un laboratoire.

- **TD optionnel sur la découverte et l'apprentissage de l'arbitrage au Basket-ball**

La faculté des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) de Marseille a mis en place en 2004 une formation sur l'arbitrage dans les sports collectifs. Il a été fait appel aux instances dirigeantes des différentes ligues régionales pour aider à développer ces formations. En tant que membre de la Commission Régionale des Arbitres Marqueurs Chronomètres (CRAMC) de Basket-ball, j'ai été responsable de cette formation de 12h par an. J'ai assuré ce travail au cours des deux premières années. La finalité de ce module était de former des étudiants pour arbitrer des rencontres du championnat universitaire et de mettre en exergue la complexité du rôle de l'arbitre.

1.9. RESPONSABILITES ADMINISTRATIVE

- 2012-2013** **Responsable de la répartition des créneaux** sur les IRM et RMN
Responsable de la maintenance de la RMN et de l'hypermagnétique
- 2015** **Membre du comité** chargé de la rédaction du document pour l'HCERES
- 2015-2016** **Membre du conseil scientifique** de l'unité
- Depuis 2016** **Membre de la cellule d'animation scientifique** de l'unité
- Depuis 2014** **Responsable du processus** « Traiter les demandes » du système de management de la qualité de la plateforme (certification ISO 9001 v2015)

1.10. PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Je suis l'auteur de 3 chapitres de livres, de 42 articles scientifiques dans des comités de lecture. J'ai présenté mes travaux lors de 16 communications orales et de 44 par affiches dans des congrès nationaux et internationaux et dans 5 séminaires.

Les auteurs apparaissant en rouge sont des étudiants que j'ai encadrés durant leur stage. Le symbole † signifie que les auteurs ont participé équitablement au travail et * désigne l'auteur correspondant. Pour les communications, le premier auteur est la personne ayant présentée les travaux.

1.10.1. CHAPITRES DE LIVRES

Je suis l'auteur de trois chapitres de livres

- C3 **Diffusion fundamentals III, 2009**, 409-420, C. Chmelik, N. Kanellopoulos, J. Kärger, D. Theodorou Eds, Leipziger Universitätsverlag ed., Leipzig
T. J. Larkin, **G. Pagès**, P. W. Kuchel*
Fast recording of NMR diffusion-diffraction: red cell shape evolution correlated with ATP concentration
- C2 **Diffusion fundamentals II, 2007**, 52-68, S. Brandani, C. Chmelik, J. Kärger, R. Volpe Eds, Leipziger Universitätsverlag, Leipzig
G. Pagès*, P.W. Kuchel
NMR methods for the fast-recording of diffusion
- C1 **Diffusion fundamentals II, 2007**, 345-360, S. Brandani, C. Chmelik, J. Kärger, R. Volpe Eds, Leipziger Universitätsverlag, Leipzig
P.W. Kuchel*, **G. Pagès**
NMR diffusion diffraction and diffusion interference from cells

1.10.2. ARTICLES SCIENTIFIQUES AVEC COMITE DE LECTURE

Mes travaux ont été publiés dans 42 articles scientifiques. Sur ces 42 publications, je suis le premier auteur et/ou l'auteur correspondant sur 41% d'entre elles. 75% de cette production l'a été dans des revues classées comme exceptionnelle ou excellente dans le référentiel NORIA de l'INRA. Comme toute classification, celle-ci présente certaines aberrations dont le fait que l'un des journaux de référence dans le domaine, J. Magn. Reson., n'est classé que comme revue « correcte ».

Comme l'évaluation d'un chercheur se fait toujours actuellement *via* la bibliométrie, d'après les données disponibles sur ResearchID, 36 articles contiennent des données de citation. Ces articles ont été cités 591 fois et mon facteur *h* est de 13. Une excellente analyse critique de la pertinence de ces données de bibliométrie a été réalisée par Molinié et Bodenhausen [1].

- P42. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019**, Accepted
T. Leger, K. Azarnoush, A. Traoré, L. Cassagnes, J.-P. Rigaudière, C. Jouve, **G. Pagès**, D. Bouvier, V. Sapin, B. Pereira, J.-M. Bonny, L. Demaison*
Antioxidant and cardio-protective effects of EPA in early low-severity sepsis through UCP3- and SIRT3-upholding of the mitochondrial redox potential
(DOI:)

- P41. **Magnetic Resonance in Medicine**, 2019, 81, 759-764
G. Pagès, J.-M. Bonny*
Uncertainties of calculated Cramér-Rao lower bounds: implications for quantitative MRS
(DOI: 10.1002/mrm.27415)
- P40. **Communications Biology**, 2018, 1, 232, 1-8
D. Shishmarev, P. W. Kuchel*, **G. Pagès**, A. J. Wright, R. L. Hesketh, F. Kreis, K. M. Brindle
Glyoxalase activity in human erythrocytes and mouse lymphoma, liver and brain probed with hyperpolarized ¹³C-methylglyoxal
(DOI: 10.1038/s42003-018-2041-1)
- P39. **Analyst**, 2017, 142, 3771-3796
G. Pagès, V. Gilard, R. Martino, M. Malet-Martino*
Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance measurements (PFG NMR) for diffusion ordered spectroscopy (DOSY) mapping
(DOI: 10.1039/c7an01031a)
- P38. **Food Hydrocolloids**, 2017, 66, 246-258
A. Duconseille, M. Traikia, M. Lagrée, C. Jousse, **G. Pagès**, P. Gatellier, T. Astruc, V. Santé-Lhoutellier*
The impact of processing and aging on the oxidative potential, molecular structure and dissolution of gelatin
(DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.11.034)
- P37. **Behavioural Brain Research**, 2017, 317, 301-310
O. Ouachikh, C. Chassain, **G. Pagès**, F. Durif, A. Hafidi*
mGlu5 receptor antagonist blocks bromocriptine-induced conditioned place preference in bilateral mesolimbic-lesioned rat
(DOI: 10.1016/j.bbr.2016.09.030)
- P36. **Analytical Chemistry**, 2016, 88, 3304-3309
G. Pagès, **A. Bonny**, V. Gilard, M. Malet-Martino*
Pulsed field gradient NMR with sigmoid shape gradient sampling to produce more detailed diffusion ordered spectroscopy maps of real complex mixtures: Examples with medicine analysis
(DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04781)
- P35. **Magnetic Resonance in Medicine**, 2015, 73, 2075-2080
G. Pagès, P. W. Kuchel*
FmR_α analysis: rapid and direct estimation of relaxation and kinetic parameters from dynamic nuclear polarization timecourses
(DOI: 10.1002/mrm.25345)
- P34. **Analytical Chemistry**, 2014, 86, 11897-11904
G. Pagès, A. Gerdova, D. Williamson, V. Gilard, R. Martino, M. Malet-Martino*
Evaluation of a bench-top cryogen-free low-field 1H NMR spectrometer for the analysis of sexual enhancement and weight loss dietary supplements adulterated with pharmaceutical substances
(DOI: 10.1021/ac503699u)

- P33. **NMR in Biomedicine**, 2014, 27, 1203-1210
G. Pagès, Y. L. Tan, P. W. Kuchel*
Hyperpolarized [1,13C]pyruvate in lysed human erythrocytes: effects of co-substrate supply on reaction time courses
(DOI: 10.1002/nbm.3176)
- P32. **FEBS Letters**, 2014, 588, 1821-1826
A. M. Torres*, P. Bansal, J. M.S. Koh, G. Pagès, M. J. Wu, P. W. Kuchel
Structure and antimicrobial activity of platypus 'intermediate' defensin-like peptide
(DOI: 10.1016/j.febslet.2014.03.044)
- P31. **Journal of Biomolecular NMR**, 2014, 59, 31-41
K. Nagashima*, D. K. Rao, G. Pagès, S.S. Velan, P. W. Kuchel
Long-lived spin state of a tripeptide in stretched hydrogel
(DOI: 10.1007/s10858-014-9821-7)
- P30. **Magnetic Resonance Imaging**, 2014, 32, 379-384
N. Agarwal, G. Pagès, L. D'Silva, N. Said, P. W. Kuchel, S.S. Velan*
Dependence of residual dipolar couplings on foot angle in 1H MR spectra from skeletal muscle
(DOI: 10.1016/j.mri.2014.01.001)
- P29. **Biophysical Journal**, 2013, 105, 1956-1966
G. Pagès, M. Puckeridge, G. Liangfeng, Y. L. Tan, C. Jacob, M. Garland, P. W. Kuchel*
Transmembrane exchange of hyperpolarized ¹³C-urea in human erythrocytes: sub-minute timescale kinetic analysis
(DOI: 10.1016/j.bpj.2013.09.034)
- P28. **Journal of Magnetic Resonance**, 2013, 234, 35-43
G. Pagès, S. Dvinskikh, I. Furó*
Suppressing magnetization exchange effects in stimulated-echo diffusion experiments
(DOI: 10.1016/j.jmr.2013.06.001)
- P27. **FEBS Letters**, 2013, 587, 2790-2797
P. W. Kuchel*, G. Pagès, C. Naumann
'Chiral compartmentation' in metabolism: enzyme stereo-specificity yielding evolutionary options
(DOI: 10.1016/j.febslet.2013.05.025)
- P26. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 2013, 33, 1270-1278
F. Nasrallah, G. Pagès, P. W. Kuchel, K. H. Chuang*, X Golay*
Imaging brain deoxyglucose uptake and metabolism by gluco-CEST MRI
(DOI: 10.1038/jcbfm.2013.79)
- P25. **Magnetic Resonance Insights**, 2013, 6, 13-21
G. Pagès*, P. W. Kuchel
Mathematical modeling and data analysis of NMR experiments using hyperpolarized ¹³C metabolites
(DOI: 10.4137/MRIS11084)

- P24. **European Biophysics Journal**, 2013, 42, 71-79
C. A. Ng*, A. M. Torres, **G. Pagès**, P. W. Kuchel, J. I. Vandenberg
Insights into hERG K⁺ channel structure and function from NMR studies
(DOI: 10.1007/s00249-012-0808-6)
- P23. **European Biophysics Journal**, 2013, 42, 3-16
T. J. Larkin*, **G. Pagès**, B. Chapman, J. E. Rasko, P. W. Kuchel
NMR q-space analysis of canonical shapes of human erythrocytes: stomatocytes, discocytes, spherocytes and echinocytes
(DOI: 10.1007/s00249-012-0822-8)
- P22. **Concepts in Magnetic Resonance Part A**, 2012, 40, 205-214
P. W. Kuchel*, **G. Pagès**, K. Nagashima, S. Velan, V. Vijayaragavan, V. Nagarajan, K. H. Chuang
Stejskal-Tanner equation derived in full
(DOI: 10.1002/cmr.a.21241)
- P21. **Journal of Magnetic Resonance**, 2012, 222, 68-73
M. Puckeridge, **G. Pagès**, P. W. Kuchel*
Simultaneous estimation of T₁ and the flip angle in hyperpolarized NMR experiments using acquisition at non-regular time intervals
(DOI: 10.1016/j.jmr.2012.06.006)
- P20. **Progress in Organic Coatings**, 2012, 75, 259-263
G. Pagès, A. M. Salehi, S. V. Dvinskikh, M. Johansson, I. Furó*
Vegetable oil reactions within wood studied by direct ¹³C excitation with ¹H decoupling and magic-angle spinning (MAS) NMR
(DOI: 10.1016/j.porgcoat.2012.05.007)
- P19. **Journal of Physical Chemistry B**, 2012, 116, 2635-2642
A. E. Frise, **G. Pagès**, M. Shtein, I. Pri Bar, O. Regev, I. Furó*
Polymer binding to carbon nanotubes in aqueous dispersions: residence time on the nanotube surface as obtained by NMR diffusometry
(DOI: 10.1021/jp209800u)
- P18. **Progress in Organic Coatings**, 2011, 72, 325-333
A. M. Salehi, **G. Pagès**, I. Furó, G. Henriksson, M. Johansson*
Oxidation of methyl linoleate in the presence of lignin
(DOI: 10.1016/j.porgcoat.2011.05.004)
- P17. **Journal of Physical Chemistry C**, 2011, 115, 18776-18781
C. Carrara, **G. Pagès**, C. Delaurent, S. Viel, S. Caldarelli*
Mass transport of volatile molecules in porous materials: evaporation-condensation phenomena described by NMR diffusometry
(DOI: 10.1021/jp2074607)
- P16. **Carbohydrate Polymers**, 2011, 83, 1775-1786
A. Dona, **G. Pagès**, R. G. Gilbert, P. W. Kuchel*
Starch granule characterization by kinetic analysis of their stages during enzymic hydrolysis: ¹H nuclear magnetic resonance studies
(DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.10.042)

- P15. **Carbohydrate Polymers**, **2011**, 86, 1525-1532
A. Dona, **G. Pagès**, P. W. Kuchel*
Kinetics of starch hydrolysis and glucose mutarotation studied by NMR chemical exchange saturation transfer
(DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.06.056)
- P14. **Magnetic Resonance in Medicine**, **2010**, 64, 645-652
G. Pagès, T.W. Yau, P. W. Kuchel*
Erythrocyte shape reversion from echinocytes to discocytes: kinetics via fast-measurement NMR diffusion-diffraction
(DOI: 10.1002/mrm.22457)
- P13. **Carbohydrate Polymers**, **2010**, 80, 599-617
A. Dona, **G. Pagès**, R. G. Gilbert, P. W. Kuchel*
Digestion of starch: in vivo and in vitro kinetic models used to characterise oligosaccharide or glucose release
(DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.01.002)
- P12. **European Biophysics Journal**, **2009**, 39, 111-120
G. Pagès, A. M. Torres, P. Ju, P. S. Bansal, P. F. Alewood, P. W. Kuchel, J. I. Vanderberg*
Structure of the pore-helix of the hERG K^+ channel
(DOI: 10.1007/s00249-009-0433-1)
- P11. **Biomacromolecules**, **2009**, 10, 638-644
A. Dona, **G. Pagès**, R. G. Gilbert, M. Gaborieau, P. W. Kuchel*
Kinetics of in vitro digestion of starches monitored by time-resolved 1H nuclear magnetic resonance
(DOI: 10.1021/bm8014413)
- P10. **Journal of Biological Chemistry**, **2009**, 284, 1000-1008
P. Ju†, **G. Pagès**†, R. P. Riek, P. Chen, A. M. Torres, P. S. Bansal, S. Kuyucak, P. W. Kuchel, J. I. Vanderberg*
The pore domain outer helix contributes to both activation and inactivation of the hERG K^+ channel
(DOI: 10.1074/jbc.M806400200)
- P9. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, **2008**, 28, 1409-1416
G. Pagès, D. Szekely, P. W. Kuchel*
Erythrocyte shape evolution recorded with fast-measurement NMR diffusion-diffraction
(DOI: 10.1002/jmri.21588)
- P8. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, **2008**, 392, 451-461
C. Courtois*, **G. Pagès**, S. Caldarelli, C. Delaurent
Cholesteric bonded stationary phases for high-performance liquid chromatography: a comparative study of the chromatographic behavior
(DOI: 10.1007/s00216-008-2276-5)

- P7. **Journal of Magnetic Resonance**, 2008, 190, 113-123
S. Viel*, F. Ziarelli, **G. Pagès**, C. Carrara, S. Caldarelli
Pulsed field gradient magic angle spinning NMR self-diffusion measurements in liquids
(DOI: 10.1016/j.jmr.2007.10.010)
- P6. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 2007, 86, 159-167
G. Pagès*, C. Delaurent, R. Phan-Tan-Luu, M. Sergent
Different chemometric approaches to optimize the assay of Saint John's Wort active ingredients
(DOI: 10.1016/j.chemolab.2006.06.006)
- P5. **Angewandte Chemie International Edition**, 2006, 45, 5950-5953
G. Pagès*, C. Delaurent, S. Caldarelli
Hot Paper. Communication frontispiece picture.
Simplified analysis of mixtures of small molecules by Chromatographic NMR spectroscopy
(DOI: 10.1002/anie.200601622)
- P4. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, 2006, 385, 716-723
G. Pagès, **M. Mazarin**, M. Sergent, R. Phan-Tan-Luu, C. Delaurent*
Optimization of the assay of naphthodianthrone in St. John's wort's dry extract by Reversed Phase Liquid Chromatography
(DOI: 10.1007/s00216-006-0426-1)
- P3. **Analytical Chemistry**, 2006, 78, 561-566
G. Pagès*, C. Delaurent, S. Caldarelli
Investigation of the chromatographic process via pulsed-gradient spin-echo nuclear magnetic resonance. The role of the solvent composition in partitioning chromatography
(DOI: 10.1021/ac051454n)
- P2. **Spectra Analyse**, 2005, 245, 36-46
C. Delaurent*, **G. Pagès**, S. Alpheran
Void volume and band broadening determination in reversed phase liquid chromatography
- P1. **Chromatographia**, 2002, 56, 277-282
C. Brenier-Maurel, C. Delaurent, **G. Pagès**, M.-C. Guilhem, A.-M. Siouffi*
Optimization of St John's Wort flavonoid separation by reversed phase liquid chromatography on monolithic support
(DOI: 10.1007/BF02491932)

1.10.3. COMMUNICATIONS ORALES

Mes différentes communications orales et par posters ont été réalisées à la fois dans les réseaux spécialisés (RMN grand sud, GERM) et dans les congrès de référence en RMN/IRM (EUROMAR, ISMRM, ICAMRFS). A l'exception des deux dernières communications orales à la SFRMBM (CO15 & 16), j'ai présenté toutes les autres.

CO16. **4^{ème} congrès de la société française de résonance magnétique en biologie & médecine (SFRMBM), March 2019**, Strasbourg (France)

J.-M. Bonny, **G. Pagès**

Incertitude de la borne de Cramér-Rao : conséquences en SRM quantitative

CO15. **4^{ème} congrès de la société française de résonance magnétique en biologie & médecine (SFRMBM), March 2019**, Strasbourg (France)

C. Chassain, C. Melon, **G. Pagès**, Y. Le Fur, P. Gubellini, P. Salin, L. Kerkerian-Le Goff, Franck Durif

Suivi longitudinal du métabolisme cérébral par imagerie spectroscopique de Résonance Magnétique Nucléaire chez des modèles murins progressifs de la maladie de Parkinson

CO14. **14th International conference on the applications of magnetic resonance in food science (ICAMRFS), September 2018**, Rennes (France)

G. Pagès, A. Traoré, J.-M. Bonny

A robust and prior knowledge independent method to interpret non-negative least squares (NNLS) T₂ relaxation results

CO13. **Annual meeting of the international society for magnetic resonance in medicine (ISMRM), June 2018**, Paris (France)

G. Pagès, J.-M. Bonny

To which extent the Cramér-Rao bound (CRB) is a reliable benchmark in quantitative MRS?

CO12. **2^{ème} Journée Grand-Sud de RMN, June 2018**, Toulouse (France)

G. Pagès

Invited speaker

CEST-MRI to reveal new contrasts: application in preclinical imaging and food science

CO11. **1^{ère} Journée Grand-Sud de RMN, May 2016**, Montpellier (France)

G. Pagès, V. Gilard, R. Martino, M. Malet-Martino

Low- and high-field NMR spectrometry: complementarity in the struggle against counterfeiting

CO10. **COST meeting, July 2012**, Dublin (Ireland)

Presentation during the workgroup on data acquisition

G. Pagès, M. Puckeridge, P. W. Kuchel

Simultaneous estimation of T₁ and the flip angle in hyperpolarized NMR experiments using acquisition at non-regular time intervals

CO9. **Festschrift symposium for Professor Philip Kuchel, September 2011**, Sydney (Australia)

Invited speaker

G. Pagès, P. W. Kuchel, P. Lee, Y. L. Tan

Hyperpolarized ¹³C NMR

- CO8. **European Magnetic Resonance Meeting (EUROMAR), July 2009**, Göteborg (Sweden)
G. Pagès, T. J. Larkin, D. Szekely, A. M. Torres, P. W. Kuchel
Fast q-space acquisition to monitor red blood cell shape evolution
- CO7. **European Magnetic Resonance Meeting (EUROMAR), July 2006**, York (England)
G. Pagès, C. Delaurent, S. Caldarelli
PFG NMR with a chromatographic phase: first steps towards understanding the chromatographic process
1st “Magnetic Resonance in Chemistry” prize (1500 €) attributed by the publisher’s John Wiley & Sons, Ltd
- CO6. **Journée de la Fédération et de l’Ecole Doctorale des Sciences Chimiques de Marseille, May 2006**, Marseille (France)
G. Pagès, C. Delaurent, S. Caldarelli
La RMN pour appréhender les interactions chromatographiques
- CO5. **Forum Labo, March 2006**, Paris (France)
G. Pagès, C. Delaurent, M. Sergent, R. Phan Tan Luu, J.-M. Roussel
Optimization and validation of the St John’s Wort naphthodianthrones determination by liquid chromatography
- CO4. **Forum Labo, March 2006**, Paris (France)
C. Delaurent, **G. Pagès**
Void volume and band broadening determination in reversed phase liquid chromatography
- CO3. **30 years of chemometric, June 2005**, Aix-en-Provence (France)
G. Pagès, C. Delaurent, M. Sergent, R. Phan Tan Luu
Assay of naphthodianthrones in St John’s Wort dry extract: a chemometric approach
- CO2. **French magnetic resonance society meeting (GERM), April 2005**, Carry le Rouet (France)
G. Pagès, C. Delaurent, S. Caldarelli
NMR to a comprehension of chromatographic phenomenon
- CO1. **French and Italian days of chemistry, April 2004**, Genova (Italy)
G. Pagès, C. Delaurent, S. Caldarelli
DOSY and HRMAS for “NMR chromatography”

1.10.4. SÉMINAIRES

- S5. **Groupe de recherche HyperMag**, Technical University of Denmark, **May 2019**, Copenhagen (Danemark)
G. Pagès
What do we do @ AgroResonance ?
- S4. **Groupe de RMN Biomédicale**, UMR 5068, Université Paul Sabatier & CNRS, **July 2012**, Toulouse (France)
G. Pagès
La RMN diffusionnelle dans les milieux complexes : un peu plus que des mesures de diffusion

- S3. **Singapore BioImaging Consortium, A*STAR, September 2011**, Singapore
G. Pagès, P. W. Kuchel; P. Lee, Y. L. Tan
Urea reactions in erythrocytes by hyperpolarized ^{13}C NMR
- S2. **Centre for Nutrition and Food Science, The University of Queensland, November 2007**, Brisbane (Australia)
G. Pagès
An introduction to PFG-NMR
- S1. **Victor Chang Cardiac Research Institute, March 2007**, Sydney (Australia)
G. Pagès
Task-2 NMR studies

1.10.5. COMMUNICATIONS PAR POSTERS

Sur les 44 posters ci-dessous, j'en ai présenté 15.

- CP44. **French magnetic resonance society meeting (GERM), May 2019**, Oléron (France)
N. El Sabbagh, J.-M. Bonny, C. Chassain, F. Durif, H. Ratiney, **G. Pagès**
Imagerie métabolique rapide en ^{13}C
- CP43. **Forum de la recherche en cancérologie Auvergne-Rhône-Alpes, April 2019**, Lyon (France)
E. Maubert, **R. Autissier**, A. Voissière, Y. Gerard, S. Schmitt, P. Auzeloux, F. Degoul, C. Peyrode, V. Weber, J.-M. Bonny, **G. Pagès**, L. Mazuel, E. Miot-Noirault
Développement et caractérisation de modèles d'études précliniques de chondrosarcome
- CP42. **4^{ème} congrès de la société française de résonance magnétique en biologie & médecine (SFRMBM), March 2019**, Strasbourg (France)
R. Autissier, E. Maubert, S. Schmitt, P. Auzeloux, C. Peyrode, F. Degoul, A. Traoré, J.-M. Bonny, E. Miot-Noirault, L. Mazuel, **G. Pagès**
Intérêt de l'imagerie IRM-CEST in vivo pour l'étude du microenvironnement tumoral du chondrosarcome
Prix du meilleur poster dans la catégorie applications
- CP41. **14th International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science (ICAMRFS), September 2018**, Rennes (France)
C. Assaf, **G. Pagès**, J.-M. Bonny
Can CEST contrast image gluten network?
- CP40. **European Magnetic Resonance Meeting (EUROMAR), July 2018**, Nantes (France)
G. Pagès, A. Traoré, J.-M. Bonny
A new approach to interpret non-negative-least squares (NNLS) relaxation results
- CP39. **Annual meeting of the international society for magnetic resonance in medicine (ISMRM), June 2018**, Paris (France)
C. Chassain, C. Melon, **G. Pagès**, Y. Le Fur, P. Salin, L. Kerkerian-Le Goff, F. Durif
Longitudinal follow-up of brain metabolism in rat models of progressive Parkinson's disease using Magnetic Resonance Spectroscopy Imaging

- CP38. **Annual meeting of the international society for magnetic resonance in medicine (ISMRM), June 2018**, Paris (France)
N. Moutal, D. Grebenkov, S. Clerjon, **G. Pagès**, J.-M. Bonny
Diffusion MRI in muscles at high b-values: towards a quantification of microscopic organelles
- CP37. **Annual meeting of the international society for magnetic resonance in medicine (ISMRM), June 2018**, Paris (France)
A. S. Traore, T. Leger, **G. Pagès**, L. Cassagnes, A. Kasra, J.-M. Bonny, L. Demaison
Cardiac MRI assessment of the effects of dietary Eicosapentaenoic acid (EPA) on the adverse cardiac consequences of sepsis in rat
- CP36. **Annual meeting of the international society for magnetic resonance in medicine (ISMRM), June 2018**, Paris (France)
L. Mazuel, A. Voissière, V. Weber-Haddad, G. Yvain, S. Besse, J.-M. Bonny, E. Miot-Noirault, C. Peyrode, **G. Pagès**
CEST MRI to contrast chondrosarcoma tumors: two contrasts in one acquisition
- CP35. **13th European Molecular Imaging Meeting (EMIM), March 2018**, San Sebastián (Spain)
L. Mazuel, R. Autissier, E. Maubert, A. Voissière, V. Weber-Haddad, G. Yvain, S. Besse, J.-M. Bonny, E. Miot-Noirault, C. Peyrode, **G. Pagès**
CEST MRI to contrast chondrosarcoma tumors: two contrasts in one acquisition
- CP34. **34th Annual Scientific meeting of the European Society of Magnetic Resonance Molecules in Biology meeting (ESMRMB), October 2017**, Barcelona (Spain)
J.-M. Bonny, **G. Pagès**
Uncertainty on the Cramér-Rao bound: What are the consequences in quantitative NMR?
- CP33. **French magnetic resonance society meeting (GERM), May 2017**, Aussois (France)
G. Pagès, A. Traoré, J.-M. Bonny
A pragmatic interpretation of multiexponential inversions obtained by non negative least squares
- CP32. **French magnetic resonance society meeting (GERM), May 2017**, Aussois (France)
G. Pagès, J.-M. Bonny
Uncertainties on the Cramér-Rao bound: What are the consequences in quantitative NMR?
- CP31. **XIII International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science (ICAMRFS), June 2016**, Karlsruhe (Germany)
G. Pagès, A. Morisse, P. Gatellier, E. Martineau, P. Giraudeau, J.-M. Bonny
Quantitative in situ NMR to characterize protein oxidation and its dynamics
- CP30. **61st International Congress of Meat Science & Technology (ICOMST), August 2015**, Clermont-Ferrand (France)
A. Duconseille, **G. Pagès**, M. Traikia, M. Lagree, C. Jousse, N. Quintana, T. Astruc, V. Santé-Lhoutellier
Effect of the exposure of gelatin to various environmental conditions on its chemical composition

- CP29. **9ème Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique, June 2015**, Lille (France)
A. Duconseille, **G. Pagès**, M. Traikia, M. Lagree, C. Jousse, N. Quintana, T. Astruc, V. Santé-Lhoutellier
Effect of the exposure of gelatin to various environmental conditions on its chemical composition
- CP28. **French magnetic resonance society meeting (GERM), May 2015**, Sète (France)
G. Pagès, A. Morisse, P. Gatellier, E. Martineau, P. Giraudeau, J.-M. Bonny
Suivi de l'oxydation des acides gras et des protéines par RMN quantitative pour une meilleure maîtrise des qualités sensorielles et nutritionnelles des aliments
- CP27. **Joint Pharmaceutical Analysis Group of the Royal Society of Chemistry, March 2015**, London (England)
A. Gerdova, **G. Pagès**, D. Williamson, V. Gilard, R. Martino, M. Malet-Martino
Low-field ^1H NMR spectrometer for the analysis of dietary supplements adulterated with pharmaceutical substances
- CP26. **European Magnetic Resonance Meeting (EUROMAR), July 2012**, Dublin (Ireland)
G. Pagès, M. Puckeridge, P. W. Kuchel
How to simultaneously estimate T_1 and the flip angle for hyperpolarized spins
- CP25. **20th Annual meeting of the international society for magnetic resonance in medicine (ISMRM), May 2012**, Melbourne (Victoria, Australia)
G. Pagès, Y. L. Tan, P. W. Kuchel
Rapid transmembrane exchange of hyperpolarized ^{13}C -urea: pathology-methods development using erythrocytes
- CP24. **A*STAR Chemistry Symposium, November 2011**, Singapore (Singapore)
G. Pagès, Y. L. Tan, P. W. Kuchel
NMR: not only a tool to elucidate chemical structure!
- CP23. **19th Annual meeting of the international society for magnetic resonance in medicine (ISMRM), May 2011**, Montréal (Canada)
N. Agarwal, L. D'Silva, **G. Pagès**, P. W. Kuchel, S. S. Velan
Foot orientation alters residual dipolar coupling in ^1H MRS of creatine and phosphocreatine in skeletal muscle of rats
- CP22. **Diffusion Fundamentals III, August 2009**, Athens (Greece)
T. J. Larkin, **G. Pagès**, A. M. Torres, P. W. Kuchel
Rapid-acquisition NMR diffusion-diffraction q -space plots from erythrocytes with varying gradient orientation
- CP21. **European Magnetic Resonance Meeting (EUROMAR), July 2009**, Göteborg (Sweden)
T. J. Larkin, **G. Pagès**, A. M. Torres, P. W. Kuchel
Rapid acquisition of diffusion-diffraction q -space spectra from red blood cells: simulations and new applications

- CP20. **Australian and New-Zealand magnetic resonance society meeting (ANZMAG), December 2008**, Couran Cove Island (Queensland, Australia)
G. Pagès, D. Szekely, P. W. Kuchel
Fast-measurement NMR diffusion-diffraction to investigate erythrocyte-shape evolution
- CP19. **Australian Society of biophysics Conference (ASB), October 2008**, Canberra (ACT, Australia)
T. W. Yau, D. Szekely, **G. Pagès**, C. Garvey, P. W. Kuchel
Engineering red blood cells with membrane active toxins
- CP18. **49th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference (ENC), March 2008**, Pacific Grove (California, U.S.A.)
S. Viel, F. Ziarelli, C. Carrara, **G. Pagès**, R. Bouchet, R. Denoyel, S. Caldarelli
Pulsed field gradient magic angle spinning self-diffusion investigations in homogeneous and heterogeneous media
- CP17. **49th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference (ENC), March 2008**, Pacific Grove (California, U.S.A.)
S. Caldarelli, C. Carrara, C. Delaurent, **G. Excoffier**, **G. Pagès**, S. Viel, F. Ziarelli
Decrypting and advancing Chromatographic NMR
- CP16. **Australian Society of biophysics Conference (ASB), December 2007**, Newcastle (NSW, Australia)
A. Dona, P. Castignolles, R. G. Gilbert, M. Gaborieau, **G. Pagès**, P. W. Kuchel
Monitoring process kinetics of starch by NMR spectroscopy
Student poster prize
- CP15. **Diffusion Fundamentals II, August 2007**, L'aquila (Italy)
G. Pagès, P. W. Kuchel
Red blood cell shape evolution probed by fast-diffusion nuclear magnetic resonance measurements
- CP14. **Diffusion Fundamentals II, August 2007**, L'aquila (Italy)
S. Viel, **G. Excoffier**, **G. Pagès**, F. Ziarelli, C. Delaurent, S. Caldarelli
Combined use of pulsed field gradient spin echo and high resolution magic angle spinning to investigate solutes diffusion in presence of a chromatographic stationary phase
- CP13. **Chemometric 2005, December 2005**, Villeneuve d'Ascq (France)
G. Pagès, C. Delaurent, M. Sergent, R. Phan Tan Luu
Assay of naphthodianthrones in St John's Wort dry extract: a chemometric approach
3rd Poster Prize
- CP12. **4th Alpine Conference on Solid-State NMR, September 2005**, Chamonix (France)
G. Pagès, C. Delaurent, S. Caldarelli
An investigation of the chromatographic process by HRMAS and PFG NMR

- CP11. **1^{er} Symposium de Chimie et Biochimie Analytiques, September 2005**, Montpellier (France)
C. Delaurent, **G. Pagès**, **G. Excoffier**
Détermination de l'influence des conditions expérimentales sur la mesure des volumes morts en chromatographie liquide de partage à polarité de phase inversée selon une approche chimiométrique
- CP10. **1^{er} Symposium de Chimie et Biochimie Analytiques, September 2005**, Montpellier (France)
C. Delaurent, **G. Pagès**, **M. Adam-Beret**, S. Caldarelli
DOSY and HRMAS for NMR Chromatography
- CP9. **25th International Symposium on Chromatography, October 2004**, Paris (France)
G. Pagès, C. Delaurent, S. Caldarelli
DOSY and HRMAS for "NMR chromatography"
- CP8. **25th International Symposium on Chromatography, October 2004**, Paris (France)
G. Pagès, C. Delaurent, M. Sergent, R. Phan Tan Lu, A.-M. Siouffi
Determination of naphthodianthrone in St. John's Wort: a chemometric approach for the sample preparation
- CP7. **25th International Symposium on Chromatography, October 2004**, Paris (France)
C. Delaurent, **G. Pagès**, A.-M. Siouffi, C. Simmons, J.-G. Dorsey
Determination of void volumes in reversed-phase liquid chromatography
- CP6. **VIIIth NMR Rhône-Alpes' day, July 2004**, Lyon (France)
G. Pagès, C. Delaurent, S. Caldarelli
The use of DOSY to understand chromatographic interactions
- CP5. **27th Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2003), June 2003**, Nice (France)
F. Steiner, C. Delaurent, **G. Pagès**, A.-M. Siouffi
Improvement of selectivity based upon liquid crystals in liquid chromatography
- CP4. **SEP Meeting, May 2003**, Lyon (France)
C. Delaurent, **G. Pagès**, A.-M. Siouffi
Les phases stationnaires de type cholestérique en chromatographie liquide haute performance
- CP3. **HPLC Symposium, June 2002**, Montréal (Canada)
C. Brenier-Maurel, **G. Pagès**, C. Delaurent, M.-C. Guilhem, A.-M. Siouffi
Optimisation of flavanoids retention on monolithic support under reversed phase conditions in HPLC using chemometric approach
- CP2. **HPLC Symposium, June 2002**, Montréal (Canada)
C. Delaurent, C. Brenier-Maurel, **G. Pagès**, A.-M. Siouffi
How liquid crystals improve selectivity in liquid chromatography under reversed phase conditions using chemometric approach
- CP1. **Pittsburgh Conference, March 2002**, New Orleans (Louisiana, U.S.A.)
C. Brenier-Maurel, **G. Pagès**, C. Delaurent, A.-M. Siouffi
Optimisation of St John's wort flavanoids separation on monolithic support under reversed phase conditions in high performance liquid chromatography

2. ACTIVITES DE RECHERCHE

2.1. INTRODUCTION

Après mon diplôme d'ingénieur en 2002, je n'ai pu, faute de communication, postuler à l'obtention d'un financement de thèse. J'ai donc travaillé un an avant de retenter ma chance avec succès l'année suivante. Ma bourse doctorale était un cofinancement entre la région Provence-Alpes-Côte d'Azur et une PME locale DistriB3. Le projet scientifique comportait deux volets, un premier destiné à mettre au point une méthode d'analyse par chromatographie des naphthodiantrones dans le millepertuis et un second consacré au développement d'une nouvelle méthode analytique combinant RMN et chromatographie (paragraphe 2.2.1). Mon manuscrit de thèse s'était focalisé uniquement sur la seconde partie mais des publications ont été également réalisées sur le premier sujet (par exemple **P1** ou **P4**). Par la suite, je me suis spécialisé en RMN, abandonnant l'aspect chromatographique au gré du travail sur les différents sujets de recherche pour lesquels j'étais employé.

Mes thématiques de recherche, jusqu'à ma prise de fonction à l'INRA à l'automne 2014, ont concernées la mise au point et l'utilisation de la RMN pour caractériser des systèmes complexes et mesurer des constantes bio- ou physicochimiques.

La RMN est une technique analytique reconnue pour son pouvoir de caractérisation et d'identification structurale de molécules, en général relativement pure. C'est l'utilisation principale qui en est faite par, en particulier, les chimistes organiciens ou les biochimistes étudiants des protéines à l'état liquide ou solide. Je n'ai fait que très peu de cette utilisation « classique » de la RMN. A l'inverse, je me suis principalement intéressé à l'utilisation de la RMN pour étudier des dynamiques que ce soit en utilisant des mesures basées sur la mobilité des molécules ou en réalisant des suivis cinétiques et en analysant l'évolution des signaux RMN au cours du temps. La RMN présente ceci de fascinant qu'en fonction de la manière dont l'expérimentateur « joue » avec les spins, des informations différentes et variées peuvent être obtenues. L'exemple le plus connu et le plus utilisé concerne les applications faites de la RMN dans le domaine médical, c'est à dire avec l'IRM. Ainsi, en fonction des délais utilisés, principalement le temps d'écho et le temps de répétition, des contrastes différents dans l'image vont être observés pour un même sujet. De la même manière, en RMN de diffusion, il sera possible d'étudier le mouvement libre ou restreint, de caractériser des échanges entre deux états chimiques ou physiques.

En analysant l'ensemble de mes travaux, j'ai réalisé l'importance de mon expertise en RMN de diffusion. En effet, tous mes postes ont été obtenus grâce à mes compétences dans cette thématique. C'est suite à mes travaux de thèse en RMN que Philip Kuchel m'a recruté (et vu mon niveau d'anglais en 2006, il devait vraiment croire en moi !). Travaillant sur des thématiques proches, István Furó (et Peter Stilbs) connaissait mes travaux avant de me recruter. Finalement, mon retour en France s'est opéré grâce à Myriam Malet-Martino qui était intéressée par mes compétences en RMN de diffusion. Une large part dans ce chapitre de bilan sera donc donnée à ces travaux, en mettant l'accent sur mes contributions pour améliorer la séparation virtuelle des molécules au sein d'un mélange (section 2.2).

Evidemment, mes différents contrats n'étaient pas basés sur la méthodologie RMN à utiliser mais plutôt sur l'utilisation de la RMN pour répondre à des questions scientifiques. Par exemple, à Stockholm, je devais travailler sur l'analyse du bois par RMN tandis qu'à Toulouse sur l'analyse de la formulation de médicaments. Ceci m'a incité à initier des collaborations avec l'équipe de M. Johansson lors de mon séjour à Stockholm, avec l'équipe de R. Gilbert à Brisbane ou avec des scientifiques de l'institut de chimie à Singapour. Ceci m'a également permis de travailler sur d'autres méthodes que celle de diffusion. J'ai ainsi développé des

méthodes analytiques spécifiques aux problématiques rencontrées. La plupart de ces travaux pourrait être regroupé sous une thématique générale qui pourrait être intitulée « comment voir l'invisible ». Cependant, j'ai choisi une approche plus détaillée pour m'intéresser (1) à la quantification du glucose lorsque celui-ci n'est pas soit détectable soit quantifiable par RMN simple (2.3) et (2) à la détermination des constantes cinétiques lors des expériences d'hyperpolarisation (2.4).

Cette section est donc une vue d'ensemble des travaux de recherche effectués jusqu'à mon entrée à l'INRA en octobre 2014. Le travail réalisé depuis ma prise de fonction a conduit à la mise en place de mon projet de recherche qui sera décrit dans la section 3.

2.2. OPTIMISATION DE LA MESURE DU COEFFICIENT DE DIFFUSION PAR RMN

Dès l'introduction de l'écho de spin par Hahn, il a été réalisé que le coefficient d'auto-diffusion (mouvement brownien) jouait un rôle dans l'atténuation du signal en présence d'un champ magnétique inhomogène [2]. Très rapidement, il a été proposé par Stejskal et Tanner [3] de mesurer le mouvement des molécules en codant puis, après un intervalle de temps bien défini, en décodant la position spatiale des spins grâce à des gradients de champ magnétique pulsés (abrégé par la suite par la version anglaise PFG pour '*pulsed field gradient*'). Ces mesures permettent de déterminer le coefficient de diffusion des molécules en solution (**P7**, **P36**) mais également, à partir de modèles plus spécifiques, de mesurer des vitesses [4; 5], de caractériser des systèmes présentant une restriction du mouvement (**C3**, **C1**, **P23**), des échanges chimiques (**P19** & **P28**) ou, dans son approche en imagerie, de déterminer les voies neuronales dans le cerveau de patients (tractographie réalisée par des mesures de tenseur de diffusion) [6].

Avant de continuer plus en détail sur les mesures de diffusion par RMN, il me paraît important de faire une précision sur les définitions. En effet, le coefficient d'auto-diffusion ('*self diffusion*' en anglais) est défini par l'IUPAC comme le coefficient de diffusion d'une espèce i en absence de potentiel chimique [7]. Il s'agit donc du mouvement brownien qui existe dans une solution pure de i , en absence de convection thermique ou de diffusion de concentration (appelée également diffusion mutuelle). En RMN, la plupart du temps, les coefficients de diffusion reportés le sont dans des solutions complexes (pouvant être des mélanges chimiques ou des matrices structurées *in vivo*, par exemple) ne répondant donc pas à la définition précédente. C'est pourquoi, dans la suite de ce mémoire, il est plus correct de parler de coefficient de diffusion apparent (ADC, '*apparent diffusion coefficient*'). Lorsque des termes relatifs aux coefficients de diffusion seront utilisés, ils renverront donc systématiquement à la notion d'ADC. J'ai appris, à mes dépens, lors du GERM à Carry-le-Rouet (**CO2**) qu'il fallait toujours être extrêmement précis en science avec les termes utilisés comme me l'avais fait remarqué, à juste titre, Armel Guillermo (CEA à Grenoble) à propos de cette notion d'ADC.

La Figure 1 illustre la séquence basique pour déterminer un coefficient de diffusion à partir d'une séquence d'écho de spin. Après excitation des spins par une impulsion radiofréquence (RF) à 90° , une première impulsion de gradients constante est appliquée entraînant un déphasage des spins dépendant de leur position spatiale. Ce déphasage est d'autant plus important que l'aire des gradients est importante. Après un temps de diffusion Δ , une impulsion de gradients, ayant un effet opposé à la première (ici, même signe car les spins ont été inversées par l'impulsion à 180°) est appliquée. Si les molécules ne se sont pas déplacées, la refocalisation des spins sera totale et aucune perte de signal ne sera observée. Par contre, si au cours du temps de diffusion Δ , les molécules se sont déplacées à l'intérieur de l'échantillon, la seconde

impulsion de gradients aura un effet de rephasage différent de la première sur les spins et ne permettra pas une refocalisation totale. En quantifiant cette perte de signal, il est possible de remonter au coefficient de diffusion D à partir de l'équation :

$$I(g) = I_0 \exp^{-(\gamma g \delta)^2 \Delta' D} \quad (1)$$

avec $I(g)$ l'intensité du signal pour un gradient d'intensité g , I_0 l'intensité du signal en absence de gradient, γ le rapport gyromagnétique, δ la durée de l'impulsion du gradient et Δ' un temps de diffusion corrigé pour prendre en compte notamment la forme des gradients et la durée finie des impulsions. Dans la publication **P22**, nous avons repris et détaillé la démonstration complète de la formule de Stejskal et Tanner (Equation 1).

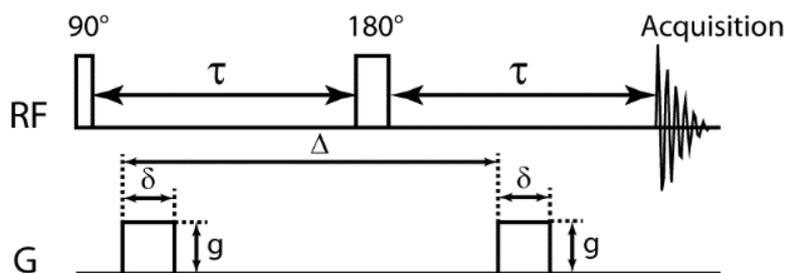


Figure 1 : Première séquence d'impulsions proposée pour mesurer les coefficients de diffusion. Les lignes RF et G représentent respectivement les impulsions radiofréquences et celles de gradients de champ magnétique. La séquence RF est un écho de spin classique (90- τ -180- τ -Acquisition). Les deux impulsions de gradients sont de même aire ($g\delta$) mais leur effet sur les spins est inversé grâce à l'impulsion RF à 180°. Les molécules diffusent pendant le temps Δ . Figure adaptée de **P39**.

A partir de l'équation 1, il est évident qu'en enregistrant le signal en fonction soit d'un paramètre lié aux PFG soit du temps de diffusion Δ , il sera possible de mesurer l'ADC. En pratique, il est plus commun de faire varier l'intensité des gradients g (Figure 2A) pour garder constant les effets de la relaxation T_2 sur le signal (qui n'apparaissent pas dans l'équation 1 car cette équation est exprimée pour ce cas précis). Le suivi de l'intensité d'un signal en fonction des paramètres expérimentaux permet de remonter à l'ADC (Figure 2B). Pour exploiter au mieux l'ensemble des informations disponibles, il est plus intéressant de tracer le spectre de toutes les résonances diffusant avec le même ADC car celles-ci appartiendront (idéalement) à la même molécule. Une avancée importante a été réalisée lorsque Morris et Johnson ont proposé de représenter les données sous la forme d'une carte à deux dimensions avec dans l'une les déplacements chimiques et dans l'autre les ADC ; c'est la fameuse '*diffusion ordered spectroscopy*' (DOSY ; Figure 2C) [8]. Il est à noter que, contrairement à l'usage courant qui est de dire '*j'ai fait une expérience DOSY*', l'acquisition des données est réalisée par une expérience de type PFG tandis que l'analyse de celles-ci se fait par un traitement DOSY (par exemple).

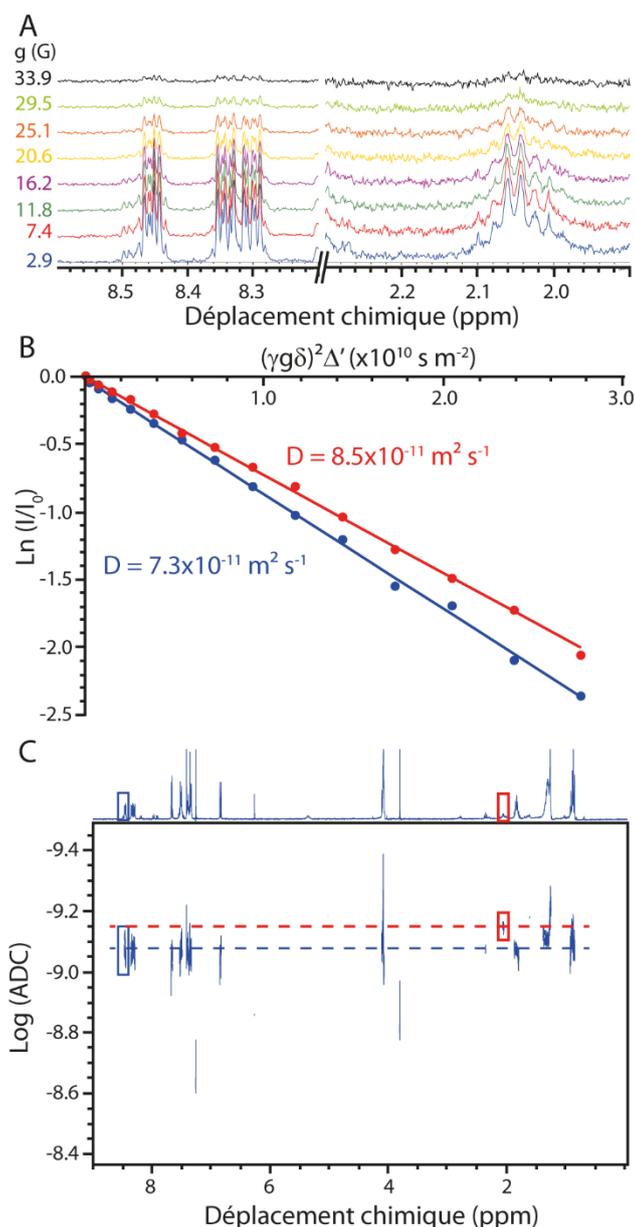


Figure 2 : Illustration du déroulé d'une expérience de RMN de diffusion sur un échantillon d'herbe de cannabis dissout dans du CDCl_3 enregistré sur un spectromètre RMN ayant une fréquence de Larmor de 400 MHz pour le ^1H . (A) Des spectres sont enregistrés avec différentes intensités de gradients g . (B) L'intensité du signal RMN en fonction des paramètres expérimentaux permet de remonter à l'ADC (pour une identification des signaux tracés en rouge et bleu, voir la projection sur spectre dans la partie C). (C) Une analyse de l'ensemble du spectre permet d'isoler le spectre RMN de chacun des composés du mélange (ici, traitement des données de type DOSY). Figure adaptée de **P39**.

Evidemment, au cours des années, des améliorations ont été apportées à cette méthode. Nous pouvons séparer ces améliorations selon trois axes principaux : (1) les séquences d'impulsions, (2) l'équipement permettant de générer les gradients et (3) le traitement des données. Concernant les séquences d'impulsion, très rapidement une séquence basée sur un écho stimulé a été proposée [9]. La relaxation principale dans ce type de séquence est basée sur le temps de relaxation longitudinal T_1 , plus long que le temps de relaxation transversal T_2 , permettant ainsi d'augmenter le temps de diffusion Δ . A partir de ces deux schémas clés des séquences impulsionnelles en RMN, toute une série a été construite pour notamment supprimer le signal du solvant [10-13], limiter les courants de Foucault [14; 15], éliminer les effets de convection [11; 16-19], utiliser un filtre multi-quanta [20; 21] ou diminuer le temps d'acquisition en

utilisant une approche rapide ([22-24] ou **C2**), ... La démocratisation des séquences PFG s'est effectuée avec le développement du matériel et lorsque la génération des gradients a été rendue simple, efficace et robuste sur les spectromètres RMN. Les bobines de gradients ont été blindées pour limiter les courants de Foucault, la génération de forme précise a été rendue plus facile à partir de préemphasis électronique, ... Une revue récente de Stilbs [25] rappelle la difficulté de réaliser ces expériences jusqu'au milieu des années 90. Enfin, l'analyse de l'équation 1 montre que les données doivent être analysées par une transformée inverse de Laplace, c'est-à-dire que le signal doit être décomposé sur une base d'exponentielles continues, problème mathématique mal posé (plusieurs solutions de qualité identique peuvent être obtenues à partir d'un même jeu de données). Dans une revue de référence [26], Istratov et Vyvenko analysent les problèmes mathématiques liés aux analyses multi-exponentielles. Pour améliorer la robustesse et la sensibilité de l'analyse des données brutes, une multitude d'algorithmes ont été proposés. Outre l'analyse classique de type Levenberg Marquart (implémentée sous les logiciels de Bruker) [27] plusieurs stratégies ont été proposées. L'analyse CORE fut une des toutes premières [28] puis fut suivie de plusieurs approches dérivées [29]. D'autres programmes utilisent des approches de 'regularized resolvent transform' [30], séparation aveugle de sources (blind source separation) [31], maximum entropy [32] ou DECRA [33]. Chaque algorithme présente ces propres avantages et inconvénients. Nilsson a proposé un logiciel [34] permettant d'utiliser un nombre important de ces algorithmes et donc, de pouvoir facilement les comparer.

Avec la démocratisation des expériences PFG, les applications se sont multipliées et d'excellentes revues de littérature ont été écrites à ce sujet. Personnellement, je recommanderais les revues suivantes [35-40] ainsi que ces deux livres [41; 42]. Par ailleurs, j'ai récemment co-écrit une revue sur la RMN de diffusion et les applications possibles lorsque les données sont analysées sous la forme d'une carte à deux dimensions de type DOSY (**P39**).

Cependant, malgré tous ces développements, la sensibilité des mesures de diffusion est toujours limitée. Ainsi, pour pouvoir séparer efficacement des mélanges, il est nécessaire que les coefficients de diffusion soient différents de quelques dizaines de pourcent (ce chiffre est très discuté mais je considère ici un mélange complexe 'réel' tel que les médicaments). Au cours de mes différentes expériences de recherche, j'ai développé des approches permettant d'améliorer les mesures du coefficient de diffusion. Les sections suivantes décrivent ces travaux avec notamment (1) l'amélioration des qualités de séparation par un ralentissement sélectif des molécules grâce à l'ajout d'une phase chromatographique, (2) un échantillonnage optimisé des PFG et (3) la première étude de diffusion restreinte avec une séquence de diffusion rapide.

2.2.1. LA « RMN CHROMATOGRAPHIQUE »

Pour pouvoir obtenir une bonne séparation virtuelle (qui peut s'entendre comme une analyse DOSY ou tout autre traitement permettant d'obtenir le spectre RMN 1D de la molécule « pure ») des différents composés d'un mélange, il est nécessaire que la différence de mobilité entre les molécules soit importante, de l'ordre de 30 à 50% au minimum [43; 44]. En fonction des mélanges étudiés, ceci n'est pas forcément le cas et la RMN n'est donc plus une méthode analytique de choix. Une solution possible revient à séparer en amont de l'analyse RMN le mélange par une technique chromatographique puis à analyser les différentes fractions par RMN. La chromatographie liquide est ainsi couplée avec une détection (notamment) par RMN. La « RMN Chromatographique » consiste à réaliser ces deux étapes lors d'une seule et même analyse : la phase chromatographique stationnaire est introduite dans le « tube » RMN contenant le liquide à analyser pour ralentir sélectivement les molécules du mélange et ainsi obtenir une séparation des différents composés grâce à leur ADC. D'un point de vue RMN,

l'ajout d'une phase solide dans l'échantillon entraîne des complications avec la présence d'interactions dipolaires et d'anisotropies, principalement, de déplacements chimiques et de susceptibilité magnétique. Pour moyenniser à zéro ces différents effets, et donc retrouver un spectre RMN avec une résolution proche de celle du liquide, il faut faire tourner cet échantillon à l'angle magique (à vitesse modérée car celui-ci peut être considéré comme un solide mou) de $54,7^\circ$ (MAS, 'magic angle spinning'). Ce type de spectroscopie, donnant des spectres semblables à ceux obtenus en RMN du liquide, c'est-à-dire avec une haute résolution, est appelée RMN haute-résolution à l'angle magique (HRMAS, 'high-resolution magic angle spinning'). Pour pouvoir faire tourner l'échantillon dans ces conditions, un rotor en zirconium contient le mélange et est fermé avec un bouchon contenant des ailettes permettant la rotation grâce à un flux d'air (Figure 3).

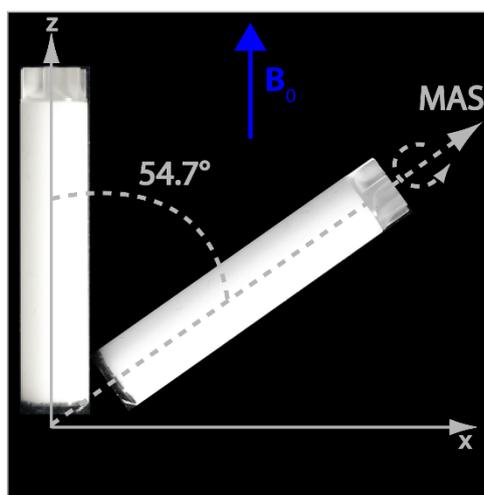


Figure 3 : Représentation d'un rotor RMN aligné le long du champ magnétique B_0 puis basculé et mis en rotation à l'angle magique. Figure adaptée de ma thèse.

L'échantillon n'étant plus aligné le long du champ magnétique principal, il est indispensable d'appliquer les PFG avec le même angle que celui de rotation pour mesurer l'ADC le long de l'axe de rotation du rotor. Sur les sondes HRMAS actuelle, la bobine de gradients est fixée sur le stator, pivotant ainsi avec l'échantillon. L'avantage de cette solution technologique réside dans l'alignement permanent des gradients avec l'échantillon, même en cas de mauvais réglage du MAS.

La preuve de concept de la « RMN Chromatographique » a été réalisée par Viel et al. [45] un peu avant mon arrivée au laboratoire. La Figure 4 illustre les performances de la « RMN Chromatographique » sur un mélange test utilisé en chromatographie liquide haute performance (CLHP) pour caractériser l'hydrophobie de la phase stationnaire (mélange de benzène, naphthalène et anthracène). Les molécules aromatiques polycycliques sont dissoutes dans l'acétonitrile. En absence de phase chromatographique, il est impossible de séparer ces trois molécules par leur coefficient de diffusion (Figure 4A) tandis qu'après avoir ajouté une phase chromatographique octadécylsilylé (ODS, greffage de la chaîne de silice avec une chaîne carbonnée contenant 18 carbones $-C_{18}$), la séparation est évidente avec un ordre de grandeur de différence entre les ADC de chacune des molécules (Figure 4B). La phase chromatographique ralentit significativement la mobilité de l'anthracène, un peu moins celle du naphthalène et quasiment pas celle du benzène. Nous pouvons également noter que le solvant, qui est une petite molécule, a un coefficient de diffusion rapide et qu'il est également possible d'observer la mobilité des greffons C_{18} fixé sur la silice. Je souhaite souligner qu'en présence de phase

chromatographique, il est indispensable de réaliser trois mesures de diffusion pour optimiser les paramètres expérimentaux pour chacune des molécules. Le développement qui sera abordé au chapitre 2.2.2 serait une solution pour pouvoir mesurer simultanément, et avec une bonne précision, les différents coefficients de diffusion.

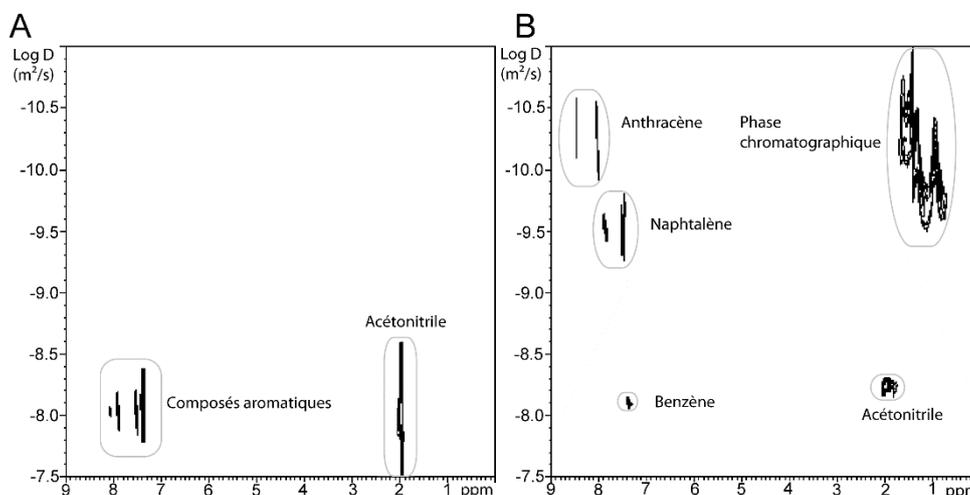


Figure 4 : Cartes DOSY d'un mélange de benzène, naphthalène et anthracène dissout dans de l'acétonitrile enregistré (A) sans et (B) avec une phase chromatographique ODS. Les échelles de diffusion sont en unité logarithmique ; les coefficients de diffusion les plus rapides sont donc en bas de la carte 2D. Figure adaptée de P3.

Mon travail de thèse a consisté à développer la méthode et à comparer les performances avec celles de la CLHP.

En CLHP, l'expérimentateur doit jouer sur deux facteurs pour optimiser la séparation de son mélange. Tout d'abord, il doit choisir la phase stationnaire (ou phase chromatographique). Les supports chromatographiques peuvent ainsi être vierges (silices) ou greffés. Le greffage peut être réalisé avec une chaîne carbonée d'une longueur bien définie (C₈, C₁₈,...) ou avec une molécule chirale ou encore avec des molécules très spécifiques (cholestérol). Enfin, le support peut-être post-greffé ('*endcapped*'), c'est-à-dire sans silanols résiduels. Le diamètre des pores dans le support est également important. Ensuite, il doit définir la composition de la phase mobile (ou éluant) ainsi que son évolution au cours du temps. L'expérimentateur peut choisir d'introduire plus ou moins d'eau pour favoriser différents mécanismes de rétention. Il est donc important de bien connaître ces différentes propriétés. Pour caractériser les phases chromatographiques, des tests dans des conditions normées ont été développés pouvant être soit fondés sur un modèle soit descriptif (ou empirique). Il est aussi possible d'utiliser une série homologue, des molécules ne se différenciant que par le nombre de répétition d'un motif, pour évaluer les capacités sélectives du support. Ce sont ces dernières que j'ai utilisées pour comparer la « RMN Chromatographique » et la CLHP en utilisant deux séries homologues : une série aromatique (voir ci-dessus) et une série contenant des cétones (propanone, butanone et pentan-2-one). Ces deux séries homologues ont été choisies car la différence dans leur propriété de rétention en chromatographie est importante. La Figure 5 représente les cartes DOSY obtenues sur la série homologue des cétones avec ou sans phase chromatographique ODS. L'ajout de la phase stationnaire permet de séparer par leur coefficient de diffusion les différentes cétones. Les conditions expérimentales des Figure 4 et Figure 5 étant comparables, nous remarquons que le pouvoir de ralentissement engendré par la phase chromatographique est beaucoup plus faible pour la série des cétones que pour celle des aromatiques. Cette observation corrèle avec la sélectivité observée en CLHP.

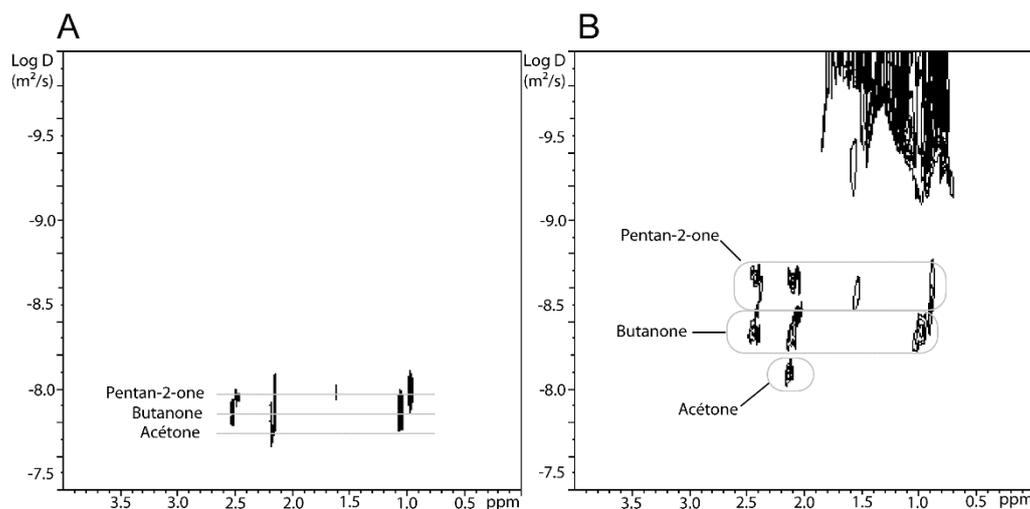


Figure 5 : Cartes DOSY de la série homologue des cétones obtenues dans l'acétonitrile deutérié (A) sans et (B) avec une phase chromatographique ODS. Dû à des problèmes de superposition de signaux, les cartes DOSY ont été enregistrées pour chacune des molécules seules puis superposées. Figure adaptée de P3.

En chromatographie, c'est bien le couple phase stationnaire (ou phase chromatographique) / éluant qui détermine la séparation des différents composés. En effet, tandis que le greffage de la phase chromatographique permet de jouer sur le mécanisme de rétention, la composition de la phase mobile participe à l'organisation du greffon. Ainsi, la structure chromatographique peut être comparée à une barrière de piquets lorsqu'elle est déployée verticalement (sans molécule liquide à l'intérieur) ; à des broussailles lorsque le soluté s'insère dans le support ou à une meule de foin lorsque les molécules sont immergées dans le support [46]. Je n'oserai m'aventurer plus loin dans les explications des phénomènes chromatographiques, le Professeur Guiochon, un pont de mécanismes en CLHP (plus de 1000 articles !) et rapporteur de ma thèse, ayant dit lors de ma présentation que j'avais « *une ignorance encyclopédique de la chromatographie* ». Les capacités de rétention des deux séries homologues présentées ci-dessus ont été suivies en fonction de la composition de la phase mobile en eau. Pour illustrer les similitudes entre les deux méthodes, nous avons proposé de représenter les résultats de RMN de diffusion sous une forme similaire à celle d'un chromatogramme, l'échelle des temps étant ici remplacée par une échelle corrélée à l'ADC (Figure 6). La représentation des résultats sous cette forme montre clairement que l'« ordre de rétention » en RMN est équivalent à celui qui serait observé en CLHP dans les mêmes conditions : les molécules les plus petites sont « éluées » en premier. Nous remarquons que l'ajout d'eau dans l'éluant entraîne un « temps de rétention RMN » plus court pour l'ensemble des molécules étudiées. Ceci est différent de ce qui est observé en CLHP où le temps de rétention des solutés augmente avec la composition en eau de la phase mobile. Les mécanismes mis en jeu lors des séparations chromatographiques sont complexes et multiples ; aussi, il n'est pas évident de trouver une justification immédiate à cette différence. Nous avons proposé qu'en CLHP, le temps de rétention dépend directement de la relation entre le temps passé par les molécules immobiles sur le support et en mouvement dans l'éluant. Or, en RMN, une telle phase mobile n'existe pas et nous nous concentrons uniquement sur les phénomènes se déroulant à la surface du support chromatographique. L'addition d'eau entraînant une évolution de la structure du support chromatographique (déploiement des greffons), les molécules tests peuvent ainsi sonder des environnements différents à l'intérieur des pores ou dans les chaînes carbonées déployées. Le fait que l'ADC d'un soluté augmente avec le pourcentage d'eau pourrait suggérer que nous regardons la diffusion définie en CLHP comme la diffusion intraparticulaire (combinaison de diffusion

moléculaire à l'intérieur des pores et de diffusion de surface), qui est la seule diffusion augmentant avec l'ajout d'eau [47].

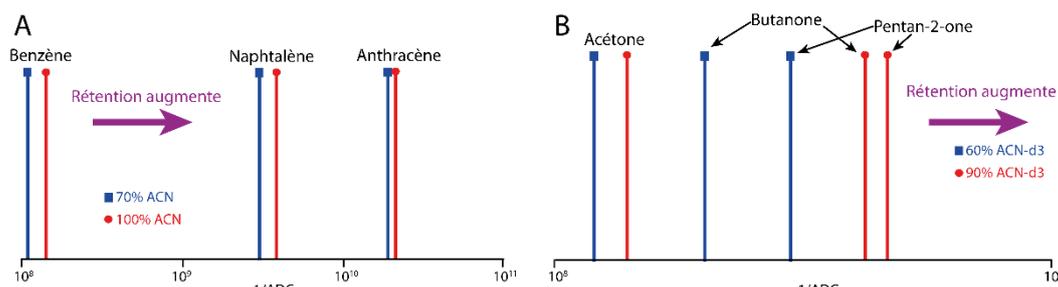


Figure 6 : Représentation des résultats obtenus avec deux différentes compositions de l'éluant pour la série homologue des (A) aromatiques et (B) cétones. Les résultats sont représentés de telle sorte à pouvoir être comparé avec un chromatogramme. Figure adaptée de P3.

Après avoir étudié les propriétés de la phase mobile sur le pouvoir séparatif de la « RMN Chromatographique », je me suis intéressé au rôle du support chromatographique dans la séparation : Quelle est l'influence du groupement greffé sur la silice ? Les pores ont-elles un effet sur la séparation ? Pour répondre à ces questions, j'ai travaillé exclusivement avec la série homologue des aromatiques afin de maximiser la sensibilité des mesures. Tandis que les résultats entre CLHP et « RMN Chromatographique » sont comparables avec une phase greffée ODS, ils sont surprenants lorsque la phase est remplacée par de la silice vierge. L'illustration ci-dessous résume les résultats obtenus avec ce support et a donné lieu à la couverture interne de la partie communication du numéro d'*Angewandte Chemie, International Edition* dans lequel P5 a été publié. Le rotor est représenté au centre de l'image. Il contient une image microscopique d'une phase chromatographique ainsi que le mélange de molécules contenu à l'intérieur. Ces molécules sont séparées dans le rotor pour illustrer les différences obtenues dans leur ADC. Le chromatogramme est représenté en haut à gauche tandis que la carte DOSY, pivotée pour obtenir une lecture similaire à celle d'un chromatogramme, en bas de l'image. « Ma thèse en 180 secondes » n'existait pas au début des années 2000 mais cette illustration aurait pu postuler à un concours « ma thèse en une image » ! Nous voyons clairement que la CLHP ne permet pas de séparer ces molécules tandis qu'elles le sont par « RMN Chromatographique ». La surface spécifique entre les deux supports étant similaire et l'effet des silanols résiduels de la phase greffée ayant été éliminé par l'utilisation d'une phase post-greffée, il semblerait donc que le greffage du support ne joue pas un rôle critique en « RMN Chromatographique ».

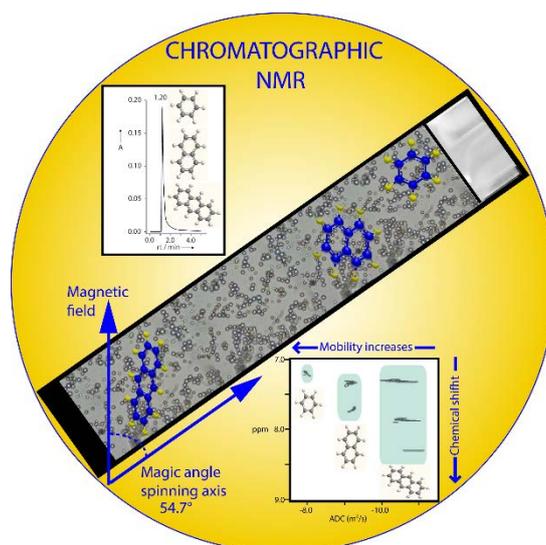


Figure 7 : Illustration résumant les résultats sur la comparaison de l'effet du greffage en CLHP et en « RMN Chromatographique ». Cette illustration a été publiée en tant que page interne de couverture de la partie communication du numéro d'*Angewandte Chemie, International Edition* dans lequel a été publié l'article **P5**.

Le greffage ne jouant pas de rôle sur la séparation en RMN, je me suis intéressé au rôle des pores. A la difficulté d'obtenir de la silice non poreuse s'ajoute des propriétés physico-chimiques souvent fortement différentes des silices poreuses. Le Tableau 1 illustre les propriétés physico-chimiques principales des différentes silices utilisées. Nous pouvons notamment remarquer la différence significative de la surface spécifique entre les silices poreuses et non poreuses qui se traduit par une forte différence de surface disponible à l'intérieur du rotor. Les différences étant tellement importantes, il n'est malheureusement pas possible d'obtenir une surface de support chromatographique, à l'intérieur du rotor, équivalente entre les systèmes poreux et non poreux.

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des phases chromatographiques utilisées.

Fournisseur Phase	Support greffé ODS			Support vierge	
	Merck ODS	Merck ODSe	MICRA ODS	Merck Silice	MICRA Silice
Taille des particules (μm)	5	5	1,5	5	1,5
Taille du pore (\AA)	100	100		100	
Surface spécifique ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	350	350	2	400	2
Surface à l'intérieur du rotor (m^2)	8,75	8,75	0,10	10,00	0,10

Les cartes DOSY ont été enregistrées avec le support greffé ODS (**Figure 8**) et avec la silice vierge (**Figure 9**) en fonction de la présence ou non de pore dans le support. La ressemblance entre les deux Figures est frappante. En absence de support, les coefficients de diffusion sont dans la gamme attendue ($\sim 10^{-9} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) avec une faible différence dans leur valeur pour les différents solutés. L'ajout de la phase chromatographique non poreuse ralentit les analytes (la carte DOSY est translaturée vers le haut) mais aucune discrimination n'est créée. L'ajout du support se traduit par une restriction du déplacement des solutés à l'espace extraparticulaire (c'est le seul qui existe !) de la silice. Lorsque la silice contient des pores, les analytes sont discriminés par leur ADC. La similitude des cartes en fonction de la nature du support suggère encore une fois que le greffage ne joue qu'un faible rôle dans la « RMN Chromatographique ». Malheureusement, les différences dans les propriétés des silices ne permettent pas de tirer des conclusions définitives de ces expériences. En effet, la surface disponible à l'intérieur du rotor est différente de deux ordres de grandeur selon que la silice soit poreuse ou non. Il n'est donc

pas à exclure que les sites actifs sur la silice non poreuse soient saturés, diminuant donc la capacité séparative du système.

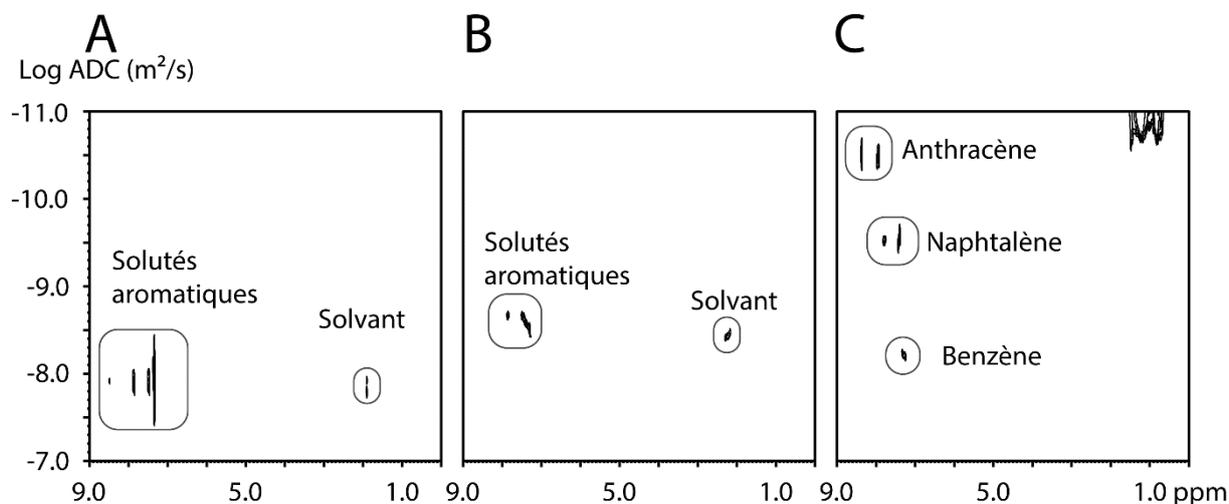


Figure 8 : Cartes DOSY obtenues avec la série homologue aromatiques dissoute dans un mélange d'acétonitrile deutérié (A) sans et avec une phase chromatographique ODS (B) non poreuse et (C) poreuse (100Å). Figure adaptée de ma thèse.

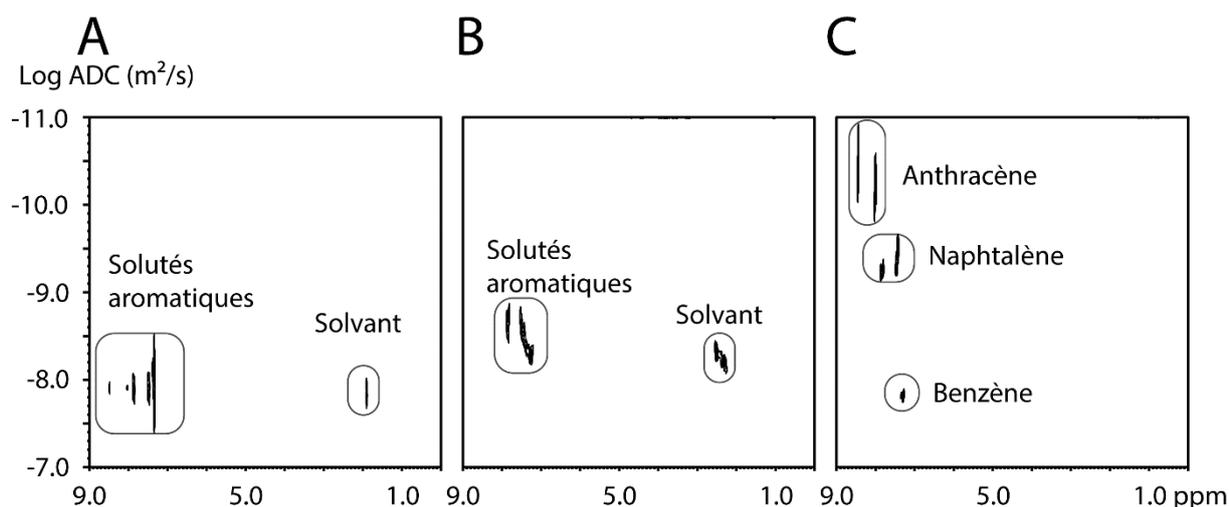


Figure 9 : Cartes DOSY obtenues avec la série homologue aromatiques dissoute dans un mélange d'acétonitrile deutérié (A) sans et avec une phase chromatographique vierge (B) non poreuse et (C) poreuse (100Å). Figure adaptée de ma thèse.

Mes travaux de thèse ont permis de mieux comprendre cette approche originale dont seule la preuve de concept avait été réalisée. J'ai mis au point une méthode de préparation de l'échantillon robuste et démontré l'influence de différents paramètres (tels que le volume de liquide, le temps d'équilibre de l'échantillon, l'influence de la vitesse de rotation sur l'ADC, ...). Mes travaux ont également permis de mieux comprendre les phénomènes de rétention mis en jeu dans cette technique. Evidemment, d'autres approches et stratégies auraient pu être choisies. Par exemple, la séparation d'énantiomères grâce à des supports chiraux n'a pas été abordée. Ce travail et ses avancées est certes « mon » travail dans le cadre de ma thèse mais il s'inscrit dans un cadre plus général et est le fruit de discussions et de choix collectifs (qui, au final, ne se sont pas avérés si négatifs !).

Ces développements ont été poursuivis à la suite de ma thèse. Une partie de la recherche effectuée a été dans la suite directe de mes travaux [48] [49] ou en étendant les études RMN à des composés ioniques [50]. Mes travaux ainsi que leur continuité ont donné lieu à la rédaction

de deux revues de littérature [51; 52]. Une autre partie des recherches s'est focalisée sur la compréhension des interactions mises en œuvre dans la « RMN Chromatographique » (P17) [53].

La « RMN Chromatographique » peut être classée dans la famille des expériences de diffusion assistée par une matrice [54]. Des travaux ont été menés en modifiant la nature du support chromatographique dans le but de se rapprocher de la chromatographie d'exclusion stérique, c'est-à-dire une séparation par le support basée sur la taille des molécules [55; 56]. Une des critiques qui peut être émise envers la « RMN Chromatographique » est la nécessité de faire tourner l'échantillon à l'angle magique. En effet, une sonde spécifique est nécessaire et les réglages, notamment d'homogénéité du champ magnétique ne peuvent être automatisés. Des équipes ont donc développé la « RMN Chromatographique » avec des sondes liquides. Pour cela, la première proposition a été de travailler avec des solvants dont la susceptibilité magnétique était identique à celle du support chromatographique [44; 57]. Les solvants proposés contiennent de fortes proportions de molécules peu utilisées (voire pas commerciales !) tel que le CDBr_3 ou le CH_2I_2 en mélange avec le CDCl_3 . Toujours dans la même idée de diminuer les inhomogénéités de champ magnétique, González-García et al. ont proposé l'utilisation de microsphères de silice poreuse [58]. Il est à noter que mes travaux ont pu être utilisés par les chromatographistes pour comprendre les phénomènes de rétention à la surface du support [59; 60].

2.2.2. UN NOUVEL ECHANTILLONNAGE DE L'INTENSITE DES GRADIENTS DE CHAMP MAGNETIQUE

Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'il était possible d'améliorer la séparation virtuelle par RMN de diffusion en ajoutant une phase chromatographique. Par contre, il était nécessaire d'enregistrer de multiples expériences de diffusion à cause de la large échelle de diffusion qui devait être sondée (2 ordres de grandeur). Pour pouvoir estimer les coefficients de diffusion, il est nécessaire d'avoir un nombre suffisant de points exploitables dans la décroissance du signal (ce nombre de points dépendant du nombre de molécules présentes dans la décroissance). D'une manière générale, il est considéré que l'intensité du signal RMN obtenue avec le PFG le plus fort doit être de l'ordre de 1 à 10% du signal enregistré en absence de gradients. Dans le cas de mélanges complexes comme ceux obtenus précédemment, si l'échantillonnage des gradients est optimisé pour le benzène, alors les signaux de l'antracène ne seront pas assez atténués et le coefficient de diffusion sera estimé avec une forte erreur. A l'inverse, si les PFG sont optimisés pour mesurer la mobilité de l'antracène, l'atténuation des signaux du benzène sera tellement rapide qu'il sera impossible de mesurer avec précision son coefficient de diffusion. Ceci met en évidence l'importance de l'échantillonnage des PFG [38] pour pouvoir estimer de façon précise les coefficients de diffusion sur une large échelle, problématique fréquemment rencontrée lors de l'étude de mélanges complexes. Les communautés d'imagerie et de spectroscopie RMN n'utilisant pas tout à fait le même vocabulaire, il me paraît important de souligner une notion déjà abordée page 41. L'atténuation du signal RMN va dépendre de l'ensemble des termes présents dans le facteur exponentiel de l'équation (1), à savoir δ , γ , Δ , g ; le produit de ces termes selon l'équation (1) donnant le facteur b utilisé en imagerie (utilisé également sur la Figure 2B). En pratique, le seul de ces paramètres qui est varié est l'intensité g des PFG ; paramètre utilisé par la communauté des spectroscopiques. L'application utilisée dans mon travail étant basée sur la spectroscopie, je parlerai des intensités de gradients plutôt que de la valeur de b .

L'échantillonnage de l'intensité des gradients se réalise en général selon trois approches. La première consiste à utiliser des pas constants entre les différentes intensités de gradients. Cette stratégie permet de sonder le système sans a priori, à la différence des deux autres. La seconde consiste à incrémenter le pas entre les valeurs de gradients de manière exponentielle : de nombreux spectres seront enregistrés avec de faibles valeurs de gradients et significativement moins avec de fortes intensités de gradients. Ainsi, il est plus aisé avec cet échantillonnage de séparer virtuellement des molécules diffusant rapidement et la précision sur l'estimation de l'ADC de molécules lentes sera faible. La troisième approche est l'opposée de la précédente : peu de spectres sont enregistrés avec de faibles intensités de gradients et beaucoup plus avec des fortes ; la rampe est dite quadratique. Les ADC des molécules lentes seront bien estimés tandis que ceux des molécules rapides seront entachés d'une forte erreur car peu de points seront utilisés pour régresser les données. La Figure 10 représente ces trois rampes. Au cours de mon contrat post-doctoral au sein de l'équipe de la Professeure Malet-Martino, j'ai été amené à analyser par RMN de diffusion des médicaments. D'un point de vue de la composition, cette formulation peut être vue comme un mélange de petites molécules qui diffuseront rapidement en solution et de macromolécules qui auront des ADC lents une fois dissoutes. Aucune des stratégies d'acquisition ne permet donc d'estimer avec la plus faible incertitude les ADC dans de tel système. J'ai donc proposé une nouvelle forme pour calculer les intensités des PFG basés sur une sigmoïde. Cette stratégie permet d'avoir une pente plutôt faible pour les premières intensités de gradients, permettant d'enregistrer suffisamment de spectres ayant du signal pour les molécules diffusant rapidement, une pente élevée au centre puis une pente faible pour les plus fortes intensités de gradients permettant ainsi de bien atténuer les signaux RMN des macromolécules. Cette nouvelle forme, mise en œuvre en utilisant une forme gaussienne, est présentée sur la Figure 10.

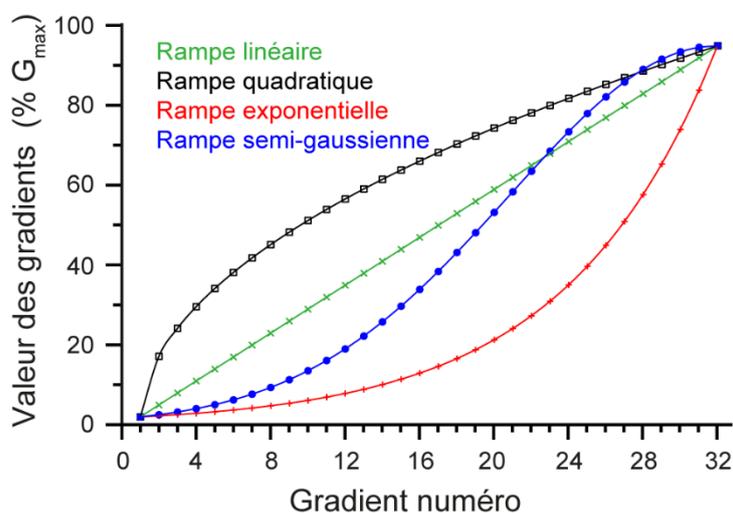


Figure 10 : Représentation schématique des trois options pour choisir l'échantillonnage de l'intensité des PFG. La quatrième approche, la semi-gaussienne, est l'échantillonnage que j'ai proposé pour étudier les mélanges complexes. Figure adaptée de P36.

L'intérêt de cette nouvelle stratégie dans le choix de l'intensité des PFG a été démontré dans la déformulation des médicaments. La déformulation est l'opération consistant à identifier les différents composés d'un mélange. Cette approche est fréquemment utilisée lorsque des concurrents souhaitent avoir des informations sur la composition d'un produit tel que des

médicaments, des compléments alimentaires ou des parfums²... La déformulation peut également être utilisée pour détecter une fraude sur la formulation : ajout ou suppression d'un composé. La Figure 11 compare l'atténuation du signal RMN d'une gélule d'Esoméprazole dissoute dans du DMSO-d₆ en fonction des rampes choisies. La décroissance du signal RMN du principe actif (Esoméprazole, 345,4 g.mol⁻¹ soit une molécule diffusant relativement rapidement) est représenté ainsi que celle d'une région contenant plusieurs molécules diffusant rapidement (triéthyl citrate et tween) et lentement (hypromellose). Ces données ont été enregistrées lors d'une même acquisition en utilisant la séquence « One-shot » proposée par Petla et al. [61]. La séquence proposée permet de diminuer le cyclage de phase nécessaire pour chaque intensité de PFG en utilisant des gradients bipolaires asymétriques. La séquence étant basée sur un écho stimulé, un choix judicieux du facteur d'asymétrie permet de ne réaliser que deux acquisitions par PFG ; le nom de « One shot » est donc un peu exagéré (voir également 2.2.3). Pour mesurer l'ADC, nous avons utilisé l'expression que j'avais corrigée lors de mes premiers travaux avec cette séquence (**C3**). Pour le principe actif, nous pouvons remarquer que l'ensemble des points n'est pas utilisable, certains étant dans le bruit. Le nombre de points contenant de l'information dépend de la rampe choisie. Pour la rampe exponentielle, 27 points sur 32 peuvent être utilisés pour régresser les données tandis que seulement 12 le sont pour la rampe quadratique. La stratégie semi-gaussienne permet d'exploiter 20 points, un nombre similaire à la rampe linéaire (19). L'avantage de la rampe semi-gaussienne réside dans la forte densité d'échantillonnage aux faibles valeurs de gradients et donc, à une meilleure définition des ADC rapides. De la même manière, pour bien définir les ADC des molécules lentes, il est nécessaire d'avoir suffisamment de points ayant de fortes intensités de gradients ; c'est ce que propose la rampe semi-gaussienne à la manière de ce que réalise l'échantillonnage quadratique. Pour démontrer l'efficacité de la rampe semi-gaussienne, l'incertitude sur la régression des ADC a été reportée à la fois pour le principe actif (seul signal pouvant être isolé dans le spectre) et pour des zones contenant plusieurs signaux. Le Tableau 1 de **P36** résume ces valeurs et met en évidence, que pour le principe actif, l'utilisation de la rampe semi-gaussienne permet d'obtenir une régression aussi bonne que pour l'échantillonnage exponentiel, le quadratique donnant des résultats significativement plus mauvais que les autres échantillonnages. Pour les zones contenant un mélange de molécules, la rampe quadratique est la plus performante avec la rampe semi-gaussienne. En une seule expérience, la rampe semi-gaussienne permet donc d'obtenir les meilleures régressions des données (soit l'incertitude sur l'ADC la plus faible) et ce, sur les petites comme sur les macro molécules.

² Cette thématique a fait l'objet de la thèse de Clément Truan dans l'équipe MASS de mon unité de recherche. Il doit soutenir son travail à la fin de l'année 2019.

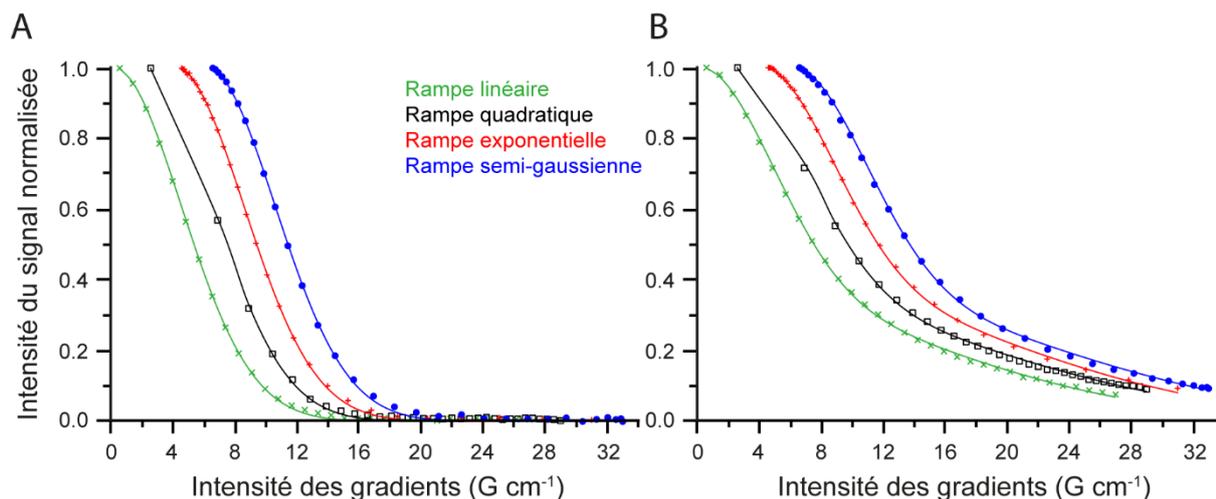


Figure 11 : Intensité du signal RMN en fonction de l'intensité des PFG pour des rampes (verte) linéaire, (noire) quadratique, (rouge) exponentielle et (bleue) semi-gaussienne enregistré sur une gélule Esoméprazole Cristers dont le contenant a été dissout dans du DMSO-d₆ pour le signal (A) du principe actif (singulet à 8,24 ppm) et (B) la région entre 1,45 et 0,98 ppm contenant un mélange de molécules. Les régressions ont été réalisées avec une modèle (A) mono- et (B) bi-exponentiel. Pour des facilités de lecture, les rampes de gradients ont été translattées de 2 G.cm⁻¹ entre chaque rampe. Figure adaptée de **P36**.

Cette rampe a été appliquée avec succès pour déformuler plusieurs médicaments (stage de M2 de A. Bonny en 2014). Une carte DOSY illustrant les résultats spectaculaires qui peuvent être obtenus avec cet échantillonnage est illustrée sur la Figure 12. Le principe actif est parfaitement séparé du sucrose et du SDS³. Ces trois molécules ont des ADC compris entre 1,5 et 2,5×10⁻¹⁰ m².s⁻¹. Le copolymère et la povidone, bien qu'ayant des taches relativement larges dans la dimension de la diffusion, sont également bien séparés. Enfin, le signal RMN du PEG⁴ donne lieu à deux ADC suggérant que deux PEG de longueurs différentes ont été utilisés dans la formulation du médicament. Ceci nous a été confirmé par le fabricant du médicament.

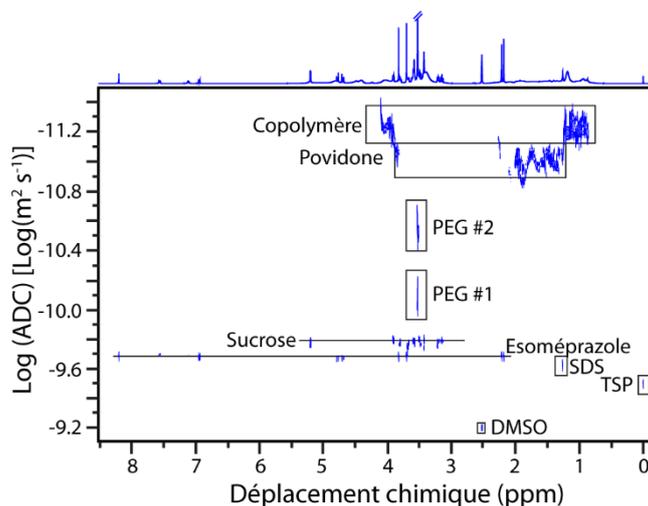


Figure 12 : Carte DOSY de l'Esoméprazole 40 mg fabriqué par TEVA obtenue par un échantillonnage des PFG en utilisant une rampe semi-gaussienne. Le copolymère est composé d'acide métacrylique et d'écrylate d'éthyl. Figure adaptée de **P36**.

Récemment, Franconi et al. [62] ont comparé les bornes de Cramér-Rao qui pouvaient être atteintes en fonction de la forme de la rampe des gradients, de l'intensité maximale des PFG et

³ Dodécylsulfate (ou laurylsulfate) de sodium

⁴ Polyéthylène glycol ou macrogol

du nombre de points dans la rampe. Une borne de Cramér-Rao est l'incertitude minimale qui pourra être atteinte, sans certitude de l'atteindre, dans des conditions expérimentales bien définies. En d'autres termes, les auteurs ont cherché à déterminer les meilleures conditions expérimentales pour estimer l'ADC lorsqu'un signal contient deux mobilités. Dans leurs travaux, Franconi et al. ont choisi de reporter les résultats en fonction du rayon hydrodynamique des molécules, une grandeur qui est directement reliée à l'ADC à partir de la relation de Stoke-Einstein. Dans la Table 1 de leur article, il est évident que, pour le nombre d'échantillonnage choisi (128 points), la rampe sigmoïde est celle donnant, dans la majorité des cas, la borne de Cramér-Rao la plus faible. Ces résultats sont confirmés expérimentalement dans la Figure 5 de l'article.

La rampe sigmoïde que j'ai proposée est donc la plus intéressante pour étudier des mélanges complexes comme l'a démontré Franconi. Cette rampe a été utilisée dans des travaux publiés par l'équipe de RMN Biomédicale du Professeur Malet-Martino, équipe à laquelle j'appartenais lors de la réalisation de ce travail. Il est donc nécessaire que d'autres groupes s'approprient cette nouvelle stratégie d'échantillonnage. Il est à noter qu'avec une évolution du logiciel TopSpin de Bruker, les rampes de gradients exponentielle ou semi-gaussienne ne peuvent plus être réalisées que de l'intensité maximale vers l'intensité minimale des PFG, soit dans le sens opposé au sens habituel.

2.2.3. REDUCTION DE LA DUREE DE L'EXPERIENCE : APPLICATION A DE LA DIFFUSION RESTREINTE

Dans les paragraphes précédents, nous avons vu comment améliorer la séparation à l'aide soit d'un support chromatographique soit d'une nouvelle stratégie d'échantillonnage des PFG, la combinaison des deux étant évidemment possible. La mesure des ADC est basée sur une expérience de type 'pseudo-2D', une série de spectres RMN doit être enregistrée avec différentes intensités de PFG. Le temps d'une expérience va donc dépendre à la fois du nombre d'accumulations nécessaire (SNR, cyclage de phase) et du nombre d'intensités de PFG réalisé. De plus, la méthode étant basée sur une diminution du signal RMN avec l'intensité des PFG, il est indispensable de considérer le SNR pour le PFG le plus intense. La durée d'une expérience peut donc varier d'une dizaine de minutes pour les cas les plus favorables jusqu'à plusieurs heures. Le développement de séquences (ultra-)rapides pour mesurer l'ADC est donc intéressant, particulièrement pour des systèmes en évolution.

Il existe deux stratégies pour enregistrer rapidement une expérience de RMN de diffusion. La première consiste à enregistrer en un nombre minimal d'acquisitions le spectre pour chaque valeur de gradients, le terme consacré est une séquence '*one-shot*'. La seconde, consiste à enregistrer en une seule acquisition l'ensemble de l'expérience de diffusion, la séquence est dite '*single-shot*'. Price a clarifié l'utilisation de ces termes p262-263 de son livre [41]. En 2007, dans un chapitre de livre, j'ai co-écrit une revue de la littérature au sujet des séquences rapides en RMN de diffusion (C1). Dans les séquences '*single-shot*' (une acquisition seulement), nous pouvons distinguer les séquences enregistrant l'information à partir d'un train d'écho (Burst [63], Multiple Modulation Multiple Echoes [64], Fast-CRAZED [65]) de celles enregistrant l'information de diffusion grâce à un codage spatial de celle-ci. Je ne me focaliserai que sur ces dernières dans les quelques lignes qui suivent. Les premiers travaux sont dus à Thrippleton dans groupe de James Keeler [66] qui proposa de mesurer la diffusion en appliquant deux impulsions d'inversions adiabatiques en présence d'un gradient. Cette combinaison entraîne une dépendance entre la position spatiale des spins et la durée effective des PFG. En appliquant un gradient de lecture faible lors de l'enregistrement du signal, l'évolution de la position spatiale

des spins est lue. Après transformée de Fourier, le spectre RMN est obtenu avec des signaux dont la forme dépend de leur ADC. Il faut alors régresser chacun des signaux du spectre pour trouver les ADC. Le schéma impulsionnel permettant de mesurer la diffusion ressemble fortement aux méthodes de RMN 2D ultra-rapide proposées par Frydman à la même époque [67]. Shrot et Frydman proposèrent une séquence [68] proche de celle de Thrippleton mais en changeant le bloc d'enregistrement du signal. Ils utilisèrent un bloc de type '*echo planar*' permettant d'enregistrer à la fois l'information de diffusion et un spectre dont les signaux ne sont pas entachés de déformation. Il est intéressant de noter les applications développées actuellement par Dumez et son groupe en utilisant la RMN de diffusion '*single-shot*' [24; 69]. Dans les stratégies '*one-shot*' (nombre minimal d'accumulations par intensité de gradients), la plus utilisée certainement est la méthode proposée par Pelta [61] et mentionnée au paragraphe précédent. La séquence (Figure 13) est basée sur un écho stimulé contenant des impulsions de gradients bipolaires. Pour défocaliser l'aimantation non refocalisée par l'impulsion π de chaque bloc de gradients, les PFG n'ont pas la même intensité : un facteur $\pm\alpha$ est ajouté à l'intensité g des PFG. L'introduction de ce facteur permet alors de diminuer le nombre d'accumulations nécessaire au cyclage de phase.

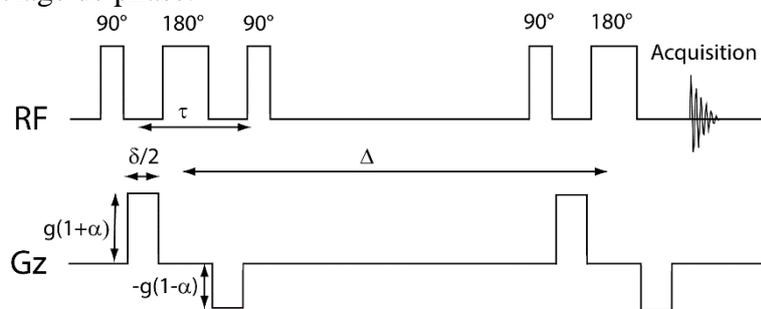


Figure 13 : Chronogramme de la séquence proposée par Pelta et al. [61]. Les deux impulsions de gradients bipolaires ont une intensité différente d'un facteur $\pm\alpha$. Les différents termes ont été définis dans la Figure 1.

Plusieurs raisons permettent d'expliquer le succès de cette séquence : (1) elle a été implémentée sur la séquence la plus classique en RMN de diffusion (permettant de limiter les courants de Foucault), (2) sa mise en œuvre et le traitement des données sont proches des séquences classiques et (3) la qualité de la mesure et du signal peut rapidement être évaluée. J'ai donc choisi d'étudier des systèmes biologiques dont la diffusion est restreinte à partir de cette séquence.

Les érythrocytes, ou globules rouges, sont les cellules sanguines permettant de transporter l'oxygène jusqu'aux différents tissus. Bien qu'étant dépourvues de noyau et de mitochondries chez l'homme, ces cellules, ne consommant que du glucose, présentent des voies métaboliques complexes et variées, dont certaines posent encore questions (**P27**). Elles présentent donc un intérêt tout particulier d'un point de vue biophysique : la modélisation des voies métaboliques y est plus simple que pour des cellules contenant des structures plus complexes (absence notamment des transporteurs membranaires). Evidemment, il existe également un intérêt scientifique de mieux comprendre les processus biologiques mis en œuvre dans ces cellules [70; 71]. Les érythrocytes, dans leur forme normale, sont des disques biconcaves dits discocytes. Lors du passage des globules dans les petits vaisseaux sanguins, leur forme va changer pour devenir une sphère avec des pointes appelée échinocyte, processus réversible lorsque les vaisseaux sanguins s'élargissent. Cette forme échinocyte est également la première lors du processus d'apoptose, continuant ensuite, dans un processus irréversible, vers une forme sphérique suivi de la rupture de la membrane [72]. Callaghan et al. [73] ont démontré que

lorsque la diffusion d'un métabolite (en l'occurrence l'eau) est restreinte à l'intérieur d'une forme bien déterminée (tant par la forme que par sa taille), il était possible d'observer des minima locaux de l'intensité du signal RMN en fonction de l'intensité des PFG dus au processus de diffusion-diffraction, similaire à l'optique. Quelques années plus tard, cette technique a été appliquée à une solution dense de globules rouges [74]. Grâce à l'apparition de ces minima dans l'intensité du signal en fonction de l'intensité des gradients (ici représentée sous la forme du facteur q : $q = \frac{\gamma g \delta}{2\pi}$), le diamètre des discocytes peut être estimé, prouvant par la même occasion l'alignement des globules rouges avec le champ magnétique principal \mathbf{B}_0 . Ces travaux ont été suivis par la caractérisation des autres formes des érythrocytes [75; 76]. L'inconvénient principal de cette expérience réside dans son temps d'acquisition qui est proche d'une heure, empêchant ainsi toute analyse dynamique de la forme de la cellule. Appliquer des séquences rapides sur ce type d'échantillon est donc important pour gagner en résolution temporelle, permettant alors de caractériser l'évolution de la forme des cellules.

J'ai donc appliqué la séquence de Pelta et al. [61] sur des échantillons de globules rouges. Il est à noter que les PFG utilisés dans une telle séquence sont élevés et que donc, pour parfaitement supprimer le signal non désiré, le facteur d'asymétrie utilisé est assez élevé (0,3) diminuant ainsi la valeur maximale de q pouvant être atteinte dans des conditions de PFG (δ et Δ) similaires à la séquence classique. Le premier travail a consisté à valider la séquence rapide en comparant l'atténuation du signal RMN enregistré avec la séquence classique et la séquence rapide (Figure 14). Nous pouvons remarquer que les mêmes caractéristiques sont observées pour les deux expériences avec cependant un décalage dans la valeur de q pour les minima. Cette différence a ensuite pu être attribuée, suite à une discussion avec Andrew Coy (spécialiste des phénomènes de diffraction par RMN de diffusion puisqu'il est le co-auteur des publications de référence [73; 74] et aujourd'hui PDG de Magritek) au fait que la durée δ des PFG, qui sont bipolaires, ne sont pas négligeables par rapport au temps de diffusion Δ (C3). A partir de ces données, il est possible de remonter à la probabilité de déplacement moyen des molécules d'eau, en d'autres termes, à la distance séparant les parois dans les érythrocytes. Pour cela, nous avons utilisé un traitement permettant de diminuer le bruit pour les hautes valeurs de q tout en éliminant les basses fréquences [77] ; ce traitement est illustré dans l'insert de la Figure 14 et montre que pour les deux séquences, la probabilité maximale du déplacement de l'eau est obtenue pour une distance d'environ 6,5 μm , distance correspondant à la longueur d'un discocyte.

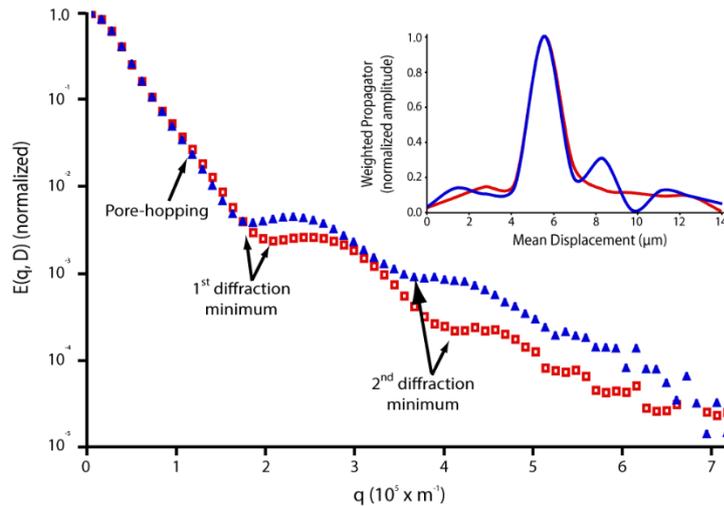


Figure 14 : Décroissance du signal RMN de l'eau dans une suspension d'érythrocytes (taux d'hématocrite 70%) en fonction de l'intensité des PFG (représentée par la valeur q). Espace- q enregistré avec (carrées rouge) une séquence PFG classique en 40 min et (triangles bleus) une séquence PFG rapide en 5 min. Figure adaptée de **P9**.

Pour étudier l'habilité de la séquence à détecter les changements de forme, l'apoptose a été induite en bloquant la glycolyse grâce à l'ajout de fluorure de sodium. L'évolution de la décroissance du signal entre la forme initiale (discocyte) des érythrocytes et leur forme finale (sphérocyte) ainsi que le déplacement moyen des molécules d'eau sont illustrées sur la Figure 15. Le diamètre pour les sphérocytes est estimé à $2,8 \mu\text{m}$ soit inférieur au $5 \mu\text{m}$ qui sont mesurés par microscopie. Cette différence peut s'expliquer par la variabilité dans les dimensions des sphérocytes comme observé par microscopie. En effet, par RMN PFG, nous mesurons un diamètre moyen des cellules dans l'échantillon.

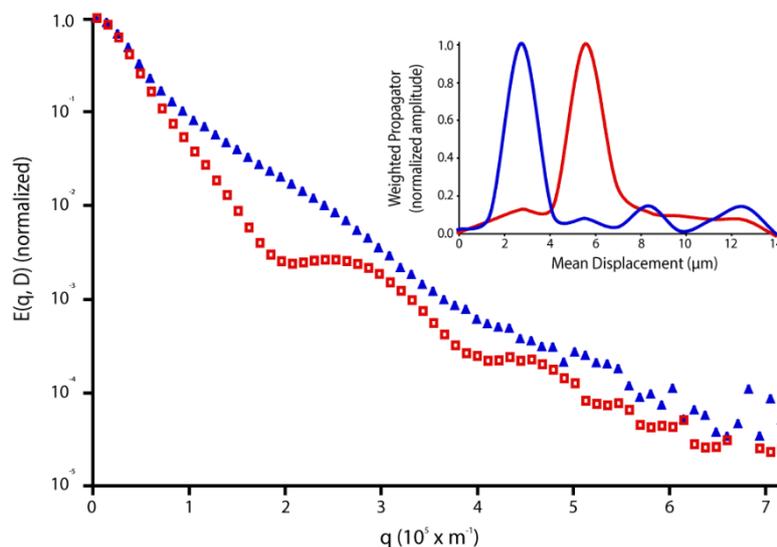


Figure 15 : Décroissance du signal RMN de l'eau enregistrée avec une séquence PFG rapide et dans une suspension d'érythrocytes (taux d'hématocrite 70%) ayant une forme (carrées rouges) de discocyte ou (triangles bleus) de sphérocyte. Figure adaptée de **P9**.

A partir des données RMN, j'ai pu calculer le diamètre moyen des cellules ainsi que le pourcentage de discocytes et corrélérer ces données avec la méthode de référence, la microscopie. La préparation de l'échantillon entre les deux méthodes est cependant fortement différente : en RMN, l'échantillon est fortement concentré tandis qu'en microscopie, les globules rouges sont dilués ; en RMN, le contrôle de la température de l'échantillon est aisé tandis qu'il est

beaucoup moins évident en microscopie. Compte tenu des différences expérimentales entre les deux méthodes, la corrélation peut être jugée comme bonne (données non montrées). Cette comparaison permet également de mettre en évidence les avantages de la RMN PFG pour étudier cet échantillon : (1) les conditions expérimentales sont proches des conditions *in vivo* (concentration, température) et (2) l'analyse des données peut facilement être automatisée en RMN et pas en microscopie.

Pour démontrer l'intérêt de la détermination de la forme d'une solution d'érythrocytes à l'aide d'une séquence PFG rapide, j'ai suivi le changement de forme lorsque les cellules sont empoissonnées ; j'ai également suivi le métabolisme énergétique de ces cellules à l'aide de la RMN du phosphore (^{31}P). La Figure 16 illustre l'évolution du spectre RMN du ^{31}P après arrêt de la glycolyse. Nous pouvons clairement observer une diminution du signal de l'adénosine triphosphate (ATP), molécule de base du cycle énergétique. A l'aide du signal du triéthyl phosphate, il est possible de quantifier l'ATP [78]. L'insert de la Figure 16 montre qu'une concentration non détectable en ATP est atteinte après environ 100 minutes, justifiant ainsi l'utilisation de séquences PFG rapides pour le suivi de l'évolution de la forme des érythrocytes. Cette évolution en ATP peut être corrélée avec le pourcentage de discocyte dans la solution. L'apparition d'échinocytes est détectée à partir d'environ 40 minutes, lorsque la concentration d'ATP a chuté par un facteur d'environ 2. Ces données sont en accord avec des études précédentes utilisant des méthodes classiques biochimiques pour démontrer la relation entre la forme d'un érythrocyte et la concentration en ATP [79; 80].

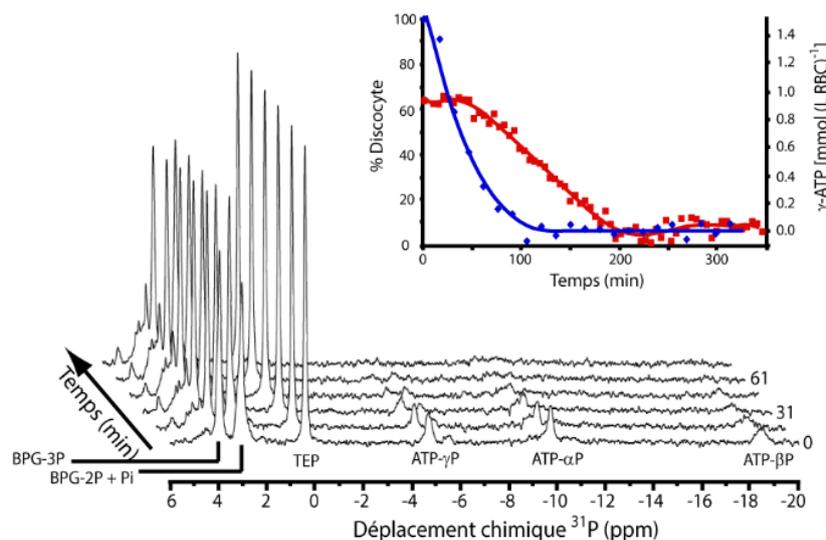


Figure 16 : Spectres RMN du ^{31}P en fonction du temps écoulé après arrêt de la glycolyse par du fluorure de sodium enregistrés sur une solution d'érythrocytes à 70% et à une température de 37°C . Le pourcentage de discocytes (rouge) et la quantité d'ATP en fonction du temps sont représentés dans l'insert. Figure adaptée de P9.

J'ai aussi démontré qu'il était possible de suivre l'évolution inverse dans la forme des globules rouges : d'une forme échinocyte vers une forme discocyte. Pour cela, le magnésium des cellules a été éliminé ; l'ajout ensuite de magnésium permet aux cellules de revenir à un métabolisme normal. Une fois le magnésium réintroduit dans les cellules, la décroissance du signal RMN PFG ne redevient jamais identique à la décroissance observée pour une solution de discocytes n'ayant subi aucun traitement. Ceci peut être expliqué par une variation dans la quantité de phospholipides dans la membrane entraînant un réalignement partiel des cellules avec le champ magnétique \mathbf{B}_0 , comme nous l'avons montré grâce à une expérience RMN basée sur un écho de spin.

En résumé, mes travaux ont démontré qu'il était possible de déterminer automatiquement l'évolution de la forme des érythrocytes avec une résolution temporelle compatible avec les processus biochimiques. Combinées à des mesures complémentaires par RMN (^{31}P ou ^1H), par microscopie ou d'autres techniques biophysiques (non utilisée dans mes études) il est alors possibles de comprendre une partie des mécanismes biochimiques impliqués dans le processus. Ces travaux sont aussi bien reconnus pour leur aspect novateur en RMN de diffusion restreinte [81-85] que par leur intérêt pour caractériser l'évolution du système et ainsi comprendre les voies métaboliques mises en jeu [70; 86; 87].

2.2.4. UNE DIFFUSION SUR TOUTE LA PLANETE

Dans cette section 2.2, j'ai décrit mes différents apports méthodologiques dans le champ de la RMN de diffusion. Ces travaux de recherche ont été réalisés lors de mes différents postes à Marseille, Sydney, Stockholm et Toulouse. Les développements présentés dans les paragraphes 2.2.1 (« RMN Chromatographique ») et 2.2.2 (échantillonnage sigmoïdal) avaient pour but d'augmenter la résolution dans le domaine indirect, la dimension dans laquelle l'ADC est représenté. Mes travaux présentés dans la section précédente avaient pour but de démontrer l'intérêt d'une mesure rapide du coefficient de diffusion pour pouvoir étudier des systèmes dynamiques. Il est à noter que ces travaux font partie, à l'exception du groupe de Morris qui a développé la séquence, des premiers à utiliser cette séquence et, à ma connaissance, sont les premiers à appliquer cette approche rapide pour regarder de la diffusion restreinte. Mes contributions en RMN de diffusion ont aussi consisté à des études plus spécifiques comme (1) le développement d'une séquence très spécifique pour supprimer les effets de l'échange d'aimantation entre deux populations (**P28**), (2) l'étude de l'effet de la rotation à l'angle magique sur l'ADC (**P7**) ou (3) la mesure du temps de résidence de polymères à la surface de nanotubes (**P19**).

Comme il sera décrit dans la partie 3 de ce manuscrit, cette expertise acquise dans la mesure de mobilité par RMN sera mise à profit pour mieux comprendre la résilience des agroécosystèmes. Pour cela, j'ambitionne de mesurer, notamment, des flux dans les végétaux et directement dans leurs environnements naturels.

2.3. DES METHODES (SEMI-)QUANTITATIVES DU GLUCOSE DANS DES SYSTEMES COMPLEXES

D'une manière générale, nous nous accordons à qualifier la molécule d'eau, sous sa forme liquide, de « molécule de la vie ». L'être humain est composé d'environ 65% d'eau et les plantes de 80%. La vie s'est développée grâce à la présence d'eau liquide sur notre planète. Cependant, cette molécule n'est pas suffisante pour faire fonctionner toute l'ingénierie du vivant et une seconde molécule est indispensable : le glucose. La consommation des molécules de glucose chez les animaux par les différentes cellules permet de produire de l'adénosine triphosphate (ATP), fournissant ainsi l'énergie nécessaire au bon fonctionnement du métabolisme, que ce soit dans des conditions anaérobie ou aérobie. La Figure 17 représente de manière simplifiée les deux principaux cycles métaboliques de la cellule que sont la glycolyse (conversion du glucose en pyruvate) et, dans des conditions aérobie, le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique). Cette Figure montre clairement qu'à partir d'une molécule de glucose, une trentaine de molécules d'ATP sont produites. La consommation de glucose est permanente pour assurer le bon fonctionnement de notre organisme et s'adapte en fonction des besoins énergétiques de celui-ci. En repensant à mes années « marseillaises », je me souviens de Stefano (Caldarelli)

entrant dans la salle de pause et engloutissant un morceau de sucre en disant, en substance : *du glucose pour mon cerveau, il me faut de l'énergie pour réfléchir.*

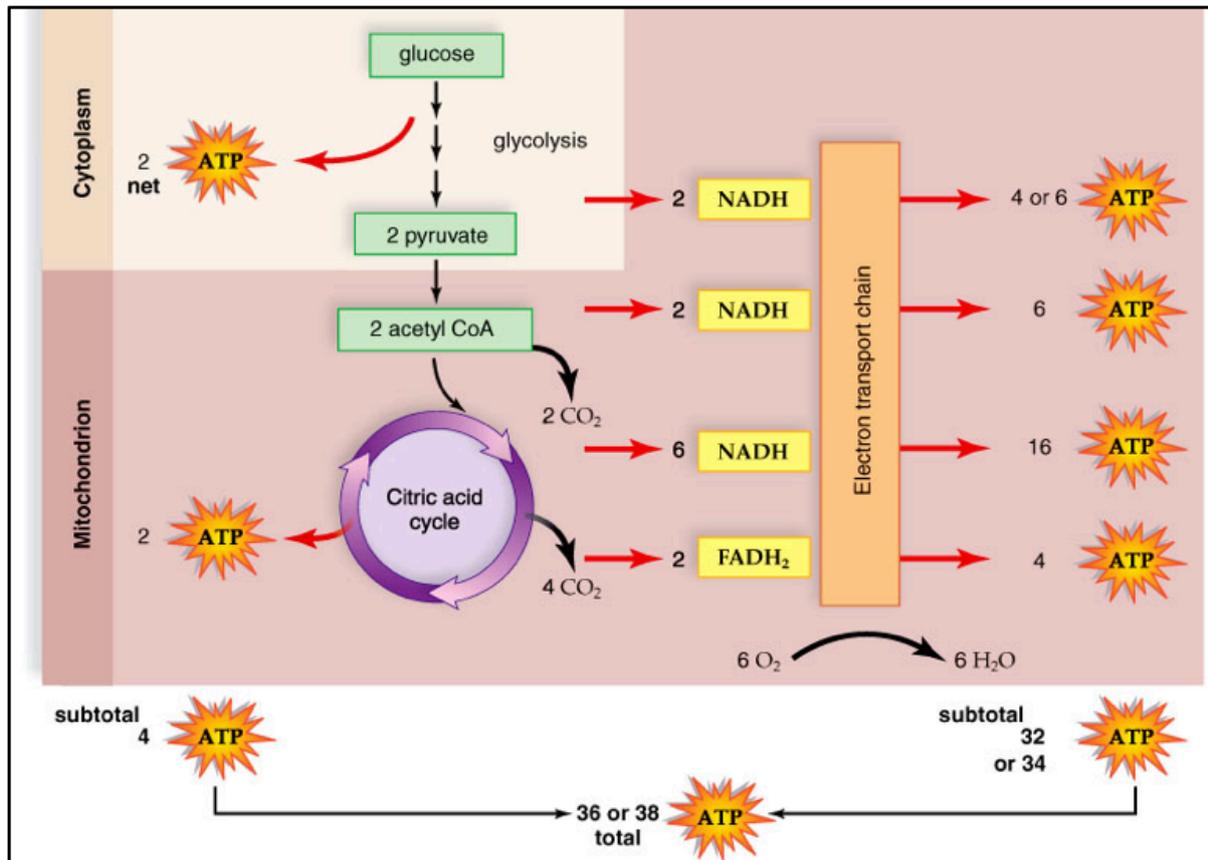


Figure 17 : Illustration schématisée de la consommation de glucose en aérobie. Le glucose est converti en pyruvate par la glycolyse. Ce dernier est transformé en acétyl-CoA avant d'intégrer le cycle de Krebs. Figure issue de http://teachtogether.chedk12.com/teaching_guides/view/142 (lien en date du 18/01/2019)

Nous venons de voir le glucose comme LA molécule énergétique de référence *in vivo*. En général, nous n'absorbons que peu de glucose mais plutôt des polysaccharides dont la digestion va produire de plus petites molécules, dont le glucose. Comme la vie est fascinante et pleine d'analogies entre espèces, quittons un instant le monde animal et intéressons-nous au végétal. Les plantes synthétisent de la matière organique grâce à la photosynthèse. A partir de molécules d'eau (encore ! pour la photosynthèse oxygénique) et de dioxyde de carbone (CO₂), les cellules de la plante, en absorbant des photons (de l'énergie lumineuse), synthétisent des glucides comme le glucose. La plante va ensuite utiliser ces molécules pour produire de la matière organique (polymères) et se développer. La plante générera de la cellulose pour sa croissance tandis qu'elle stockera ses réserves énergétiques sous forme d'amidon... qui pourra être ensuite consommé par les animaux. Bien que j'y revienne plus en détail dans la partie consacrée à la présentation de mon projet de recherche, il est à noter qu'en absorbant le CO₂ et, après conversion, en le piégeant dans la matière vivante, les écosystèmes forestiers et prairiaux sont, avec les océans, les principaux puits de carbone. Ils ont, dans un premier temps créé les conditions permettant le développement de la vie et, aujourd'hui ils limitent le réchauffement climatique dû aux activités humaines.

Le glucose joue donc un rôle clef dans les écosystèmes allant de la séquestration du carbone jusqu'à la production d'énergie pour les animaux. Développer des méthodes permettant

d'améliorer nos compréhensions de certains de ces phénomènes est donc d'un intérêt tout particulier.

C'est par hasard, au cours de mon contrat à l'université de Sydney, que j'ai été rattrapé par la 'French connection'⁵ de l'équipe du Professeur Robert G. Gilbert. Ils souhaitaient bénéficier de notre expertise pour développer une méthode permettant d'étudier les cinétiques de digestion de l'amidon. J'ai donc pu développer des méthodes avec un étudiant en thèse, Anthony Dona, dont une basée sur le contraste par transfert d'aimantation saturée par échange chimique (CEST, 'chemical exchange saturation transfer') que j'appliquerai quelques années plus tard *in vivo* lors de mon passage en Asie.

2.3.1. LE CEST EN BREF

Depuis ses débuts, la RMN a été utilisée pour mesurer les vitesses d'échange chimique. En modifiant les équations de Bloch pour prendre en compte ce phénomène, il est possible d'exprimer le signal RMN en fonction de la vitesse d'échange. La première expérience CEST peut être attribuée à Forsén et Hoffman [88] qui en 1963 mesurèrent à l'aide d'impulsions de saturation des constantes d'échange dans plusieurs systèmes. Un des premiers spectres de saturation (aussi appelé spectre-Z, voir paragraphe suivant) fut produit par Gilboa et al. en RMN du fluor [89]⁶. Le CEST est redevenu un contraste de choix grâce à son application au début des années 2000 en IRM *in vivo* [90-93]. Depuis ces premiers travaux, un nombre important d'études a été réalisé à l'aide de ce contraste. Je présenterai ci-dessous les concepts principaux du CEST en utilisant les molécules endogènes. Je n'aborderai donc pas les contrastes de type para- ou lipo-CEST. Un certain nombre de revues de littérature a été écrit à ce sujet et je recommanderais la lecture des articles suivants [94-97] et de ce livre [98].

Le contraste CEST a pour but d'imager l'échange chimique des protons entre des métabolites et l'eau. Les groupements échangeables sont en général des fonctions hydroxyles (glucose, glycosaminoglycane), amine (créatine, glutamate) ou amide (protéines). Le principe d'une expérience CEST est illustré sur la Figure 18. Une impulsion de saturation sélective est appliquée à un décalage (j'utiliserai également le mot anglais 'offset' dans la suite du manuscrit) par rapport à la fréquence de résonance de l'eau. Durant cette saturation, si elle est appliquée à la fréquence de résonance d'un proton échangeable, les protons saturés (donc invisibles d'un point de vue RMN), vont s'échanger avec ceux des molécules d'eau, diminuant ainsi son signal. Pour pouvoir détecter cette diminution, il est essentiel d'échanger assez de protons et donc d'avoir des temps de saturation assez élevés (de l'ordre de la seconde). Il est à noter que, du fait des différences de concentration entre les deux molécules, la probabilité d'avoir un proton saturé revenant sur le métabolite (c'est-à-dire un proton du métabolite s'échangeant avec l'eau et re s'échangeant pour revenir sur le métabolite) est négligeable. Pour identifier les fréquences de résonance, plusieurs spectres sont réalisés en variant l'offset de l'impulsion de saturation, produisant un spectre-Z (Figure 18B). Sur ce spectre-Z, dont le zéro correspond à la fréquence de résonance de l'eau, nous pouvons remarquer la saturation directe de l'eau mise en évidence par l'absence de signal à une fréquence de 0 ppm. La perte de signal à 3,5 ppm est

⁵ Je fais référence ici au réseau mafieux qui exportait l'héroïne depuis Marseille vers les Etats-Unis au milieu des années 1900. Dans le groupe de R. Gilbert, il y avait un postdoctorant qui avait fait sa thèse à Marseille à la même époque que moi... le monde est petit !

⁶ Un des regrets de Philip Kuchel est que cet article n'ai pas été cité par la littérature de l'IRM CEST bien qu'antérieur au développement de ce contraste (antériorité reconnue par Bar-Shir A. et al. dans ACS Chem. Biol., 2015, 10, 1160).

caractéristique de l'échange des protons de métabolite (probablement de fonctions amides dans cet exemple) avec l'eau. Pour quantifier l'effet CEST, la méthode de référence, basée sur l'asymétrie, considère l'absence d'effets d'échanges pour les offsets négatifs ; en d'autres termes, pour les offsets négatifs, seule la saturation directe de l'eau est observée. Ainsi, pour isoler la participation de l'échange chimique à cette diminution du signal, il suffit de soustraire le signal RMN d'un offset négatif au signal RMN du même offset mais positif (Figure 18C). D'un point de vue mathématique, cela s'exprime par la formule suivante :

$$MTR_{asym}(\Delta\omega) = \frac{S(-\Delta\omega) - S(\Delta\omega)}{S_0} \quad (2)$$

avec $MTR_{asym}(\Delta\omega)$ l'asymétrie à un offset de $\Delta\omega$ par rapport à la fréquence de résonance de l'eau, $S(\Delta\omega)$ et $S(-\Delta\omega)$ l'intensité du signal de l'eau lorsque l'impulsion de saturation est appliquée à un offset de $\Delta\omega$ et $-\Delta\omega$ respectivement par rapport à la fréquence de l'eau et S_0 l'intensité du signal de l'eau lorsque l'impulsion de saturation est réalisée à un offset pour lequel il n'y a pas d'échange (en pratique, à un offset très élevé).

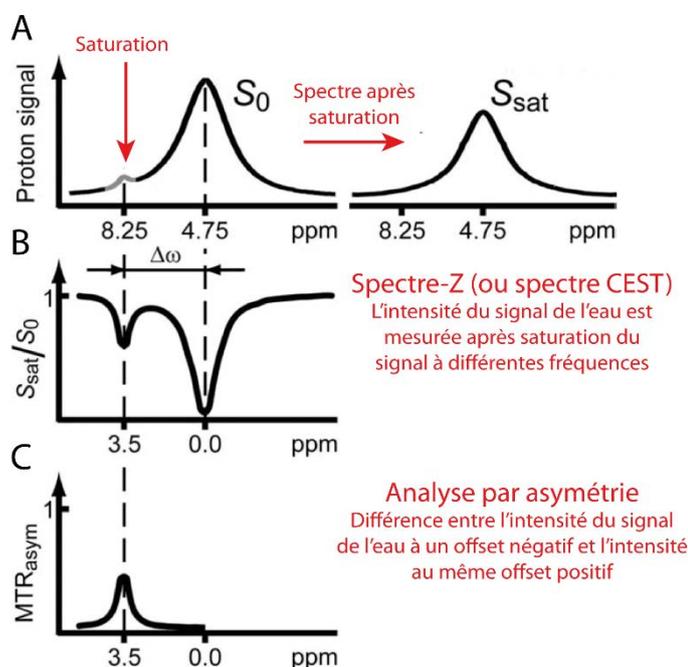


Figure 18 : Illustration du principe du CEST. (A) Spectre RMN théorique (gauche) avant et (droite) après saturation à 8,25 ppm. (B) En mesurant l'intensité du signal de l'eau lorsque la saturation est réalisée à plusieurs offsets, le spectre-Z est enregistré. (C) Celui-ci peut être analysé par asymétrie pour quantifier l'échange chimique. Figure adaptée de [95].

Après avoir réalisé la pondération du signal par l'effet CEST à différentes fréquences puis l'analyse pixel par pixel de la variation du signal, l'image contrastée CEST est obtenue. Il est à noter que le contraste CEST est très sensible à la fréquence de résonance des molécules d'eau (pour rappel, en IRM nous parlons ici du B_0 local). Or, en IRM, la variation de cette fréquence est de l'ordre de quelques dixièmes de ppm. Aussi, avant toute expérience CEST, une carte B_0 est enregistrée. Classiquement, cette carte est générée avec une méthode identique au CEST mais avec des conditions expérimentales choisies pour ne saturer que les molécules d'eau, c'est l'imagerie WASSR ('water saturation shift referencing') [99]. Le spectre Z enregistré par WASSR permet d'avoir l'enveloppe de la saturation directe de l'eau, enveloppe symétrique par rapport à la fréquence de résonance de l'eau. La recherche de la fréquence pour laquelle un

maximum de symétrie de cette enveloppe est obtenu permet de mesurer le décalage local du B_0 . Une riche littérature existe sur l'optimisation de la saturation (par exemple [100-102]). L'analyse des données est le second point délicat dans le contraste CEST. En effet, l'analyse proposée dans la Figure 18C repose sur le fait que seule la saturation directe de l'eau existe pour des offsets négatifs. Or, *in vivo*, ceci n'est pas le cas avec notamment des échanges dus à des phénomènes de type NOE ('*nuclear overhauser effect*') dus aux macromolécules apparaissant à des offsets d'environ -3 ppm. Les différents phénomènes de transfert d'aimantation qui vont compliquer l'analyse CEST ont été décrits dans [103]. Avec toutes les connaissances acquises sur le CEST lors de ces quinze dernières années, il est intéressant de re-analyser les premiers papiers. Ainsi, en 2003 Zhou et al. [91] ont publié un article dans lequel ils mesuraient le pH *in vivo* à partir de l'effet CEST des fonctions amides qui ont un décalage d'environ 3,5 ppm par rapport à la fréquence de résonance de l'eau. Dans les images présentées de l'analyse par asymétrie de l'effet CEST, des valeurs négatives dans la zone de la lésion sont obtenues. Il paraît évident aujourd'hui que ces valeurs négatives sont dues au fait que l'hypothèse de départ pour analyser par asymétrie les spectres Z, à savoir l'absence d'effets d'échanges pour des offsets négatifs, n'est pas vérifiée et que les effets NOE jouaient un rôle important dans ces mesures. Pour s'affranchir de cet effet NOE, différentes méthodes ont été proposées pour soit modéliser le signal CEST [104; 105] soit déterminer l'intensité du signal si seule la saturation directe de l'eau était présente [106; 107].

Après ces présentations rapides à la fois du glucose et de la technique CEST, je vais présenter ci-dessous mes travaux combinant ces deux thématiques que ce soit *in vitro* ou *in vivo*.

2.3.2. DIGESTION *IN VITRO* DE L'AMIDON

Sans le savoir, lorsqu'à l'hiver 2007 (donc en juin-juillet puisque j'étais dans l'hémisphère sud !) j'ai commencé à travailler sur l'amidon et sa digestion, je faisais mes premières armes sur la RMN appliquée au domaine agroalimentaire, un champ de recherche parfait pour l'INRA.

L'amidon est un polymère complexe de glucose synthétisé par de nombreuses plantes dont les céréales (blé, maïs, ...) et les tubercules (pomme de terre, manioc) et consommé par les animaux (au sens large !). Dans l'alimentation humaine, l'amidon étant le constituant principal du blé (élément de base dans la fabrication du pain et des pâtes), du riz ou des pommes de terre, il en est une des sources énergétiques principales. Pour pouvoir transformer l'amidon en énergie, il est indispensable de « casser » le polymère pour obtenir des sucres assimilables par l'organisme. C'est le travail de la digestion. Les produits transformés contenant de l'amidon sont en général appelés sucres lents pour leur propriété à libérer progressivement les sucres assimilables par l'organisme ; ce sont les fameux sucres recherchés par les sportifs. Il est intéressant de noter que, principalement dans les pays anglo-saxons, un indice glycémique (GI, '*glycaemic index*') est utilisé pour définir « la vitesse de libération » du glucose dans l'organisme. Pour cela, le taux de sucre dans le sang est mesuré en fonction du temps après ingestion d'un produit. Plus le produit a un GI faible, plus la libération des sucres est lente. Ainsi, le muesli ou le riz auront un GI relativement faible comparé à une barre chocolatée. Cet indice a été proposé par Jenkins et al. [108; 109] et développé par Brand Miller [110] qui travaillait dans le même département que celui auquel j'appartenais à l'Université de Sydney. Aujourd'hui, les aspects économiques et commerciaux de cet indice ont, à mon avis, dépassé le

simple cadre d'un index scientifique ayant ses qualités et ses défauts⁷. Plutôt que de parler de l'amidon, il serait donc plus correct d'évoquer LES amidons, tant les propriétés physico-chimiques que digestives sont différentes en fonction de leur provenance. Les amidons sont donc constitués d'amylopectine et d'amylose en différentes proportions. Les amidons possèdent une organisation multidimensionnelle qui rend la molécule plus ou moins accessible à l'hydratation et aux enzymes, le point clef de nos études. Dans cette partie, je ne présenterai que le travail effectué sur la digestion de l'amidon par RMN CEST (**P15**).

Le spectre-Z du glucose est représenté sur la Figure 19 en noir. La comparaison avec la solution tampon (en bleu sur la Figure 19) démontre bien que les atténuations du signal de l'eau observées aux offsets d'environ 500, 900 et 1100 Hz sont dues aux protons échangeables des fonctions hydroxyles du glucose. En suivant l'évolution de l'intensité des signaux à 900 et 1100 Hz, il est facile d'attribuer le signal CEST à l'un des deux anomères du glucose. De plus, nous pouvons noter que ces deux signaux n'existent pas dans l'échantillon d'amidon dû à sa forme polymérique. Suivre l'apparition de ces signaux par RMN CEST permettra donc de pouvoir caractériser la digestion de l'amidon.

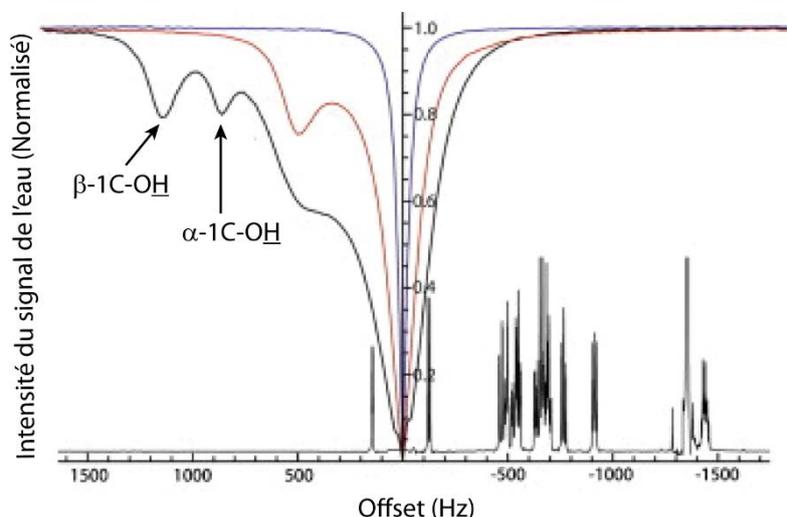


Figure 19 : Spectre-Z réalisé à 37 °C (bleu) d'un tampon acétate à 2 mmol.L⁻¹, (rouge) d'amidon de riz (concentration équivalente en glucose 100 mmol.L⁻¹) autoclavé avec un tampon d'acétate et (noir) de 100 mmol.L⁻¹ de glucose en solution dans le tampon acétate. Le spectre RMN du glucose est superposé le long de l'axe des offsets. Figure adaptée de **P15**.

Après calibration de l'effet CEST pour prendre en compte la saturation partielle du signal, il est possible de remonter à la concentration de chacun des anomères. Pour obtenir une résolution temporelle suffisante, seuls quelques points dans le spectre-Z sont enregistrés aux offsets de choix. Nous exploitons ici le fait de travailler dans des conditions que je pourrais qualifier de « haute-résolution spectroscopique » : avec un tube RMN, une sonde RMN haute résolution et en spectroscopie, des conditions permettant de s'affranchir de variations de B_0 . Pour valider cette approche, nous avons mesuré la constante de mutarotation du glucose en régressant les données expérimentales avec le modèle adéquat (Figure 20). Les constantes mesurées sont de $(1,58 \pm 0,12) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ pour la conversion du α - en β -glucose et $(2,76 \pm 0,16) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ pour la constante inverse. Ces valeurs sont à comparer avec celles que nous avons mesurées par CPMG (**P11**) et qui étaient de $1,44 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ et $2,55 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, soit comparable.

⁷ Voir par exemple : <https://www.gisymbol.com/gi-symbol-program/> ou <http://www.glycemicindex.com/index.php>

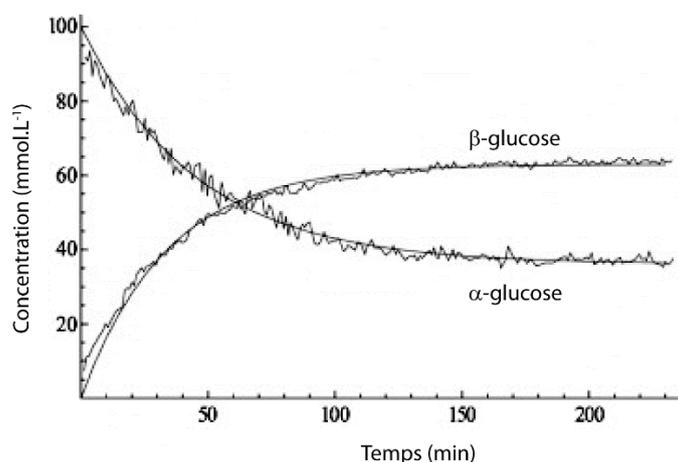


Figure 20 : Evolution de la concentration d' α - et β -glucose en fonction du temps tel que mesuré par RMN CEST. La régression des données a été effectuée avec le système d'équation approprié. Figure adaptée de **P15**.

L'approche CEST étant validée, la seconde partie du travail a consisté à étudier la digestion de l'amidon par une enzyme pour produire de plus petites unités. Pour illustrer l'évolution du spectre-Z, nous avons réalisé différents mélanges dont la concentration totale en glucose était constante mais dont la proportion entre glucose libre et piégé dans le polymère variait (Figure 21A – pour rappel lors du suivi cinétique, seule quelques fréquences du spectre-Z sont enregistrées). Cette Figure illustre parfaitement l'évolution que nous souhaitons mesurer. Comme précédemment, l'intensité de l'effet CEST a été convertie en concentration. La Figure 21B illustre la superposition parfaite des données expérimentales entre la méthode CPMG que nous avons précédemment développée (**P11**) et la méthode CEST présentée. En utilisant un modèle approprié basé sur les équations de Michaelis-Menten, les constantes cinétiques ont été déterminées et sont évidemment identiques entre les deux méthodes.

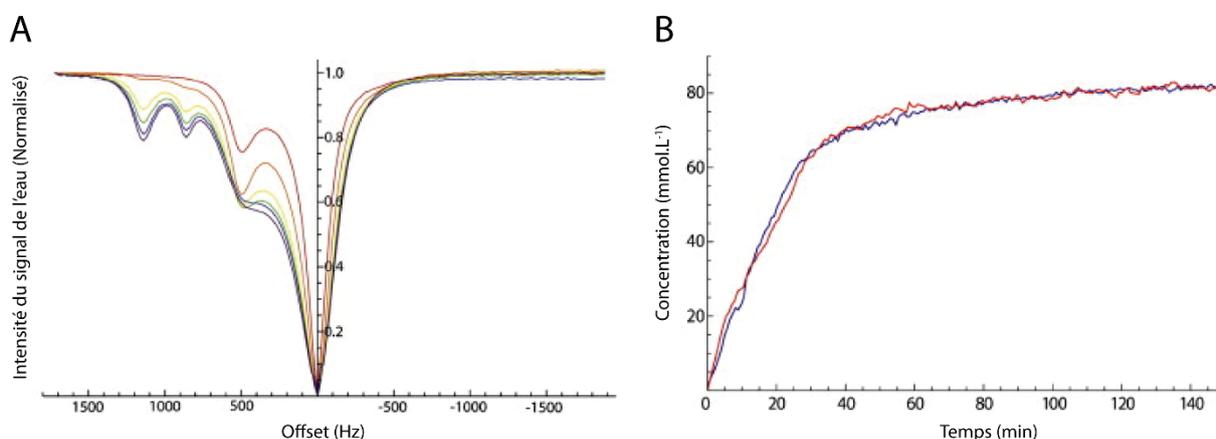


Figure 21 : (A) Pour illustrer l'effet de la digestion sur le spectre-Z, différents tubes ont été préparés contenant chacun une concentration équivalente de 100 mmol.L^{-1} de glucose dans un tampon acétate. Les concentrations en glucose libre sont de (rouge) 0, (orange) 10, (jaune) 40, (vert) 60, (bleu) 90 et (violet) 100 mmol.L^{-1} ; le complément pour atteindre la concentration finale est obtenu en ajoutant de l'amidon autoclavé. (B) Suivi cinétique de la digestion de l'amidon par la glucoamylase obtenue par RMN (bleu) CPMG et (rouge) CEST. Figure adaptée de **P15**.

Ce travail est malheureusement relativement peu cité. Une des raisons possibles est que ce contraste CEST n'est pas (ou peu) utilisé dans les sciences de l'aliment (voir section 3) ; une autre raison peut résider dans le « cloisonnement » qu'il existe entre la RMN et l'IRM⁸. Le

⁸ J'utilise volontairement le terme de RMN et non de SRM car, les scientifiques faisant de la spectroscopie RMN haute-résolution parlent de RMN et non de SRM (ce dernier terme étant plutôt utilisé pour différencier la spectroscopie de l'imagerie *in vivo*).

travail de caractérisation et de quantification que nous avons réalisé sur la digestion *in vitro* de l'amidon à l'aide d'une séquence de type CPMG (**P11** et **P16**) est correctement reconnu dans la communauté étudiant la digestion de l'amidon. Enfin, la revue de littérature écrite sur les modèles cinétiques utilisés pour caractériser la digestion de l'amidon est très bien citée (**P13** ; 141 citations au 22 janvier 2019 d'après 'Web of Science').

2.3.3. METABOLISME ENERGETIQUE *IN VIVO*

Lors de mon arrivée à Singapour, un an après avoir quitté l'Université de Sydney, j'ai eu l'opportunité de me greffer à un projet qui avait pour but d'imager le métabolisme énergétique dans le cerveau d'un animal modèle par IRM CEST. J'ai apporté à ce projet mon expertise tant sur la partie CEST (voir l'expérience décrite ci-dessus) que sur la caractérisation du métabolisme énergétique par RMN du ^{31}P (voir section 2.2.3).

Nous avons vu dans les chapitres précédents l'importance du glucose dans le métabolisme énergétique ainsi que sa détection par RMN à l'aide de la technique CEST. Le cerveau, pour faire fonctionner les neurones, consomme énormément de glucose⁹ (et de dioxygène... comme détecté par IRM BOLD). Les cycles métaboliques mis en jeu dans la conversion du glucose en énergie sont extrêmement rapides : après avoir franchi la membrane cellulaire grâce à des transporteurs, le glucose est converti en glucose-6-phosphate qui est ensuite métabolisé par la voie des pentoses phosphates. Le glucose, comme ses analogues, ne s'accumule pas dans la cellule et il est donc difficile de détecter sa consommation. Cependant, le 2-déoxyglucose (2DG) va pénétrer dans les cellules en utilisant les mêmes transporteurs que ceux du glucose puis sera métabolisé en 2-déoxyglucose-6-phosphate (2DG-6P). A cause de l'absence d'une fonction hydroxyle, ce métabolite s'accumulera dans les cellules car il ne pourra pas être converti par la gluco-6-phosphate déshydrogénase et donc rentrer dans le cycle des pentoses phosphates [111]. Cet analogue phosphaté du glucose en fait donc un bon candidat pour imager le métabolisme énergétique dans le cerveau grâce à son accumulation dans les cellules.

Pour démontrer qu'il est possible d'imager le métabolisme énergétique dans le cerveau en suivant les échanges des fonctions hydroxyles du 2DG (et par extrapolation du glucose), nous avons administré différentes concentrations de 2DG à des rats. L'asymétrie du spectre-Z est mesurée à $1,00 \pm 0,25$ ppm, fréquence caractéristique de l'échange de ces fonctions. Cette approche a été nommée GlucoCEST, faisant ainsi référence au métabolite mesuré, le glucose, et à la méthode. Les images de la Figure 22A démontrent que le métabolisme cérébral est bien détecté par GlucoCEST et que son effet est quantitatif puisque l'effet CEST détecté est plus important lorsque la quantité de 2DG injectée est plus élevée. Les résultats obtenus en GlucoCEST sont confirmés par la détection et la quantification du 2DG-6P par SRM du ^{31}P (Figure 22B) ainsi que par le suivi de la concentration de glucose dans le sang. Pour démontrer que le GlucoCEST reflète bien l'activité cérébrale de l'animal, le niveau de conscience de l'animal est modulé en jouant sur la quantité d'anesthésiant respiré (anesthésie à l'isoflurane). Nous avons montré que plus le niveau d'anesthésie était élevé, plus l'effet CEST détecté était faible. Pour s'assurer que cette diminution était due à une plus faible consommation de 2DG, il était indispensable d'exclure une acidification et une perfusion sanguine plus élevée induite par l'anesthésiant. L'hypercapnie (augmentation de la pression partielle en CO_2 dans le sang en faisant respirer un mélange contenant une faible quantité de CO_2 à l'animal) augmente la perfusion sanguine. Les images glucoCEST ne montrent pas de différence significative lorsque

⁹ Le cerveau représente environ 20% de la consommation totale de glucose par l'organisme alors qu'il ne représente que 2% de sa masse !

l'animal est dans des conditions de normoxie (concentrations normales en dioxygène) ou d'hypercapnie. L'ensemble des données (GlucoCEST, spectroscopie du ^{31}P ou suivi de la concentration du glucose dans le sang) nous permet de conclure que le GlucoCEST permet d'imager le métabolisme énergétique cérébral.

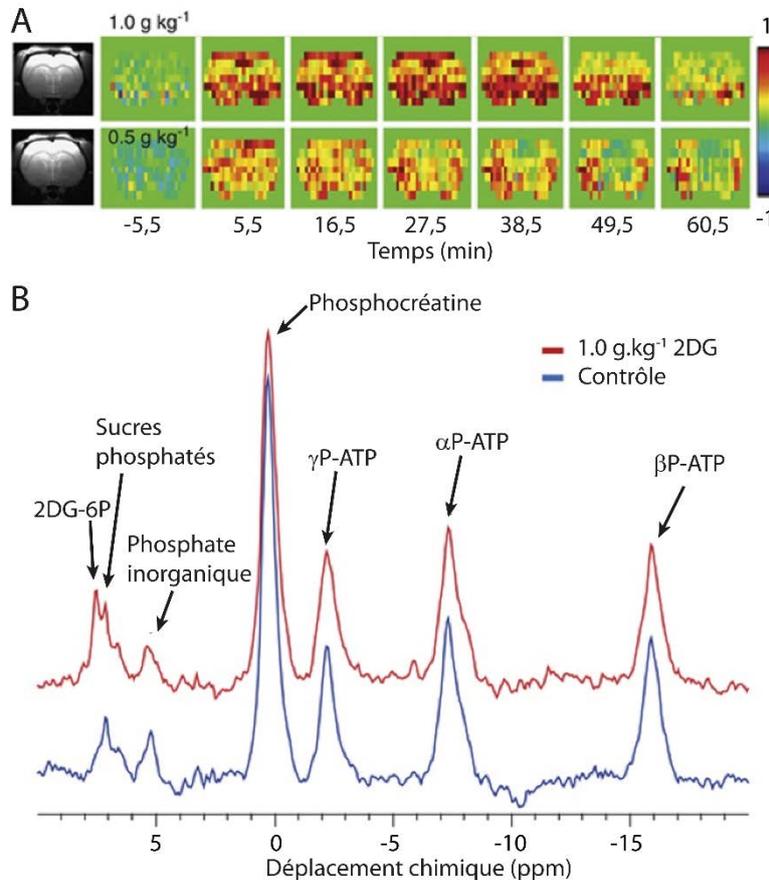


Figure 22 : (A) Images GlucoCEST d'une coupe du cerveau d'un rat en fonction du temps suivant l'injection de 2DG (quantité injectée spécifiée en haut de la série d'images). L'image anatomique est représentée en niveaux de gris sur la gauche. (B) Spectre du ^{31}P enregistré (bleu) sans et (rouge) 38 minutes après l'injection de 1,0 g.kg⁻¹ de 2DG et réalisé sur l'ensemble du cerveau. Le signal du 2DG-6P n'est présent que lorsque le 2DG est injecté. Figure adaptée de P26.

Imager le glucose est intéressant pour étudier à la fois le métabolisme cérébral mais également le métabolisme de tumeurs cancéreuses puisque celles-ci consomment beaucoup plus de glucose que des cellules saines (phénomène connu sous le nom d'effet Warburg). Certes l'imagerie CEST proposée avec le 2DG est une première étape mais le Graal serait de proposer une imagerie métabolique directement basée sur le glucose. La difficulté ici est que le CEST permet de détecter des variations de concentration par rapport à un état basal et que le glucose, étant très rapidement métabolisé par les cellules, ne s'accumule pas dans l'organisme (voir aussi page 41). Lors de ces travaux avec le 2DG, nous avons également démontré qu'il était possible d'imager directement le glucose à condition que celui-ci soit perfusé lors d'un suivi temporel. Cette perfusion permet d'atteindre un état stationnaire de concentration du sucre plus élevé que dans l'état basal. La Figure 23 montre les images GlucoCEST obtenues lorsque le D-glucose est perfusé en continu (haut), injecté en une seule dose (milieu) ou lorsque le L-glucose, isomère non métabolisé, est injecté (bas). Le glucose étant métabolisé très rapidement, une seule image CEST peut être obtenue après l'injection de cette molécule. En revanche, le contraste CEST est présent en continu lorsque le glucose est perfusé mais disparaît rapidement après arrêt de la perfusion.

Ces premiers résultats sont très encourageants mais posent des questions éthiques. En effet, la préparation de l'animal est lourde avec la pose d'un cathéter dans la veine pour injecter les différents produits et éventuellement la pose d'un cathéter artériel pour mesurer les différents paramètres physiologiques du sang. Ce dernier geste chirurgical signifie que l'expérience sera terminale. De plus, pour assurer l'immobilité de l'animal avec des taux d'anesthésie relativement bas (1 à 2% d'isoflurane), un relaxant musculaire est administré à l'animal entraînant alors la nécessité d'une intubation pour assurer une respiration artificielle. La mise en œuvre pratique d'une telle expérimentation est donc complexe et doit pouvoir être fortement justifiée pour être acceptée par les comités d'éthique.

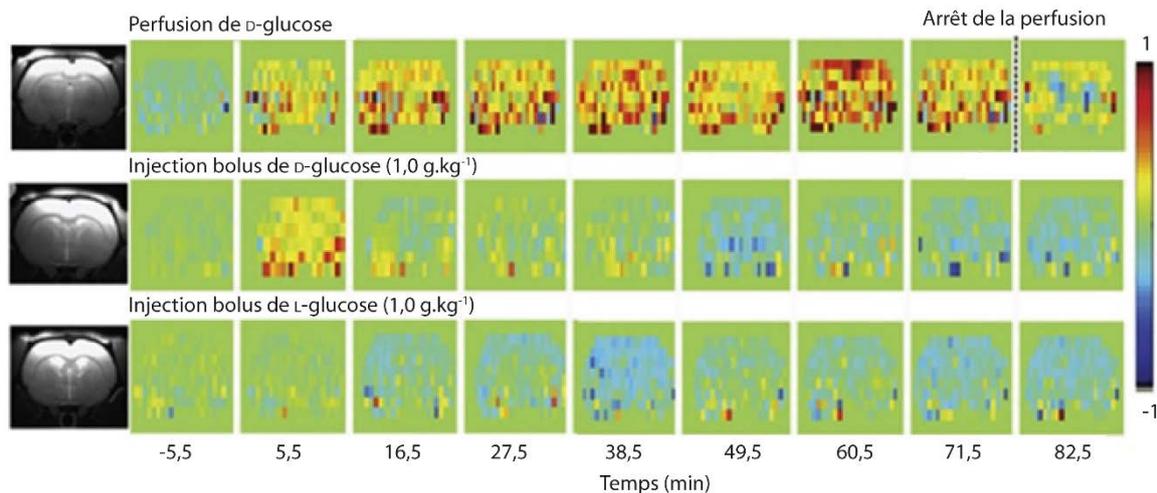


Figure 23 : Images GlucoCEST d'une coupe de cerveau de rat en fonction du temps, lorsque le D-glucose est (haut) perfusé dans l'animal, (milieu) injecté en une fois ou lorsque le L-glucose est injecté. Figure adaptée de P26.

Ce travail faisait partie des « sujets chauds » en IRM à cette époque comme le montre les trois publications suivantes sorties à la même époque que ce travail [112-114]. Cet article est bien cité dans les travaux *in vivo* d'IRM CEST ; il est connu dans sa communauté de référence.

2.3.4. LE PLEIN D'ÉNERGIE

Une erreur fréquemment commise est de présenter le CEST comme un contraste dépendant d'un métabolite alors qu'il n'est caractéristique que d'une fonction chimique. Il peut donc être indispensable de démontrer la spécificité de l'effet CEST avant une interprétation des résultats expérimentaux. De plus, le contraste CEST peut être classifié dans la famille plus large des contrastes par transfert d'aimantation. Comme décrit, ces transferts peuvent venir complexifier le spectre Z. Pour pouvoir extraire les informations liées à l'échange chimique, il peut alors être indispensable de passer par une étape de modélisation.

Mes premiers pas dans le contraste par CEST ont été réalisés sur une thématique de nutrition avec un modèle simple, le but n'étant pas d'attaquer directement la digestion. J'ai aussi mis mon expérience au profit de recherche *in vivo* chez l'animal modèle pour réaliser une preuve de concept. Avec mon profil de « spectroscopiste », j'ai fait mes premiers pas dans l'imagerie. J'ai d'ailleurs toujours été surpris comme ces deux communautés n'échangent que très peu dans des congrès scientifiques. En plus de pouvoir valoriser cette double casquette, ce travail sur le glucose m'a permis d'aborder des thématiques de recherche de mon (futur) institut de recherche ainsi que de me familiariser avec les expériences *in vivo* et ses contraintes, travail indispensable d'un ingénieur sur une plateforme IRM... même à l'INRA.

En tant qu'ingénieur de recherche sur une plateforme analytique, je compte mettre en place les outils nécessaires pour enregistrer, traiter et analyser les images contrastées en CEST. Ainsi, je

pourrais appliquer ce contraste aussi bien sur des thématiques agroalimentaires (digestion de l'amidon par exemple) que médicales (modèle de tumeurs cancéreuses dans un premier temps).

2.4. QUANTIFICATION EN RMN HYPERPOLARISÉE

Lorsque j'ai accepté le poste proposé au 'Singapore BioImaging Consortium', les arguments dans la balance étaient (1) de retravailler avec Philip Kuchel (qui venait de prendre la direction de l'institut) et de m'occuper de l'équipe, (2) un salaire confortable, (3) repartir vers de nouveaux horizons (un argument surtout soutenu par ma future femme) et (4) d'avoir accès à un HyperSense, le seul hyperpolariseur commercial disponible à quelques dizaines d'exemplaires à travers le monde. Enthousiasmé par les possibilités offertes par cet équipement (je ne devais avoir que trop peu conscience des limitations !) et les études qui pourraient être réalisées, j'ai accepté cette offre. Le reste de l'aventure sera plus compliqué que prévu, principalement dû à cet hyperpolariseur et aux enjeux politiques qui existaient à l'époque. Philip Kuchel jettera l'éponge 18 mois après mon arrivée tandis que je resterai jusqu'à la fin de mon engagement de 3 ans mais avec un accès plus que limité à cet équipement dans la seconde moitié de mon contrat. Avec le recul et la valorisation que nous avons pu faire de ces années à Singapour, nous avons été tout de même particulièrement productifs dans le domaine de l'hyperpolarisation avec 5 articles (**P21, P25, P29, P33 & P35**) entre méthodologie pour analyser des données acquises avec une molécule hyperpolarisée et études biochimiques sur les érythrocytes.

Tandis que la RMN possède des avantages uniques comme le fait de ne pas abimer l'objet étudié, de donner des informations structurales ou d'être quantitative, elle possède un inconvénient majeur : sa très faible sensibilité. Développer une méthode permettant d'augmenter la sensibilité est donc d'un intérêt particulier. Dès la première moitié des années 1950, Overhauser démontra théoriquement qu'il était possible d'augmenter l'aimantation d'un noyau dans un métal en utilisant la polarisation plus forte de l'électron [115] ; ce principe est celui de l'hyperpolarisation. La démonstration expérimentale du concept d'hyperpolarisation eut lieu 3 ans après [116]. Une des premières revues de littérature sur la 'dynamic nuclear polarization' (DNP) a été écrite par Abragam et Goldman [117]. La Figure 24 illustre le taux de polarisation de l'électron et du proton (qui a le rapport gyromagnétique le plus élevé, donc le taux de polarisation le plus important de tous les noyaux !) en fonction de la température. Le principe de la DNP est d'avoir la polarisation la plus élevée possible pour l'électron en se plaçant à très basse température (soit une polarisation quasiment totale aux alentours de 1 K) puis de transférer cette polarisation vers les noyaux qui sont plus faiblement polarisés. Une fois cette hyperpolarisation réalisée, il « suffit » de faire de la RMN sur l'échantillon. A cette époque et jusqu'au début des années 2000, bien que le concept ait été prouvé, il n'était pas possible d'hyperpolariser une solution puis de l'injecter *in vivo* jusqu'à l'avènement de l'HyperSense. Il existe différents types de DNP : la DNP à l'état solide, par dissolution, induit chimiquement par un photon, à l'aide d'un para-hydrogène, par pompage optique... Dans le cadre de cette présentation, je ne discuterai que de la DNP par dissolution.

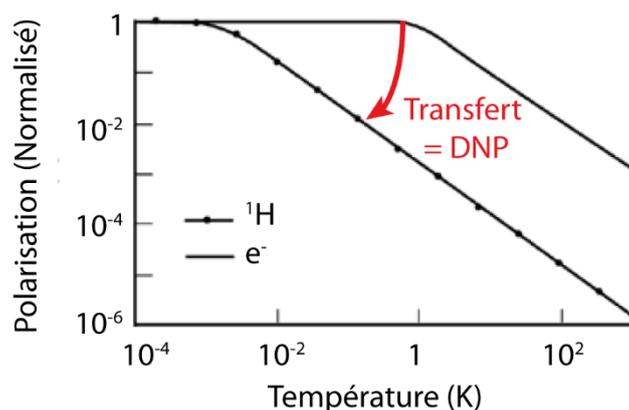


Figure 24 : Aimantation théorique d'un électron et d'un proton dans un champ magnétique de 3,35 T. Le principe de la DNP est de transférer de la polarisation depuis l'électron vers le proton (flèche rouge). Figure adaptée de [118].

Bien que tous les concepts de la DNP aient été connus depuis la fin des années 50, le développement de la DNP par dissolution a commencé lorsque Ardenkjær-Larsen et al. proposèrent un instrument capable de réaliser l'hyperpolarisation à faible température puis de ramener en quelques secondes l'échantillon à température ambiante pour être injecté dans un animal [119]. Le signal RMN était augmenté d'un facteur 10 000 ! Brièvement et dans le cadre d'une hyperpolarisation pour faire de la spectroscopie du ¹³C, un échantillon contenant une molécule marquée au ¹³C en forte concentration est mélangé avec un radical (la source d'électrons) et éventuellement un agent relaxant. Cette solution est introduite au centre d'un aimant (le champ magnétique de l'HyperSense, la version commerciale de cet instrument est de 3,35 T) et refroidie à environ 1,4 K grâce à de l'hélium liquide et une diminution de la pression. Lorsque l'échantillon est conditionné, une excitation micro-ondes est réalisée (fréquence de l'ordre de 94,9 GHz pour un champ magnétique de 3,35 T) pour transférer la polarisation de l'électron vers les noyaux. Il est à noter que ce transfert est réalisé vers tous les noyaux présents dans l'échantillon. Après un certain temps (l'augmentation du signal RMN peut être suivie à l'aide d'impulsions RF de faibles angles), une solution chaude et sous pression (une solution aqueuse sera à 10 bars et 180 °C) est injectée dans notre échantillon pour le rendre liquide et pouvoir l'injecter dans un spectromètre RMN.

La DNP par dissolution a été immédiatement pensée, développée et commercialisée (par Oxford Instruments puis General Electric) pour des applications (pré)cliniques : un métabolite d'intérêt marqué au ¹³C est hyperpolarisé puis injecté *in vivo*. De l'imagerie spectroscopique rapide est réalisée pour suivre la conversion de ce métabolite et détecter des différences de métabolismes entre une région saine et une région lésée. Par exemple, le pyruvate sera un excellent marqueur car il est au centre de plusieurs voies métaboliques dont celle produisant du lactate en utilisant la lactate déshydrogénase (LDH). En effet, c'est par cette voie que les tumeurs cancéreuses produisent plus de lactate que des cellules saines (effet Warburg) [120]. Le fumarate hyperpolarisé et sa vitesse de conversion en malate en font un marqueur de la nécrose cellulaire [121] ; l'acide ascorbique (vitamine C) hyperpolarisé va permettre de déterminer le statut oxydatif de la cellule [122] tandis que le glutamate hyperpolarisé pourrait devenir un marqueur des maladies neurodégénératives [123]. Pour une liste plus exhaustive des différents marqueurs et de leur intérêt, je renvoie aux références [124; 125].

De par le choix (notamment) du fabricant de concentrer ses efforts vers la communauté des expérimentateurs *in vivo* et d'arrêter tout développement sur l'HyperSense (le groupe travaillant sur cet instrument à Oxford Instruments a été dissout quasiment simultanément avec sa commercialisation), peu d'efforts ont été réalisés pour améliorer le système ou travailler avec

un noyau différent du ^{13}C . Dans les premiers temps, Oxford Instruments a travaillé sur un système permettant de suivre d'autres noyaux que le ^{13}C dans l'HyperSense [126]; malheureusement, il n'a jamais été commercialisé. Quelques rares exemples d'hyperpolarisation d'un noyau différent du ^{13}C existent avec un HyperSense, notamment le yttrium (^{89}Y) [127], les deux isotopes de l'argent (^{107}Ag & ^{109}Ag) [128] et l'azote (^{15}N) [129]. Les principaux travaux ont consisté à optimiser la formulation de l'échantillon dans le but d'augmenter l'efficacité de l'hyperpolarisation, en jouant en particulier sur le radical ou le mélange de solvants utilisés, la présence ou pas de ^1H ou la nature de l'agent de relaxation, par exemple [130-133].

Quelques équipes de recherche ont travaillé sur des améliorations matérielles et conceptuelles de la DNP par dissolution. Ces travaux ont été résumés dans les revues [134; 135] et je propose de détailler ci-dessous trois de ces améliorations que je prévois de mettre en œuvre dans mon projet de recherche. Comme nous l'avons vu précédemment, le transfert de polarisation se fait entre les électrons et l'ensemble des noyaux présents dans l'échantillon, dont les ^1H . La première amélioration consiste donc à transférer l'aimantation des ^1H , plus élevée, vers celle des ^{13}C durant le processus d'hyperpolarisation. Il s'agit là d'une technique classique en RMN du solide connue sous le nom de polarisation croisée (CP, '*cross polarization*'). Réaliser la CP lors de l'hyperpolarisation permet d'atteindre des niveaux de polarisation plus rapidement et d'avoir une formulation de l'échantillon moins onéreuse (changement du radical) [136; 137]. La deuxième amélioration consiste à contrôler l'intensité du champ magnétique au cours du processus de dissolution. En effet, la solution hyperpolarisée contient des molécules paramagnétiques (la source d'électrons) et il est connu que les mécanismes de relaxation de telles molécules sont particulièrement rapides à faible champ magnétique. Ainsi, pour limiter ces zones de faibles champs magnétiques, le transfert de la solution liquide entre l'hyperpolariseur et l'aimant sur lequel seront enregistrées les données est réalisé à l'intérieur d'un tunnel magnétique [138]. Enfin, comme la polarisation de l'échantillon relaxe dès que les micro-ondes sont éteintes, il est indispensable de commencer l'acquisition des données le plus rapidement et donc, dans le cadre d'expérimentations *in vivo*, d'injecter la solution le plus vite possible. Un système automatique d'injection rapide a été proposé par Cheng et al. [139].

Je me suis concentré ci-dessus sur la partie hyperpolarisation de l'expérience. La seconde moitié de l'expérience qui consiste à enregistrer le signal RMN n'est pas simple à mettre en œuvre, surtout sur l'aspect imagerie. En effet, il est nécessaire de développer des séquences d'imagerie métabolique rapides (pour une comparaison de quelques-unes, voir [140]). Ceci est un volet à part entière avec différentes stratégies qui ont été proposées mais pour lesquelles je ne rentrerai pas dans les détails ici.

En conclusion de cette partie introductive, comme l'écrit Arnaud Comment [141], toute nouvelle technologie entraîne deux vagues, la première d'optimisme et la seconde de scepticisme. Comme j'ai essayé de le montrer, la DNP par dissolution souffre d'une absence de transfert des améliorations technologiques vers les applications.

utilisées. Il est à noter que A et B sont produits à partir des populations hyperpolarisées en fonction de l'inverse de leur temps de relaxation T_1 .

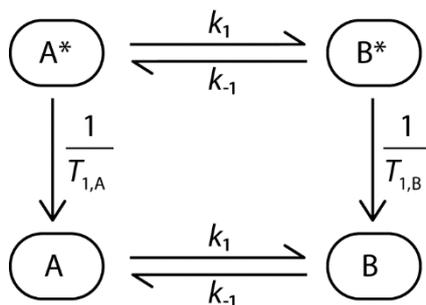


Figure 26 : Représentation d'un modèle cinétique simple qui doit être mis en œuvre pour mesurer les constantes lorsque les molécules sont hyperpolarisées. * dénote que la substance est hyperpolarisée. Figure adaptée de P25.

A partir de ce modèle, il est possible d'écrire un jeu d'équations différentielles représentant le système. Dans cet exemple simple, nous pouvons constater qu'il y a jusqu'à quatre paramètres à régresser (k_1 , k_{-1} , $T_{1,A}$ et $T_{1,B}$) plus l'angle d'impulsion RF. Avec des systèmes biologiques plus complexes, le nombre de paramètres à régresser peut devenir une limitation. A partir des équations différentielles, il faut définir une stratégie pour régresser les données. Nous avons choisi une approche de Monte-Carlo par chaînes de Markov (MCMC, 'Markov chain Monte Carlo'). Il est important d'insister que, pour simuler le signal RMN, il faut prendre en compte les impulsions de lecture qui font disparaître une partie de l'aimantation. D'un point de vue simulation, cela revient à calculer après chaque acquisition de signal l'aimantation qui reste disponible.

Ce travail de réflexion et d'analyse des contraintes dues à l'état excité d'un système hyperpolarisé a été mis en pratique pour analyser le métabolisme des érythrocytes.

2.4.2. QUANTIFICATION DE CINÉTIQUES *IN VITRO*

La conversion du pyruvate en lactate par la LDH est LA réaction biochimique de référence dans les études de DNP par dissolution. Le pyruvate présente des caractéristiques idéales pour l'hyperpolarisation (T_1 long, coût faible du produit marqué) et est un marqueur de l'effet Warburg des tumeurs. Cette réaction implique toutefois la présence d'un co-substrat qui est la forme réduite de la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH, NAD pour la forme oxydée). Cette réaction est donc limitée par quatre facteurs : (1) la quantité de LDH, (2) la concentration du co-substrat au début de la réaction, (3) la quantité de NADH puisqu'elle déterminera la quantité de pyruvate qui pourra être convertie et (4) la vitesse à laquelle le NADH est régénéré. Le premier facteur limitant est régulé génétiquement sur une échelle de temps bien plus longue que les 2-3 minutes d'un suivi par hyperpolarisation. En revanche, les trois autres facteurs sont déterminants et très souvent négligés dans les études de DNP par dissolution. C'est dans ce contexte que nous avons décidé d'étudier l'effet du co-substrat sur les cinétiques de conversion du pyruvate. Pour cela, nous avons travaillé avec des érythrocytes. Comme le NADH ne franchi pas la membrane cellulaire, celle-ci a été rompue (le terme est la lyse) pour ne travailler qu'avec des lysats. Nous avons toutefois pris soin de conserver le métabolisme de l'érythrocyte intact. Un suivi cinétique caractéristique est représenté sur la Figure 27A. Le signal du pyruvate et de sa forme hydratée ($\delta \sim 178$ ppm) diminue avec le temps à cause à la fois de la relaxation et de la conversion en lactate. Au début du suivi cinétique, la production de lactate augmente avant de décliner. Cette diminution est due à la « compétition » qui existe entre la production du produit (création du signal RMN) et la perte de signal à cause de la relaxation. L'évolution de l'intensité du signal RMN du lactate en fonction du temps et de la concentration en NADH est représentée

sur la Figure 27B. Il apparaît clairement qu'il n'existe pas une relation simple et directe entre la production de lactate et la concentration en NADH. Nous avons notamment remarqué que les expériences enregistrées à différents jours n'étaient pas comparables, la décroissance du signal étant plus rapides pour les expériences ayant des concentrations en NADH de 10, 20 et 30 mM. Comme il existe une « compétition » entre la perte du signal par relaxation et l'accumulation de lactate grâce à la production enzymatique, une analyse précise des données est indispensable.

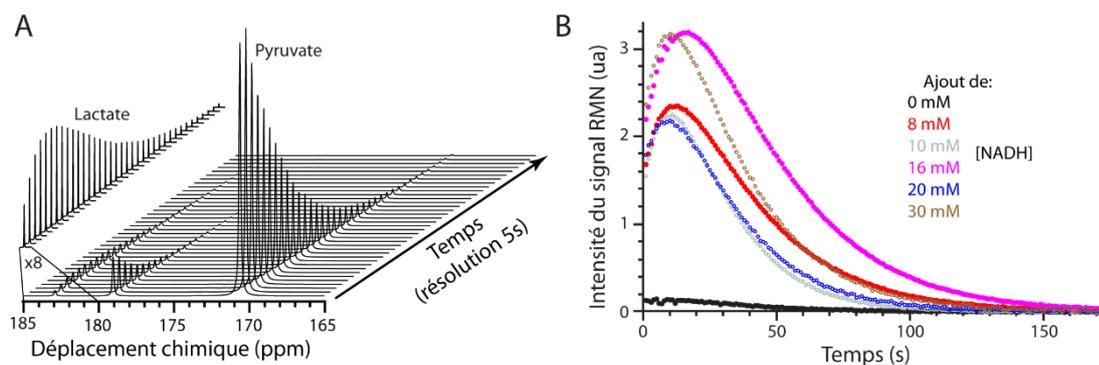


Figure 27 : Suivi cinétique en RMN du ¹³C de la production de lactate après ajout de pyruvate hyperpolarisé dans un lysat d'érythrocytes. (A) Spectres RMN en fonction du temps (30 mM NADH) et (B) évolution de l'intensité du signal RMN du lactate en fonction du temps et de la concentration en NADH lorsque 80 mM de pyruvate sont ajoutés au lysat. Figure adaptée de **P33**.

Pour prendre en compte l'ensemble du mécanisme réactionnel, un jeu de huit équations différentielles a été écrit puis analysé en utilisant une inférence Bayésienne, la méthode MCMC. Au final, ce sont huit paramètres qui ont été régressés : les temps de relaxation, les constantes d'échanges entre le pyruvate et sa forme hydratée, la concentration en LDH et les quantités initiales de pyruvate et de l'hydrate de pyruvate. Les concentrations en NADH/NAD étant connues (ajout d'une forte concentration), il n'était pas nécessaire de régresser ce paramètre. Les résultats obtenus avec un jeu de données sont illustrés sur la Figure 28. La qualité de la régression est excellente. Les résultats obtenus avec les différentes concentrations sont résumés dans le Tableau 2. La concentration de LDH varie entre 1,9 et 2,6 μM , soit une concentration inférieure à ce qui a été rapporté dans la littérature [142]. L'analyse du jeu de données ne contenant aucun NADH supplémentaire a été réalisée en prenant en compte trois concentrations de LDH comprises entre les valeurs déterminées précédemment. Pour chacun des cas, la concentration de NADH endogène a été trouvée supérieure à ce qui était reporté dans la littérature (entre 350 et 500 μM vs 140 μM). Ceci peut s'expliquer par la plus faible quantité de LDH que nous avons trouvée dans ces expériences.

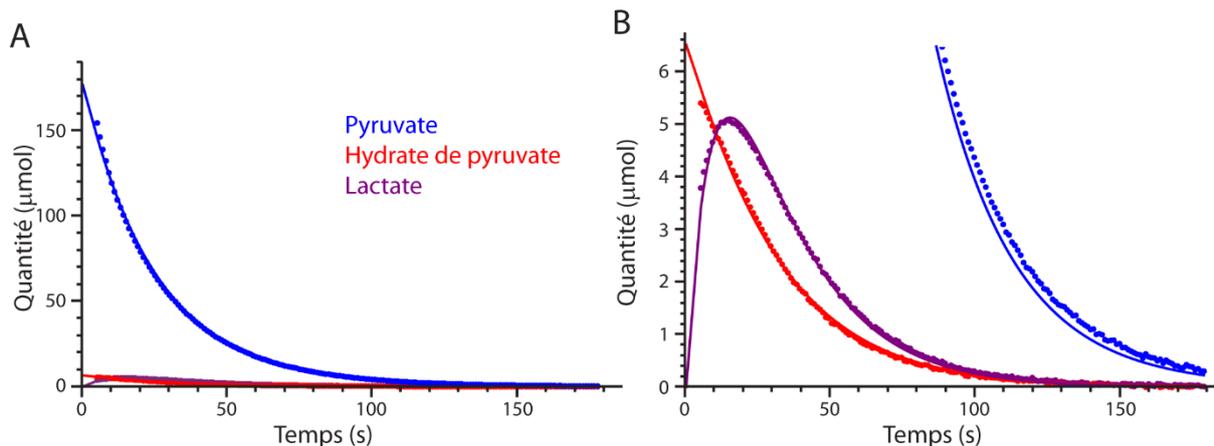


Figure 28 : Evolution de la concentration des différents métabolites après ajout de 80 mM de pyruvate hyperpolarisé dans un lysat d'érythrocytes (points). Les lignes représentent la meilleure régression des données avec un modèle complet. La partie (B) de la figure est un zoom sur l'axe y de (A). Figure adaptée de **P33**.

Tableau 2 : Estimation des différents paramètres du modèle permettant de régresser les données présentées sur la Figure 27.

	[NADH] (mM)				
	8	10	16	20	30
$T_{1,\text{pyruvate}}$ (s)	35,9±0,8	33,1±0,9	38,1±0,7	36,0±0,9	30,7±0,6
$T_{1,\text{hydrate de pyruvate}}$ (s)	39±3	29±2	35±2	21±2	28±1
$T_{1,\text{lactate}}$ (s)	21,3±0,4	11,1±0,2	21,8±0,3	8,6±0,2	13,4±0,2
k_1 (ms ⁻¹)	1,2±0,1	1,5±0,2	1,1±0,1	1,8±0,2	0,6±0,3
k_{-1} (ms ⁻¹)	24±2	24±3	21±2	21±2	9±6
[LDH] (µM)	1,99±0,08	2,61±0,04	1,91±0,02	2,31±0,04	2,47±0,04
Pyruvate à t=0 (µmol)	174±3	160±2	164±2	162±3	177±3
Hydrate de pyruvate à t=0 (µmol)	10,7±0,2	6,0±0,1	10,9±0,2	6,7±0,2	6,5±0,2

Dans ce travail, nous avons démontré l'importance de la prise en compte du co-substrat dans les interprétations des expériences d'hyperpolarisation s'intéressant à ce cycle métabolique. En effet, conclure qu'une différence de vitesse de production du métabolisme est uniquement due à une plus forte concentration d'enzyme peut-être incorrect si la concentration de co-substrat n'est pas équivalente.

2.4.3. COMMENT ESTIMER SIMPLEMENT ET FACILEMENT LES CONSTANTES CINÉTIQUES EN UTILISANT UN MODÈLE SIMPLIFIÉ

Dans le paragraphe 2.4.1, j'ai démontré la complexité de mettre au point un modèle mathématique, pertinent d'un point de vue biologique, permettant d'analyser les données issues d'expériences d'hyperpolarisation. Une telle approche est applicable sur des systèmes simples *in vitro* (paragraphe 2.4.2 ou transport transmembranaire de l'urée dans des érythrocytes dans **P29**) mais probablement impossible à mettre en œuvre sur des systèmes cellulaires plus complexes et/ou lors d'expérimentations *in vivo*. La majorité des études *in vivo* analysent leurs résultats en utilisant un modèle identique à celui présenté sur la Figure 26, sans toutefois prendre en compte la cinétique de conversion des espèces non-hyperpolarisées [143-145]. Même si le modèle est simple, cette approche demande de réaliser une régression des données impliquant la création d'un programme dédié, l'ajout de contraintes si nécessaire... A travailler avec un modèle (extrêmement) simplifié, ne serait-il pas possible d'avoir une méthode d'analyse des données également simple ? C'est la question à laquelle nous avons répondu dans **P35**.

Le modèle simplifié choisi est celui de la conversion unidirectionnelle d'un substrat en produit avec une vitesse de réaction k_1 , chacune des espèces relaxant avec un temps de relaxation spécifique. Sans refaire la démonstration mathématique de l'article à partir des équations différentielles décrivant le système réactionnel, la méthode proposée permet, à partir de l'évolution du signal au cours du temps, de déterminer rapidement à la fois T_1 , considéré identique pour le substrat et le produit, et k_1 sans avoir recours à des méthodes complexes d'analyse. La Figure 29 illustre les trois mesures graphiques nécessaires pour obtenir ces deux paramètres. Comme cette approche est basée sur la mesure de la largeur d'une évolution d'intensité de signal à une hauteur spécifique α , nous avons nommé cette méthode 'Fall minus Rise α ', FmR α .

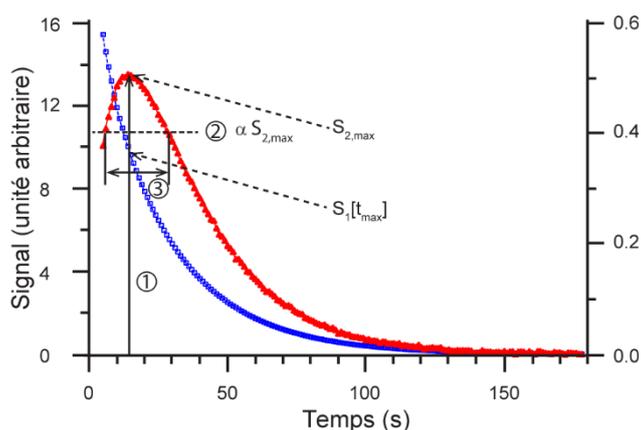


Figure 29 : Illustration de la méthode FmR α . A partir de trois mesures sur l'évolution temporelle des signaux RMN d'un substrat (S_1) et d'un produit (S_2), il est possible de déterminer T_1 et k_1 . Figure adaptée de **P35**.

Nous avons comparé les valeurs obtenues par la méthode FmR α avec des approches de régression classiques et les résultats sont similaires. Les deux critiques principales qui peuvent être adressées à cette approche résident dans (1) l'absence de prise en compte d'une fonction d'arrivée, principalement pour les expériences *in vivo* et (2) l'excellente résolution temporelle nécessaire pour déterminer le plus précisément possible ce maximum dans l'intensité du signal du produit. Il serait intéressant maintenant d'évaluer cette approche, ces forces et ces faiblesses, sur un nombre significatif de données expérimentales.

2.4.4. UNE RELAXATION RAPIDE

Arrivé dans un état excité à Singapour pour travailler sur l'hyperpolarisation, je suis revenu à un état d'équilibre (voire à un niveau inférieur !) en ayant un temps de relaxation de l'ordre du mois. J'ai ainsi pu mener des recherches expérimentales en hyperpolarisation pendant 12 mois environ. Même si cette échelle de temps ne pouvait être anticipée au début, il était impossible de monter un programme de recherche sur un modèle animal avec la culture du secret qui existait dans l'institut (cela allait jusqu'à ne pas se partager les configurations des sondes ^{13}C !). Ne pouvant clairement pas travailler sur des expériences *in vivo*, nous nous sommes concentrés sur la caractérisation de métabolismes et son analyse à l'aide de modèles aussi exhaustifs que possible. Le but de mes travaux a donc été de démontrer la difficulté d'analyser des données issues d'expériences d'hyperpolarisation pour en donner une analyse et une interprétation ayant une signification biologique. Mes contributions ont permis de mettre en évidence des hypothèses trop souvent ignorées lors d'études sur modèle murin. Il est à noter que, bien que peu citée, la méthode FmR α a été jugée comme l'une des plus performantes par Daniels et al.

dans leur article comparant les différentes stratégies pour analyser les données issues d'expériences de DNP par dissolution [146].

Le CHU de Clermont-Ferrand possédait un hyperpolarisateur, qui, dans le cadre de la structuration du site de recherche Clermontois, a été cédé à la plateforme AgroResonance. Au moment de la rédaction de ces lignes (avril 2019), sa réinstallation est en cours. Dans ce contexte, une partie de mon projet de recherche a été construit autour de cet appareil et de mes compétences avec pour ambition de rendre cet équipement plus versatile que ce qu'il ne l'est actuellement pour notamment, aborder des thématiques de mon institut de recherche.

2.5. SYNTHÈSE

Au cours de mes onze années de recherche avant mon recrutement à l'INRA, j'ai eu l'opportunité de réaliser quatre contrats à durée déterminée dont trois à l'étranger. Multiplier ces contrats représente l'opportunité unique de découvrir de nouveaux horizons aussi bien d'un point de vue professionnel que personnel. La principale limite à ces changements réside dans la difficulté à garder une ligne directrice dans le déroulé scientifique de ma carrière ; les activités de recherche étant alors principalement dictées par les différents contrats sur lesquels j'étais recruté.

Comme le montre la Figure 30, j'ai tout de même réussi à conserver une cohérence dans mes activités, activités principalement orientées sur le développement méthodologique en RMN pour aborder des problématiques scientifiques liées à la physicochimie du système étudié (travaux sur le bois ou les médicaments par exemple) ou à sa biochimie (recherche sur les érythrocytes ou la digestion). Ainsi, j'ai pu acquérir une compétence assez large en RMN de diffusion grâce à mes travaux de thèse à Marseille puis à mes expériences professionnelles en Australie, en Suède et à Toulouse. Dans les systèmes étudiés, j'ai pu m'intéresser à l'analyse de mélanges, à la diffusion restreinte ou aux effets de l'échange pendant la mesure de diffusion. Pour cela, j'ai été amené à développer de nouvelles stratégies avec de nouvelles séquences RMN, avec un échantillonnage original des PFG et avec des programmes d'analyses des données. Les domaines d'applications ont été assez vastes pour aborder des thématiques liées aux sciences du vivant, des matériaux et à la pharmaceutique. Une seconde compétence acquise entre l'Australie et Singapour concerne le contraste de type CEST. J'ai développé des applications aussi bien en RMN haute-résolution qu'en imagerie notamment pour étudier la digestion de l'amidon ou l'activité cérébrale. Enfin, ma troisième compétence scientifique principale est liée au phénomène d'hyperpolarisation et à la quantification des données issues de ces expériences. Dans ce contexte, je me suis attaché à mettre en œuvre des outils pour une analyse quantitative des données puis à les appliquer pour caractériser des réactions biochimiques.

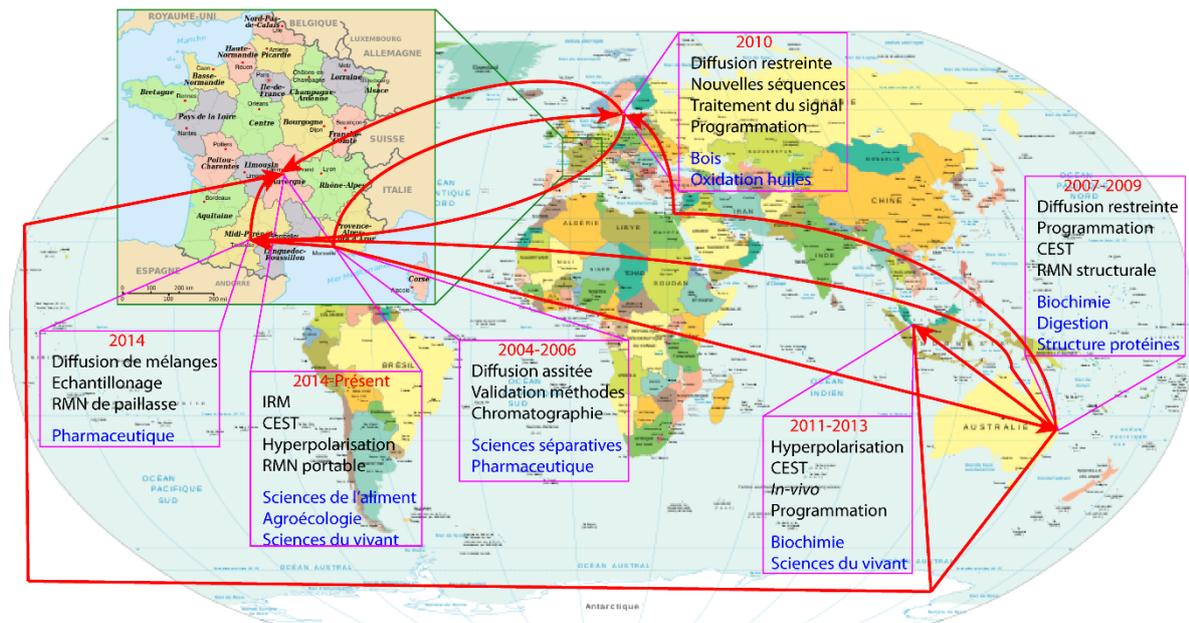


Figure 30 : Représentation de mes différentes expériences de recherche avec les compétences acquises (texte noir) et les domaines d'applications (texte bleu). Les flèches rouges illustrent les endroits où j'ai acquis les compétences qui m'ont permis d'obtenir de nouveaux contrats de travail.

Autour de ces compétences scientifiques principales, j'ai acquis diverses compétences liées notamment à la gestion de projets, à la programmation et à la maîtrise des différents logiciels tant de RMN que de PAO ou de bureautique. Ces compétences « secondaires » sont indispensables à un scientifique pour mener à bien son travail de recherche.

En arrivant à l'INRA dans ce laboratoire de RMN, il m'a paru évident que mon projet devait tirer parti de mes trois principales activités de recherche : diffusion, CEST et hyperpolarisation.

3. PROJET DE RECHERCHE

3.1. INTRODUCTION

J'ai été recruté à l'INRA en tant qu'ingénieur de recherche sur la plateforme de RMN/IRM nommée aujourd'hui AgroResonance¹⁰. J'ai pris mes fonctions au 1^{er} octobre 2014. Les recrutements dans la fonction publique ont cela de surprenant qu'il est possible d'accepter un poste pour travailler dans un laboratoire et/ou une région inconnue.

La RMN est une technique dont l'intérêt n'est plus à démontrer notamment en terme de détermination de structures chimiques et d'outil de diagnostic médical. Cependant, son usage est restreint par quelques limitations. Tout d'abord, par rapport à d'autres techniques, dont la spectrométrie de masse, la RMN est une méthode peu sensible ayant donc un potentiel fortement limité pour la détection et l'identification de molécules à l'état de traces et/ou de noyaux peu sensibles. Ensuite, dans sa version imagerie, la RMN manque de spécificité ne permettant pas d'imager des métabolites ou des fonctions chimiques pour suivre leurs évolutions lors de processus de transformations ou de pathologies médicales. Enfin, la RMN est une technique couteuse ne permettant d'étudier que des systèmes modèles. Un système « mobile » permettrait de s'intéresser à des problématiques liées à l'environnement ou aux processus de transformation directement dans leur écosystème ou leur lieu de production.

Ce projet de recherche a été pensé tout d'abord en se basant sur mes compétences acquises en RMN/IRM depuis une quinzaine d'années. J'ai ensuite construit ce projet en prenant en compte mon environnement. A la manière d'une équipe cycliste, l'activité d'un chercheur est certes individuelle mais s'appuie sur un collectif. J'ai donc bâti mon projet avec les compétences de mes collègues et de quelques collaborateurs. J'ai ensuite développé mon projet autour des équipements présents sur la plateforme tout en tenant compte de la logique institutionnelle de l'INRA mais également des contraintes locales au niveau du site (projet I-SITE¹¹ CAP 20-25). Enfin, pour mener à bien mes activités de recherche, il est indispensable d'assurer le financement des différentes thématiques. Pour cela, je réponds à des appels d'offre auprès des guichets que je juge les plus appropriés : ANR, I-SITE, fondations diverses par exemple.

Mon projet comporte deux axes de recherche. Le premier est consacré à l'imagerie métabolique en développant des sujets de recherche dont les réponses seront apportées par les contrastes de l'IRM CEST ou de l'IRM du ¹³C hyperpolarisé. Le second axe se focalise sur les mesures IRM hors du laboratoire (*in situ*) dans le but de développer un nouveau capteur pour aborder des problématiques en agroécologie. Chacun de ces deux axes comporte des applications sur au moins l'un des trois piliers de l'INRA¹² qui sont : agriculture, alimentation et environnement. De plus, appartenant à une plateforme analytique, il est important de démontrer l'intérêt de ces développements pour des communautés scientifiques dont les thèmes de recherche sont différents de ceux de l'INRA. Or, dans le domaine de l'IRM, nul ne peut ignorer que les applications principales se situent plutôt dans le champ de la biologie que des sciences de l'aliment. C'est pour cela, que des applications médicales sont également mises en œuvre dans ce projet de recherche.

¹⁰ <https://www6.inra.fr/agroresonance> (lien actif au 29/01/2019)

¹¹ Les projets I-SITE sont des projets similaires aux Initiatives d'Excellence (IDEX) mais ciblés sur quelques thématiques précises. Pour le projet CAP 20-25, la liste des challenges scientifiques est détaillée au lien suivant <http://cap2025.fr/recherche/challenges-scientifiques/> (lien actif au 20/01/2019)

¹² L'INRA deviendra au 1^{er} janvier 2020 l'INRAE après sa fusion avec l'IRSTEA. Le nouvel institut se nommera Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Agronomie et l'Environnement. Les trois piliers scientifiques de l'INRA se retrouveront alors dans le nom de ce nouvel institut.

La Figure 31 résume la construction de ce projet ainsi que les interactions déjà existantes. Cette figure inclus également les différents financements de mon projet.

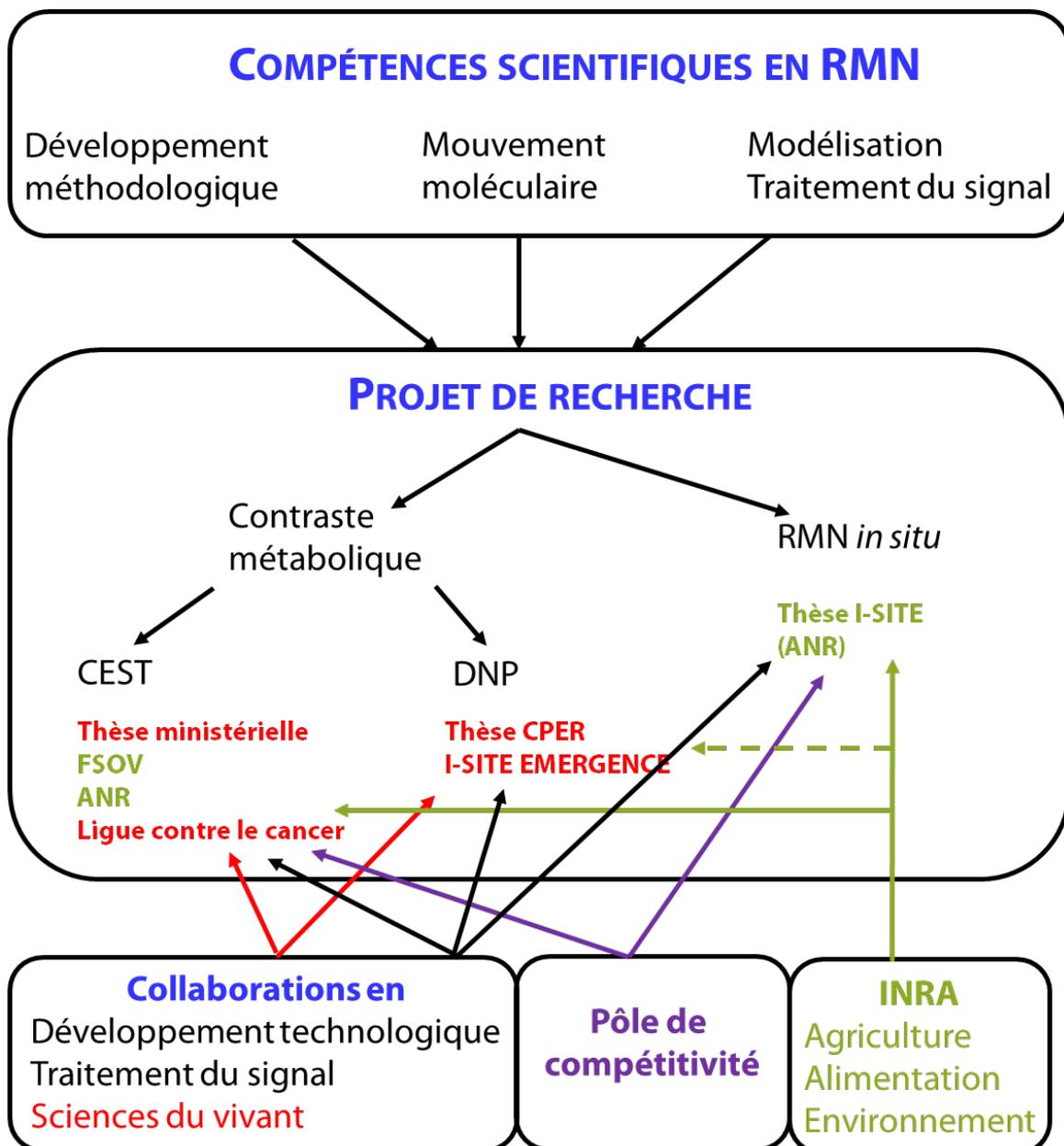


Figure 31 : Représentation schématique du projet de recherche et de ses interactions. Les financements des différentes parties sont représentés dans le cadre projet de recherche. Les couleurs verte et rouge représentent des thématiques liées à l'INRA ou aux sciences du vivant, respectivement. Le financement entre parenthèse de l'ANR n'est pas acquis à l'heure de la finalisation de ce manuscrit

3.2. DEVELOPPEMENT DE CONTRASTES METABOLIQUES EN IRM A HAUT-CHAMP MAGNETIQUE

La plateforme AgroResonance est équipée de trois imageurs à haut-champ magnétique. Deux aimants horizontaux à 4,7 et 11,7 T présentant respectivement un diamètre d'ouverture effectif de 26 et 9 cm, ainsi qu'un aimant vertical à 9,4 T permettant de réaliser à la fois de la spectroscopie et de l'imagerie microscopique. Ces imageurs sont équipés avec diverses sondes pour réaliser des expériences en ^1H mais également en ^{13}C , ^{31}P ou ^{23}Na . En IRM, la majorité des contrastes permettent d'imager l'eau et ses propriétés physiques (temps de relaxation, concentration). En revanche, il est très difficile d'obtenir une information métabolique si ce n'est de réaliser de la spectroscopie à l'intérieur d'un ou plusieurs voxels (pour la version imagerie métabolique). Cependant ces expériences sont relativement peu sensibles (concentration minimale du métabolite de l'ordre de quelques mM).

A partir de l'équipement présent sur la plateforme, je propose dans mon projet de recherche de travailler sur des contrastes métaboliques pour ensuite les appliquer à la fois dans le domaine agroalimentaire mais également en sciences du vivant.

3.2.1. L'IRM CEST

Nous avons vu dans le chapitre 2.3 que le contraste CEST était un contraste basé sur l'échange entre le proton de groupements échangeables et l'eau. Un tel contraste est théoriquement « facile » à mettre en œuvre sur des imageurs classiques. Cependant, sur les imageurs précliniques, ces méthodes ne sont pas programmées (du moins jusqu'à la prochaine version de ParaVision) et demandent donc un travail pour mettre au point la méthode pour acquérir les données. De plus, pour analyser les images et obtenir un contraste CEST, il est indispensable de développer tous les outils de post-traitement (correction des variations de \mathbf{B}_0 , choix du type d'analyse, intensité de l'effet CEST,...). Ce travail a été effectué sous Matlab et aujourd'hui, le programme d'analyse est bien avancé. La méthode CEST est donc disponible sur nos imageurs, il est désormais nécessaire de développer des programmes scientifiques utilisant ce contraste.

Le contraste CEST est reconnu en imagerie (pré-)clinique et, fait actuellement l'objet de nombreux travaux de recherche. J'ai initié des collaborations avec l'UMR1240 IMOST pour imager les propriétés métaboliques de tumeurs de chondrosarcome. Ce cancer du cartilage présente deux spécificités : il est hypoxique et la quantité de protéoglycanes y est importante. En collaboration avec la Dr Caroline Peyrode, maître de conférences à l'université et chercheuse au sein de cette UMR, nous avons proposé d'utiliser l'IRM CEST comme une technique permettant d'imager, lors d'un même examen, les deux propriétés métaboliques de la tumeur. En effet, les protéoglycanes sont des molécules riches en fonctions hydroxyles (-OH) dont les protons s'échangent avec ceux de l'eau à un offset d'environ 1 ppm par rapport à la fréquence de résonance de l'eau. En parallèle, l'hypoxie peut être imagée en regardant l'intensité de l'effet CEST des fonctions amides des protéines, soit à un offset d'environ 3,5 ppm. Les techniques de référence utilisée par l'INSERM sont basées sur l'injection de radiotraceurs. La technique est donc invasive et ne permet pas de multiplier les examens au cours du traitement, à la différence de l'IRM. Nous avons également proposé d'utiliser l'IRM CEST pour suivre l'efficacité des drogues bispécifiques (actives uniquement en hypoxie et s'accumulant dans les régions riches en protéoglycanes) développées par l'UMR 1240. Ce projet a été financé par la ligue régionale contre le cancer (janvier 2017, juin 2019) à hauteur de 40 k€ (20 k€ pour chaque structure). Le stage de M2 de Roxane Autissier a porté sur le développement de cette méthode. Roxane a ainsi démontré que l'IRM CEST était sensible aux

deux propriétés de la tumeur et a pu corrélérer les résultats obtenus en IRM avec les résultats obtenus avec les radiotraceurs. Pour évaluer la drogue développée par l'INSERM il est indispensable d'avoir un modèle exprimant les deux caractéristiques du chondrosarcome : tumeur hypoxique et riche en protéoglycanes. Malheureusement, aucun des modèles proposés ne présente ces deux caractéristiques. Pour continuer avec cette thématique, nous avons déposé un nouveau projet dans lequel l'objectif est d'utiliser l'information spatiale de l'IRM pour stratifier¹³ les tumeurs à partir de leur hypoxie (ce projet sera porté par Dr. Leslie Mazuel en tant que membre de la plateforme IVIA¹⁴). De plus, Roxane Autissier a obtenu une bourse ministérielle de thèse (octobre 2018 – septembre 2021) pour continuer son projet de recherche sur l'utilisation de l'IRM CEST comme outil permettant un multi contraste métabolique en un seul examen. Roxane, dont je co-encadre la thèse, continue de caractériser le chondrosarcome et l'effet d'un traitement, puis étudiera d'autres pathologies.

Si ce contraste est bien (re)connu par les chercheurs travaillant en (pré-)clinique, il n'est (quasi) pas utilisé par la communauté scientifique travaillant en sciences des aliments. Aussi surprenant que cela puisse paraître, lors du dernier congrès « *International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science* » en septembre 2018, aucun abstract, à l'exception du mien, ne travaillait sur de l'imagerie contrastée par CEST. Comme je l'ai déjà démontré (P15), le contraste CEST peut être utilisé pour étudier la digestion des aliments. C'est donc tout naturellement que j'ai choisi d'appliquer ce contraste sur des problématiques liées à l'alimentation.

Un sujet de société actuel est l'hypersensibilité non cœliaque au gluten¹⁵. En bref, il existe deux maladies diagnostiquées liées au gluten : l'allergie au blé et la maladie cœliaque. Les personnes se définissent, en général, hypersensibles lorsqu'après élimination du gluten, les pathologies dont ils souffraient (allant de simple ballonnement à des symptômes plus graves comme des éruptions cutanées) disparaissent. Une des hypothèses pour expliquer cette hypersensibilité est que la structure du réseau de gluten a évolué avec la sélection variétale du blé ayant pour conséquence la formation d'un réseau de gluten dans le produit fini plus « fort », moins digeste. Nous voyons que le cœur de la problématique est lié au gluten mais, d'un point de vue moléculaire, comment définir le gluten, ou plus exactement, le réseau de gluten ? Le gluten, qui n'existe pas dans le grain de blé, est constitué de deux protéines ; les gliadines et les gluténines. Le réseau de gluten va se former lors du pétrissage et du repos de la pâte. Des ponts disulfides entre ces deux types de protéines vont alors se former. D'un point de vue moléculaire, il y a une disparition des fonctions thiols (-SH) pour former des ponts disulfides (-S-S-). Un chimiste reconnaîtra dans les fonctions thiols, un groupement échangeable qui ne peut être observé par RMN dans l'eau. En revanche, il devrait être possible d'imager la formation de ce réseau de gluten par IRM CEST en suivant la disparition de ces fonctions. Ces groupements thiols ne présentent que peu d'intérêt pour les expériences *in vivo* et n'ont donc jamais été étudiés, à ma connaissance. Aussi, cette technique d'imagerie est prometteuse si (1) la vitesse d'échange des avec l'eau est comprise entre un régime lent et intermédiaire (condition nécessaire pour

¹³ Terme utilisé pour classer les grades des tumeurs.

¹⁴ IVIA est la plateforme '*In Vivo Imaging in Auvergne*' qui regroupe les différents équipements d'imagerie clinique et préclinique. Les IRM d'AgroResonance font parties de cette structure tout comme les imageurs SPECT/TEP petits animaux de l'IMOST ou les mêmes instruments cliniques disponibles dans les structures hospitalières.

¹⁵ La dénomination de cette pathologie change régulièrement et ne fait pas consensus dans les différentes communautés.

observer l'effet CEST) et (2) si le système n'est pas trop pollué par d'autres échanges dus aux macromolécules. Les premiers résultats montrent que l'influence des macromolécules n'est pas négligeable et qu'il va être nécessaire d'optimiser à la fois les conditions expérimentales mais également le traitement des données.

La caractérisation du réseau de gluten est une première étape pour comprendre l'hypersensibilité. Une deuxième étape est d'étudier *in vitro* la digestion du produit fini (du pain dans notre cas) tandis qu'une ultime étape consiste à tester les effets de ce produit *in vivo* sur une cohorte humaine d'hypersensibles. En s'intéressant cette fois à l'effet CEST des fonctions hydroxyles qui vont être produites lors de la digestion de l'amidon dans le pain, l'IRM CEST pourrait être un bon marqueur pour caractériser rapidement la digestion de l'aliment *in vitro*.

Ces thématiques CEST en sciences de l'aliment sont déjà initiées puisque je suis partenaire dans les projets portés par Catherine Grand-Ravel de l'UMR1095 GDEC (unité spécialiste du blé) et financés par le fond de soutien à l'obtention végétale en blé tendre (FSOV ; 2017-2020) et par l'ANR (2018-2021). Dans le projet soutenu par le FSOV, l'imagerie du réseau de gluten doit être mise en place tandis que dans le projet ANR, nous nous intéresserons à la fois au réseau de gluten et à la digestion, en partenariat avec l'équipe biochimie et protéines du muscle (BPM) de mon unité de recherche.

Cette première thématique de mon projet consiste au développement du contraste par CEST en IRM. Ce contraste est multicibles et spécifique de groupements chimiques particuliers. Ce développement sera utilisé à la fois *in vivo* mais également pour caractériser des produits alimentaires et leur transformation. Cette méthode générique sera extrapolée à d'autres matrices agroalimentaires (imagerie des sucres dans les aliments par exemple) ou à différents types de digestion comme celles mimant la digestion des personnes âgées ou des enfants.

3.2.2. LA DNP PAR DISSOLUTION

La DNP par dissolution, bien qu'étant une approche particulièrement intéressante, présente dans sa version commerciale d'importantes contraintes limitant les applications. Aussi, pour une utilisation optimale et large de cette méthodologie, il est indispensable d'améliorer les performances de cet équipement. C'est pourquoi, la première partie présentera les stratégies d'amélioration de l'équipement et d'acquisition du signal. Dans la deuxième partie, l'application principale que je souhaite mettre en œuvre sera détaillée.

A la fin de mon introduction de la section 2.4, j'ai montré trois innovations particulièrement intéressantes, à savoir (1) la mise en place de la CP pour améliorer la vitesse (voir le taux) de polarisation, (2) l'utilisation d'un tunnel magnétique lors du transport de la solution dissoute et (3) un système d'injection automatique. La mise en place de la CP présenterait des atouts indéniables pour la plateforme : (1) la diminution du temps de polarisation, (2) la diminution du coût de préparation de l'échantillon car le radical de référence pourra être remplacé par un radical plus classique et (3) la possibilité d'hyperpolariser des échantillons en abondance naturelle. C'est pourquoi, en collaboration avec le Pr. Sami Jannin (FRE2034 Centre de RMN à très hauts champs, Lyon), je souhaite mettre en place la CP sur l'HyperSense. Cet instrument possède une bobine RF en selle de cheval, de diamètre relativement important par rapport à la taille de l'échantillon, permettant de suivre l'augmentation de la polarisation du ^{13}C . Pour réaliser la CP, il est nécessaire de produire des impulsions RF sur les fréquences à la fois du ^1H et du ^{13}C . C'est pourquoi nous nous sommes procurés une console permettant de réaliser les impulsions RF sur les deux canaux, ce qui n'est pas possible avec celle de l'HyperSense. Dans un premier temps, nous avons choisi de tester la CP en utilisant la bobine présente dans

l'instrument. Pour assurer des impulsions sur chacune des fréquences, une boîte double accord a été conçue (Roberto Melzi de Bruker pour la première version et Abdlatif BenMoussa de la plateforme pour la version suivante) permettant de transmettre sélectivement et simultanément de l'énergie aux deux fréquences de travail. En cas d'échec, nous avons prévu d'introduire une bobine double accord qui serait au contact de l'échantillon. Cette solution demande de repenser le principe de l'introduction de l'échantillon dans l'HyperSense. Plus spécifiquement, il faudra créer un système permettant d'isoler la chambre d'hyperpolarisation, pour garder les conditions de température (~1,4 K) nécessaire à l'hyperpolarisation, tout en ayant accès aux câbles RF pour pouvoir réaliser les impulsions RF. Dans ce second cas, nous nous approcherions du principe proposé par Oxford en version prototype mais jamais commercialisé [126].

Une fois l'hyperpolarisation effectuée, il est nécessaire de disposer de protocoles permettant d'enregistrer le signal à la fois avec une sélectivité spectrale mais également spatiale. De plus, le signal ne dure que quelques dizaines de secondes, il est indispensable que l'acquisition du signal soit (très) rapide. L'enregistrement et l'analyse d'images métaboliques rapides ne fait pas partie de la routine en imagerie. Dans un premier temps, nous avons choisi de mettre en place le protocole IDEAL-SPIRAL [147] basé sur une connaissance *a priori* des déplacements chimiques et l'enregistrement parcimonieux d'images à différents temps d'écho. Pour reconstruire les cartes métabolites, je collabore avec le Dr Hélène Ratiney (UMR5220 CREATIS, Lyon), spécialiste dans le domaine. D'ailleurs, Nour El Sabbagh a travaillé sur la reconstruction des images lors de son stage de M2 en collaboration entre nos deux laboratoires. Il peut être reproché à l'IDEAL SPIRAL de nécessiter plusieurs images avant de pouvoir reconstruire les cartes métabolites. Ainsi, pendant ces quelques secondes nécessaire à l'enregistrement de l'ensemble du jeu de données, les quantités de chacune de ces espèces continuent d'évoluer. Une stratégie alternative consisterait plutôt à enregistrer une carte d'un métabolite à un temps t , ce qui requiert des séquences rapides basées sur une impulsion sélective spatialement (ce qui est fréquemment le cas) et fréquemment (pour n'acquérir que le signal du métabolite d'intérêt). La résolution temporelle pour enregistrer l'ensemble des cartes métabolites n'est pas nécessairement meilleure que l'IDEAL SPIRAL mais l'instant d'acquisition d'une carte métabolique est dans ce cas mieux délimité temporellement et l'évolution chimique du système est mieux prise en compte.

Nour El Sabbagh, qui avait effectué son stage de M2 sur la reconstruction de cartes métabolites, vient d'intégrer notre équipe pour une thèse (octobre 2018 – septembre 2021) financée par le CPER. Son travail de thèse consiste à mettre en place à la fois la CP au cours de l'hyperpolarisation mais également les protocoles d'imagerie rapide. Sa thèse étant en collaboration avec l'équipe EA7280 NPsySydo de l'UCA (Pr. Franck Durif & Dr. Carine Chassain), spécialiste de la maladie de Parkinson idiopathique, les applications de l'hyperpolarisation se feront pour caractériser les différences de vitesse dans la conversion du glutamate en glutamine (caractéristique des maladies neurodégénératives) entre des modèles murins de la maladie de Parkinson et des animaux contrôles. Il est à noter que ce projet a également donné lieu à un financement (30 k€, projet d'un an de septembre 2018 à septembre 2019) de la part d'I-SITE CAP 20-25 lors de leur appel à projet EMERGENCE.

Un des axes de spécialisation de la plateforme concerne l'IRM fonctionnelle (IRMf). Dans le cadre des travaux menés dans l'équipe, l'IRMf par effet BOLD (*'Blood Oxygen Level Dependent'*) permet de suivre l'intégration cérébrale des signaux alimentaires permettant de comprendre certains processus sensoriels et cognitifs impliqués en alimentation (flaveur, plaisir, effet contextuel lié à l'anticipation). Ces expérimentations peuvent également être

réalisées chez l'animal modèle, notamment pour mieux maîtriser la variabilité interindividuelle. L'activation des régions cérébrales se traduit systématiquement par une surconsommation de glucose par les neurones. Imager le glucose serait alors idéal pour suivre le retentissement cérébral de stimuli transitoires, essentiellement pour des raisons de spécificité très supérieure à celle du contraste neuro-vasculaire couramment utilisé en IRMf (contraste dit BOLD). L'imagerie rapide du glucose par IRM serait alors à rapprocher de la tomographie par émission de positrons (TEP) du fluorodésoxyglucose marqué (FDG) mais avec deux avantages principaux : (1) l'absence d'injection de produits radioactifs et (2) l'obtention d'une image spatialement résolue. Pour réaliser cet objectif, il est primordial d'être capable d'hyperpolariser du glucose rapidement, de manière économique et avec le taux de polarisation le plus élevé possible ; caractéristiques que nous souhaitons atteindre grâce à la CP qui aura été mise en place en amont. Si les conditions d'hyperpolarisation sont jugées favorables, des expériences *in vivo* seront réalisées pour tester la faisabilité de cette approche.

En parallèle à ces études *in vivo*, je développerai la DNP par dissolution pour d'autres utilisations. Ainsi, il a été démontré que la DNP assistée par CP permet de détecter avec une excellente sensibilité les ^{13}C en abondance naturelle, ouvrant ainsi de nouveaux axes de recherche [148]. Il serait ainsi intéressant d'évaluer son intérêt dans (1) des études métaboliques, que ce soit sur les végétaux (avec la Dr. Catherine DEBORDE de l'INRA de Bordeaux sur les fruits par exemple) ou sur la chimie des nuages (avec l'institut de chimie de Clermont-Ferrand) et (2) la détection des éléments à l'état de traces avec par exemple un travail avec l'équipe micro contaminants, arômes et sciences séparatives (MASS) de mon unité de recherche.

Le site clermontois a profité de restructuration pour adosser un équipement rare, l'HyperSense, à des IRM préclinique de pointes. Dans cette partie de mon projet de recherche, je propose une optimisation de l'équipement pour qu'il puisse répondre à des besoins plus larges que ceux offerts par sa configuration actuelle, en particulier pour aborder des questions autour de l'IRMf et de l'agronomie.

3.3. L'IRM *IN SITU*

Avec les équipements à haut champ magnétique utilisés dans la première partie de mon projet de recherche, il est indispensable d'amener l'échantillon au laboratoire. Or, pour différentes applications, cette translation peut ne pas être possible. Il peut s'agir par exemple d'un contrôle qualité d'un produit sur la ligne de production ou d'un échantillon biologique placé dans son environnement naturel complexe. A ce moment-là, il est indispensable de déplacer l'aimant au lieu de mesure. La seule solution consiste alors à utiliser un aimant à faible champ magnétique. En général, avec de tels équipements, la résolution spectrale n'est pas suffisante et « seules » des mesures de relaxométrie et éventuellement de diffusion peuvent être réalisées.

Dans cette seconde partie de mon projet de recherche, je propose de développer un capteur ainsi que les moyens analytiques nécessaires pour mesurer des quantités et des flux d'eau dans les plantes, localement, de manière non-invasive et directement dans leur écosystème. Ces développements seront mis en application pour étudier la résilience de ces systèmes lors de périodes de stress hydrique. Sur le centre INRA d'Auvergne Rhône-Alpes, deux unités de recherche sont spécialistes de ces écosystèmes : l'UMR 0547 PIAF pour les écosystèmes forestiers et l'UMR 0874 UREP pour les prairies. C'est donc naturellement que ce projet s'est construit en collaboration avec des chercheurs de chacune de ces unités. Comme il est nécessaire de déplacer l'aimant d'un lieu de mesure à un autre, il s'agit bien d'IRM *in situ*.

Les forêts et les prairies sont les deux principaux écosystèmes terrestres permettant de séquestrer le carbone en le stockant dans le bois ou le sol, limitant ainsi le réchauffement climatique. Ce processus est une balance entre la photosynthèse et la transpiration des plantes. En effet, le système racinaire absorbe l'eau dans le sol et la transporte jusqu'à la canopée pour assurer les besoins de transpiration de la plante grâce au xylème (ou sève brute). A l'inverse, les produits carbonés, issus de la photosynthèse, sont transportés de la canopée vers les puits de stockage de carbone par le phloème (ou sève élaborée). La capacité d'une plante à stocker le carbone dépend donc de chacun de ces deux flux. Il est donc essentiel, dans le contexte de réchauffement climatique, de mesurer les flux directement dans l'écosystème. Aujourd'hui, pour estimer le flux de xylème, plusieurs méthodes ont été proposées. Des variations de masse ou d'humidité permettent de mesurer une consommation globale combinant l'eau stockée par les plantes et la transpiration à la fois de la plante (soit le flux de xylème) et du sol. Des méthodes directes existent basées sur des bilans de chaleur ou d'échange gazeux. Bien que très utilisées, ces méthodes ne permettent ni d'avoir des mesures locales dans la plante, ni de séparer les flux de sèves brute et élaborée limitant ainsi nos connaissances sur la redistribution de l'eau. Pour mesurer, de manière non invasive et locale, des quantités et des flux d'eau, LA méthode de référence est l'IRM (et je n'ai pas besoin de vous en convaincre !). Pour pouvoir transporter l'IRM dans les champs, il est nécessaire de diminuer le champ magnétique à quelques dixièmes de tesla. Quelques aimants dédiés ont été développés pour réaliser des mesures de relaxométrie, de concentration et/ou de flux dans les plantes. Malheureusement, aucun de ces dispositifs ne permet d'avoir l'adaptabilité nécessaire : soit l'entrefer de l'aimant est trop faible, soit l'aimant n'est pas vraiment portable. De plus, les mesures ne permettent pas d'avoir une sélectivité spatiale.

Pour initier ce projet et avoir un appareil le plus générique possible, nous nous sommes orientés vers un aimant unilatéral, le NMR-MOUSE financé par le CPER. Avec cet aimant, il suffit d'appliquer l'échantillon à sa surface pour étudier l'objet. Le champ magnétique de l'aimant est inhomogène perpendiculairement à la surface créant un fort gradient de champ. Lors d'une impulsion RF, ce gradient naturel va disperser les fréquences de résonance des noyaux sur une large gamme. La détection s'effectuant sur une bande passante spécifique, le signal RMN n'est enregistré que dans une coupe bien déterminée spatialement. En translatant avec précision l'aimant, qui est monté sur un « ascenseur », cette coupe est déplacée et un profil (ou une image 1D) enregistré. L'avantage principal de cet aimant réside donc dans le fait qu'il suffit de déposer l'échantillon à sa surface pour réaliser l'étude RMN. A ce stade, notre aimant est capable de mesurer des profils, des temps de relaxation et des quantités d'eau dans la profondeur de l'objet mais nullement d'estimer des flux dans les plantes. Lors de l'achat de l'appareil, nous avons spécifié avec le constructeur les propriétés d'un prototype de bobine de gradients PFG pour pouvoir coder les déplacements dans une dimension parallèle à la surface de l'objet. Enfin, pour pouvoir déplacer notre système de mesure, un vecteur de transport a été conçu par nos soins et réalisé par un prestataire (Figure 32A, financement CPER). Les premières expériences ont été réalisées à la fois sur un arbre en pot et sur du sol à l'aide d'un rhizotron. Ces résultats (Figure 32 B&C), très encourageants, ont démontré qu'il était possible d'estimer localement le propagateur du flux de xylème sur un arbre et de suivre les variations de la quantité d'eau dans les racines d'espèces présentes dans les prairies en fonction du cycle circadien. Suite à ces résultats nous avons déposé une demande de financement de type « projet de recherche collaboratif » à l'ANR dans le comité d'évaluation « innovations scientifiques et technologiques pour accompagner la transition écologique ».

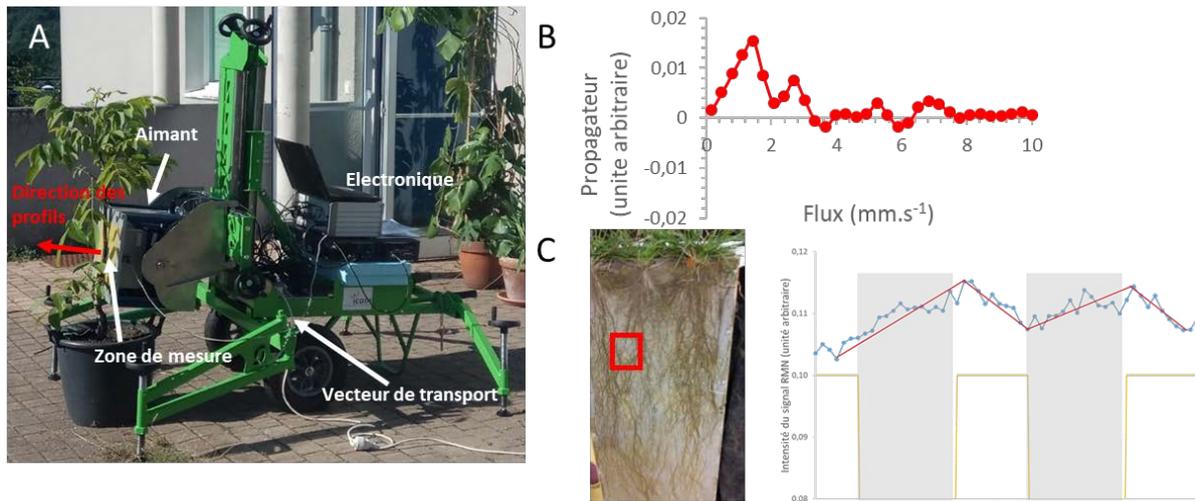


Figure 32 : Exemples de résultats préliminaires obtenus avec notre instrument de RMN *in situ*. (A) L'IRM *in situ* avec son vecteur de transport en train de réaliser une mesure sur un arbre. (B) Extraction du flux de xylème (valeurs positives = flux du bas vers le haut) après une analyse par asymétrie du propagateur brut à une profondeur de 1 cm. (C) Mesure de la teneur en eau (ronds bleus) dans le rhizotron représenté en photo (le carré rouge représentant le lieu de mesure) pendant plusieurs jours (rectangles jaunes) et nuits (zones grisées). La teneur en eau a tendance à diminuer pendant la journée (transpiration) et à augmenter (stockage) durant la nuit. Figure adaptée du projet OutLabMRI, déposé à l'appel à projet 2019 de l'ANR.

Les objectifs de ce projet sont de (1) démontrer la versatilité de cet équipement en réalisant des mesures sur deux écosystèmes contrastés qui sont les forêts et les prairies et (2) de valider l'approche en comparant les résultats obtenus en IRM *in situ* avec ceux des méthodes de référence. Pour atteindre ces objectifs, il est nécessaire de développer des méthodes d'acquisition et de traitement des données. La Figure 33 illustre la répartition des tâches dans ce projet, avec des responsabilités partagées en fonction des compétences des personnes.

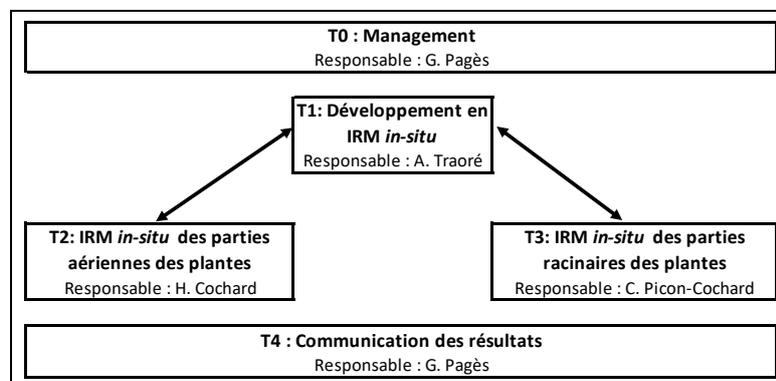


Figure 33 : Organigramme organisationnel du projet OutLabMRI soumis à l'appel à projet générique 2019 de l'ANR.

Pour atteindre nos objectifs, il est indispensable de développer des méthodes capables de répondre à nos besoins. Par exemple, un programme permettant de mesurer, de manière automatique, le flux en fonction de la profondeur devra être écrit. En fonction de la profondeur, le propagateur de flux mesuré contiendra simultanément la vitesse du xylème (flux ascendant), du phloème (flux descendant) ainsi qu'une forte composante d'eau « immobile ». La superposition lors d'une même mesure de tous ces mouvements rend impossible l'analyse des données par les méthodes classiques. Il sera donc indispensable de développer une stratégie de traitement basée sur la simulation d'un propagateur en absence de flux. Ce propagateur pourrait être estimé grâce à la mesure du coefficient de diffusion dans la direction perpendiculaire au flux. Les mesures étant réalisées en extérieur, il sera indispensable de s'intéresser aux

fluctuations de température au cours de la journée. En effet, le champ magnétique des aimants permanents est fonction de la température. Or, dans notre contexte, une variation du champ magnétique va entraîner une erreur sur la profondeur à laquelle nous pensons effectuer la mesure. Pour prendre en compte cet effet, une solution sera de suivre l'évolution de la fréquence du signal de l'eau au cours du temps pour corriger, en temps réel (avant le début d'une mesure), la profondeur de mesure. Cette stratégie se rapproche des options de « navigateur » disponible sur les IRM précliniques.

Concernant les écosystèmes forestiers, la mesure de flux en IRM *in situ* sera comparée avec des images de vélocimétrie obtenues par IRM à haut-champ magnétique. Les images à haut champ permettront de connaître exactement le flux attendu dans une coupe précise en IRM *in situ*. Pour démontrer la spécificité de l'IRM *in situ*, je comparerai les résultats obtenus avec les mesures classiques de gravimétrie ou de bilan et ce pour des arbres de différents diamètres afin d'estimer également la sensibilité de notre approche. Dans le phloème, le flux transportant les produits issus de la photosynthèse, la concentration en sucre varie en fonction des conditions environnementales. D'un point de vue RMN, cela entraîne des variations dans le temps de relaxation T_2 de cette solution. Une fois la méthode validée, j'essaierai d'utiliser l'IRM *in situ* pour déterminer la concentration en sucre du phloème. Ce travail sera d'abord réalisé sur des échantillons modèles puis sur la plante.

Pour étudier les écosystèmes prairiaux, il n'existe pas de méthode de référence permettant de mesurer le flux. Pour valider les mesures d'IRM *in situ*, les résultats seront comparés avec des données complémentaires obtenues par imagerie de transmission de lumière en 2D ou radiographie X dans des rhizotrons. Combinées avec un modèle, ces mesures permettront d'obtenir un flux qui sera comparé avec les résultats d'IRM. L'influence de la composition du sol sur le signal RMN sera également caractérisée. Pour estimer la sensibilité de la méthode pour chacun de ces écosystèmes, un stress hydrique sera induit.

Outre des collaborations avec mes collègues du pôle végétal du site de Crouël de l'INRA, ce projet fait également appel à des équipes de l'UMR1114 EMMAH d'Avignon (Dr. Claude Doussan) pour les mesures et les modèles sur les rhizotrons, ainsi qu'au Dr. Carel Windt du *Forschungszentrum Jülich* en Allemagne, spécialiste international des mesures RMN sur les plantes. Sur ce projet, le financement pour une thèse de doctorat a été obtenu auprès de l'axe transversal INSTRUMENTS du programme I-SITE CAP20-25 (début prévu en octobre 2019).

3.4. RESUME

Mon projet, construit à partir de mes compétences acquises au cours de mes différentes expériences de recherche, est basé sur des développements méthodologiques en IRM. Pour chacun des deux grands axes, ces développements correspondent aux priorités scientifiques d'au moins l'un des trois piliers de l'INRA.

Appartenant à une plateforme analytique, il est important de démontrer également l'intérêt de ces développements pour des communautés scientifiques plus larges que celles de l'INRA. C'est pour cela que, dans la mise au point de contrastes métaboliques, des applications dans le domaine médical sont systématiquement proposées. Pour promouvoir ces innovations, il est indispensable d'assister et d'exposer les résultats aux congrès des différentes communautés scientifiques. C'est pour cela, que certains travaux ont été présentés dans les sociétés savantes biomédicales ou que des séminaires d'agroécologie seront visés lorsque des résultats plus complets seront obtenus avec l'IRM *in situ*.

4. CONCLUSION

Ce mémoire résume mes principaux travaux de recherche qui ont porté sur des développements méthodologiques en RMN, principalement dans les champs de la RMN de diffusion, du CEST et de l'analyse de données provenant d'expériences de DNP. Ces développements ont ensuite été mis à profit pour investiguer les propriétés physico- ou biochimique de différents systèmes d'intérêt.

Au cours de mes expériences dans différents laboratoires, j'ai eu l'opportunité de collaborer avec des chercheurs issus de formation et de culture différentes permettant ainsi un échange fructueux sur mes différents projets de recherche. La formation par la recherche, grâce à l'encadrement d'étudiants lors de stages dans le cadre de leur cursus universitaire, m'a permis d'améliorer mes compétences théoriques et pratiques. L'expression « tout ce qui est clair s'énonce clairement » prenant alors tout son sens.

Depuis mon arrivée à l'INRA en octobre 2014, je me suis efforcé de construire un projet de recherche, comme j'ai essayé de le démontrer, basé à la fois sur mes compétences et sur les thématiques de mon institut. Appartenant à une plateforme analytique ouverte à l'ensemble de la communauté scientifique (académique et privée), il est important que mes travaux puissent s'appliquer à un large spectre de questions et d'objets d'études depuis l'agronomie, l'aliment, jusqu'aux sciences du vivant.

Pour mener à bien mes projets, je recherche des financements tant au niveau local, régional que national. Des financements sont d'ores et déjà acquis sur chacun des axes de mon travail grâce, notamment, aux collaborations initiées majoritairement au niveau local ou régional. Il est maintenant indispensable de mettre en musique les différentes parties de ce projet de recherche pour en assurer le succès. L'excellente dynamique qui existe au sein de l'équipe AgroResonance sera un des moteurs de la réussite de ce programme. Grâce aux collaborations existantes, à la communication des futurs résultats et à la mise à disposition de l'IRM *in situ* sur des réseaux dédiés (réseau ANAEE par exemple), j'ai pour objectif de développer ce réseau collaboratif, notamment au niveau national et européen.

Pour avoir des résultats, il est primordial d'exploiter des données expérimentales et pour cela soit d'avoir la possibilité de faire les expériences soit d'avoir des collaborateurs (brillants évidemment !) pouvant les faire. La gestion de projet et autres tâches prenant malheureusement trop de temps, j'ai la chance d'avoir réussi à obtenir un financement de thèse sur chacun de mes axes de recherche. Ce travail d'encadrement est aujourd'hui indispensable pour l'avancée de mon travail mais également pour continuer à former les forces vives de demain.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] A. Molinié, G. Bodenhausen, *Bibliometrics as Weapons of Mass Citation*, *Chimia* 64 (2010) 78-89.
- [2] E.L. Hahn, *Spin Echoes*, *Phys. Rev.* 80 (1950) 580-594.
- [3] E.O. Stejskal, J.E. Tanner, *Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient*, *J. Chem. Phys.* 42 (1965) 288-292.
- [4] H. van As, T.J. Schaafsma, *Noninvasive measurement of plant water flow by nuclear magnetic resonance*, *Biophys. J.* 45 (1984) 469-472.
- [5] P.T. Callaghan, Y. Xia, *Velocity and diffusion imaging in dynamic NMR microscopy*, *J. Magn. Reson.* 91 (1991) 326-352.
- [6] D. Le Bihan, J.-F. Mangin, C. Poupon, C.A. Clark, S. Pappata, N. Molko, H. Chabriet, *Diffusion tensor imaging: Concepts and applications*, *J. Magn. Reson. Imag.* 13 (2001) 534-546.
- [7] IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1997.
- [8] K.F. Morris, C.S. Johnson Jr, *Diffusion-ordered two-dimensional NMR spectroscopy*, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 3139-3142.
- [9] J.E. Tanner, *Use of the stimulated echo in NMR diffusion studies*, *J. Chem. Phys.* 52 (1970) 2523-2526.
- [10] W.S. Price, F. Elwinger, C. Vigouroux, P. Stilbs, *PGSE-WATERGATE, a new tool for NMR diffusion-based studies of ligand-macromolecule binding*, *Magn. Reson. Chem.* 40 (2002) 391-395.
- [11] K.I. Momot, P.W. Kuchel, *Convection-compensating PGSE experiment incorporating excitation-sculpting water suppression (CONVEX)*, *J. Magn. Reson.* 169 (2004) 92-101.
- [12] G. Zheng, T. Stait-Gardner, P.G. Anil Kumar, A.M. Torres, W.S. Price, *PGSTE-WATERGATE: An STE-based PGSE NMR sequence with excellent solvent suppression*, *J. Magn. Reson.* 191 (2008) 159-163.
- [13] S. Balayssac, M.-A. Delsuc, V. Gilard, Y. Prigent, M. Malet-Martino, *Two-dimensional DOSY experiment with Excitation Sculpting water suppression for the analysis of natural and biological media*, *J. Magn. Reson.* 196 (2009) 78-83.
- [14] S.J. Gibbs, C.S. Johnson Jr, *A PFG NMR experiment for accurate diffusion and flow studies in the presence of eddy currents*, *J. Magn. Reson.* 93 (1991) 395-402.
- [15] D.H. Wu, A.D. Chen, C.S. Johnson, *An improved diffusion-ordered spectroscopy experiment incorporating bipolar-gradient pulses*, *J. Magn. Reson. Ser. A* 115 (1995) 260-264.
- [16] A. Jerschow, N. Muller, *Suppression of convection artifacts in stimulated-echo diffusion experiments. Double-stimulated-echo experiments*, *J. Magn. Reson.* 125 (1997) 372-375.
- [17] N. Esturau, F. Sanchez-Ferrando, J.A. Gavin, C. Roumestand, M.-A. Delsuc, T. Parella, *The use of sample rotation for minimizing convection effects in self-diffusion NMR measurements*, *J. Magn. Reson.* 153 (2001) 48-55.
- [18] I. Swan, M. Reid, P.W.A. Howe, M.A. Connell, M. Nilsson, M.A. Moore, G.A. Morris, *Sample convection in liquid-state NMR: Why it is always with us, and what we can do about it*, *J. Magn. Reson.* 252 (2015) 120-129.
- [19] T.M. Barbosa, R. Rittner, C.F. Tormena, G.A. Morris, M. Nilsson, *Convection in liquid-state NMR: expect the unexpected*, *RSC Adv.* 6 (2016) 95173-95176.
- [20] A.J. Dingley, J.P. Mackay, G.L. Shaw, B.D. Hambly, G.F. King, *Measuring macromolecular diffusion using heteronuclear multiple-quantum pulsed-field-gradient NMR*, *J. Biomol. NMR* 10 (1997) 1-8.
- [21] K.I. Momot, P.W. Kuchel, *Convection-compensating diffusion experiments with phase-sensitive double-quantum filtering*, *J. Magn. Reson.* 174 (2005) 229-236.
- [22] S.S. Velan, N. Chandrakumar, *High-resolution NMR measurement of molecular self-diffusion by fast multi-spin-echo diffusion sequences*, *J. Magn. Reson. Ser. A* 123 (1996) 122-125.

- [23] N.M. Loening, J. Keeler, G.A. Morris, One-dimensional DOSY, *J. Magn. Reson.* 153 (2001) 103-112.
- [24] G. Hamdoun, L. Guduff, C. van Heijenoort, C. Bour, V. Gandon, J.-N. Dumez, Spatially encoded diffusion-ordered NMR spectroscopy of reaction mixtures in organic solvents, *Analyst* 143 (2018) 3458-3464.
- [25] P. Stilbs, Historical: early multi-component FT-PGSE NMR self-diffusion measurements—some personal reflections, *Magn. Reson. Chem.* 55 (2017) 386-394.
- [26] A.A. Istratov, O.F. Vyvenko, Exponential analysis in physical phenomena, *Rev. Sci. Instrum.* 70 (1999) 1233-1257.
- [27] R. Kerssebaum, G. Salnikov, DOSY and diffusion by NMR, *Topspin manual*, Bruker, 2006.
- [28] P. Stilbs, K. Paulsen, P.C. Griffiths, Global least-squares analysis of large, correlated spectral data sets: Application to component-resolved FT-PGSE NMR spectroscopy, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 8180-8189.
- [29] M. Nilsson, G.A. Morris, Speedy component resolution: An improved tool for processing diffusion-ordered spectroscopy data, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3777-3782.
- [30] G.S. Armstrong, N.M. Loening, J.E. Curtis, A.J. Shaka, V.A. Mandelshtam, Processing DOSY spectra using the regularized solvent transform, *J. Magn. Reson.* 163 (2003) 139-148.
- [31] I. Toumi, B. Torrèsani, S. Caldarelli, Effective processing of pulse field gradient NMR of mixtures by blind source separation, *Anal. Chem.* 85 (2013) 11344-11351.
- [32] M.A. Delsuc, T.E. Malliavin, Maximum entropy processing of DOSY NMR spectra, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2146-2148.
- [33] W. Windig, B. Antalek, Direct exponential curve resolution algorithm (DECRA): A novel application of the generalized rank annihilation method for a single spectral mixture data set with exponentially decaying contribution profiles, *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* 37 (1997) 241-254.
- [34] M. Nilsson, The DOSY Toolbox: A new tool for processing PFG NMR diffusion data, *J. Magn. Reson.* 200 (2009) 296-302.
- [35] P. Stilbs, Fourier transform pulsed-gradient spin-echo studies of molecular diffusion, *Prog. Nucl. Magn. Reson.* 19 (1987) 1-45.
- [36] W.S. Price, Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion: Part 1. Basic theory, *Concepts Magn. Reson.* 9 (1997) 299-336.
- [37] W.S. Price, Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion: Part II. Experimental aspects, *Concepts Magn. Reson.* 10 (1998) 197-237.
- [38] C.S. Johnson, Diffusion ordered NMR spectroscopy: principles and applications, *Prog. Nucl. Magn. Reson.* 34 (1999) 203-256.
- [39] Y. Cohen, L. Avram, L. Frish, Diffusion NMR spectroscopy in supramolecular and combinatorial chemistry: An old parameter—new insights, *Angew. Chem.-Int. Ed.* 44 (2005) 520-554.
- [40] K.I. Momot, P.W. Kuchel, PFG NMR diffusion experiments for complex systems, *Concepts Magn. Reson. Part A* 28A (2006) 249-269.
- [41] W.S. Price, *NMR studies of translational motion*, Cambridge University Press, Cambridge, 2009.
- [42] P.T. Callaghan, *Translational dynamics and magnetic resonance. Principles of pulsed gradient spin echo NMR*, Oxford University Press, Oxford, UK, 2011.
- [43] A. Brian, Using pulsed gradient spin echo NMR for chemical mixture analysis: How to obtain optimum results, *Concepts Magn. Reson.* 14 (2002) 225-258.
- [44] R.E. Hoffman, H. Arzuan, C. Pemberton, A. Aserin, N. Garti, High-resolution NMR "chromatography" using a liquids spectrometer, *J. Magn. Reson.* 194 (2008) 295-299.
- [45] S. Viel, F. Ziarelli, S. Caldarelli, Enhanced diffusion-edited NMR spectroscopy of mixtures using chromatographic stationary phases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 9696-9698.

- [46] A. Tchaplà, S. Héron, E. Lesellier, H. Colin, General view of molecular interaction mechanisms in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 81-112.
- [47] L. Hong, A. Felinger, K. Kaczmarski, G. Guiochon, Measurement of intraparticle diffusion in reversed phase liquid chromatography, *Chem. Eng. Sci.* 59 (2004) 3399-3412.
- [48] C. Carrara, S. Viel, C. Delaurent, F. Ziarelli, G. Excoffier, S. Caldarelli, Chromatographic NMR in NMR solvents, *J. Magn. Reson.* 194 (2008) 303-306.
- [49] C. Carrara, C. Lopez, S. Caldarelli, Chromatographic-nuclear magnetic resonance can provide a prediction of high-pressure liquid chromatography shape selectivity tests, *J. Chromatogr. A* 1257 (2012) 204-207.
- [50] M. Reddy G. N., R. Ballesteros-Garrido, J. Lacour, S. Caldarelli, Determination of labile chiral supramolecular ion pairs by chromatographic NMR spectroscopy, *Angew. Chem.-Int. Ed.* 52 (2013) 3255-3258.
- [51] S. Caldarelli, Chromatographic NMR: a tool for the analysis of mixtures of small molecules, *Magn. Reson. Chem.* 45 (2007) S48-S55.
- [52] S. Caldarelli, Chapter 5 - Chromatographic NMR. in: A.W. Graham, (Ed.), *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Academic Press, 2011, pp. 159-173.
- [53] C. Carrara, S. Caldarelli, Relative average mass transport properties of mixture components in the presence of a porous silica gel depend on the solution/solid phase ratio, *J. Phys. Chem. C* 116 (2012) 20030-20034.
- [54] R. Evans, I.J. Day, Matrix-assisted diffusion-ordered spectroscopy, *RSC Adv.* 6 (2016) 47010-47022.
- [55] G. Lucena Alcalde, R.E. Joyce, I.J. Day, Size-exclusion chromatographic NMR of polymer mixtures, *Magn. Reson. Chem.* 52 (2014) 760-763.
- [56] G. Lucena Alcalde, N. Anderson, I.J. Day, Size-exclusion chromatographic NMR under HR-MAS, *Magn. Reson. Chem.* 55 (2017) 485-491.
- [57] C. Pemberton, R. Hoffman, A. Aserin, N. Garti, New insights into silica-based NMR "chromatography", *J. Magn. Reson.* 208 (2011) 262-269.
- [58] T. González-García, T. Margola, A. Silvagni, F. Mancin, F. Rastrelli, Chromatographic NMR spectroscopy with hollow silica spheres, *Angew. Chem.-Int. Ed.* 55 (2016) 2733-2737.
- [59] K. Miyabe, Y. Matsumoto, N. Ando, Peak parking-moment analysis method for the measurement of surface diffusion coefficients, *Anal. Sci.* 25 (2009) 211-218.
- [60] K. Miyabe, G. Guiochon, Surface diffusion in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1713-1734.
- [61] M.D. Pelta, G.A. Morris, M.J. Stchedroff, S.J. Hammond, A one-shot sequence for high-resolution diffusion-ordered spectroscopy., *Magn. Reson. Chem.* 40 (2002) S147-S152.
- [62] F. Franconi, L. Lemaire, B. Siegler, J.-C. Gimel, P. Saulnier, NMR diffusometry data sampling optimization for mixture analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 148 (2018).
- [63] I.J. Lowe, R.E. Wysohn, DANTE ultrafast imaging sequence (DUFIS), *J. Magn. Reson. Ser. B* 101 (1993) 106-109.
- [64] Y.-Q. Song, X. Tang, A one-shot method for measurement of diffusion, *J. Magn. Reson.* 170 (2004) 136-148.
- [65] W. Richter, S. Lee, W.S. Warren, Q. He, Imaging with intermolecular multiple-quantum coherence in solution nuclear magnetic resonance, *Science* 267 (1995) 654-657.
- [66] M.J. Thrippleton, N.M. Loening, J. Keeler, A fast method for the measurement of diffusion coefficients: one-dimensional DOSY, *Magn. Reson. Chem.* 41 (2003) 441-447.
- [67] L. Frydman, T. Scherf, A. Lupulescu, The acquisition of multidimensional NMR spectra within a single scan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 15858-15862.
- [68] Y. Shrot, L. Frydman, Single-scan 2D DOSY NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson.* 195 (2008) 226-231.
- [69] C. Jacquemmoz, J.-N. Dumez, Acceleration of 3D DOSY NMR by spatial encoding of the chemical shift, *ChemPhysChem* 19 (2018) 3204-3210.

- [70] P. Wong, The basis of echinocytosis of the erythrocyte by glucose depletion, *Cell Biochem. Funct.* 29 (2011) 708-711.
- [71] T.A. Pertinhez, E. Casali, L. Lindner, A. Spisni, R. Baricchi, P. Berni, Biochemical assessment of red blood cells during storage by ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Identification of a biomarker of their level of protection against oxidative stress, *Blood Transf.* 12 (2014) 548-556.
- [72] M. Bessis, Red cell shapes: an illustrated classification and its rationales, *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 12 (1972) 721-746.
- [73] P.T. Callaghan, A. Coy, D. MacGowan, K.J. Packer, F.O. Zelaya, Diffraction-like effects in NMR diffusion studies of fluids in porous solids, *Nature* 351 (1991) 467-469.
- [74] P.W. Kuchel, A. Coy, P. Stilbs, NMR 'diffusion-diffraction' of water revealing alignment of erythrocytes in a magnetic field and their dimensions and membrane transport characteristics, *Magn. Reson. Med.* 37 (1997) 637-643.
- [75] A.M. Torres, R.J. Michniewicz, B.E. Chapman, G.A.R. Young, P.W. Kuchel, Characterisation of erythrocyte shapes and sizes by NMR diffusion-diffraction of water: correlations with electron micrographs, *Magn. Reson. Imag.* 16 (1998) 423-434.
- [76] A.M. Torres, A.T. Taurins, D.G. Regan, B.E. Chapman, P.W. Kuchel, Assignment of coherence features in NMR q -space plots to particular diffusion modes in erythrocyte suspensions, *J. Magn. Reson.* 138 (1999) 135-143.
- [77] P.W. Kuchel, T.R. Eykyn, D.G. Regan, Measurement of compartment size in q -space experiments: Fourier transform of the second derivative, *Magn. Reson. Med.* 52 (2004) 907-912.
- [78] K. Kirk, J.E. Raftos, P.W. Kuchel, Triethyl phosphate as an internal ^{31}P NMR reference in biological samples, *J. Magn. Reson.* 70 (1986) 484-487.
- [79] C.J. Féo, P.F. Leblond, The discocyte-echinocyte transformation: comparison of normal and ATP-enriched human erythrocytes, *Blood* 44 (1974) 639-647.
- [80] L. Backman, Shape control in the human red cell, *J. Cell. Sci.* 80 (1986) 281-298.
- [81] J. Finsterbusch, Multiple-Wave-Vector Diffusion-Weighted NMR. in: G.A. Webb, (Ed.), *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Vol 72, Elsevier Academic Press Inc, San Diego, 2010, pp. 225-299.
- [82] N. Shemesh, E. Ozarslan, P.J. Basser, Y. Cohen, Detecting diffusion-diffraction patterns in size distribution phantoms using double-pulsed field gradient NMR: Theory and experiments, *J. Chem. Phys.* 132 (2010) 12.
- [83] F. Furtado, P. Galvosas, M. Gonçalves, F.D. Kopinke, S. Naumov, F. Rodríguez-Reinoso, U. Roland, R. Valiullin, J. Kärger, The evidence of NMR diffusometry on pore space heterogeneity in activated carbon, *Microporous Mesoporous Mat.* 141 (2011) 184-191.
- [84] D. Morozov, L. Bar, N. Sochen, Y. Cohen, Measuring small compartments with relatively weak gradients by angular double-pulsed-field-gradient NMR, *Magn. Reson. Imag.* 31 (2013) 401-407.
- [85] G. Pileio, S. Ostrowska, Accessing the long-time limit in diffusion NMR: The case of singlet assisted diffusive diffraction q -space, *J. Magn. Reson.* 285 (2017) 1-7.
- [86] S. Etcheverry, M.J. Gallardo, P. Solano, M. Suwalsky, O.N. Mesquita, C. Saavedra, Real-time study of shape and thermal fluctuations in the echinocyte transformation of human erythrocytes using defocusing microscopy, *J. Biomed. Opt.* 17 (2012) 6.
- [87] S.M. Shah, O.E. Mougin, A.J. Carradus, N. Geades, R. Dury, W. Morley, P.A. Gowland, The z -spectrum from human blood at 7T, *Neuroimage* 167 (2018) 31-40.
- [88] S. Forsén, R.A. Hoffman, Study of moderately rapid chemical exchange reactions by means of nuclear magnetic double resonance, *J. Chem. Phys.* 39 (1963) 2892-2901.
- [89] H. Gilboa, B.E. Chapman, P.W. Kuchel, ^{19}F NMR magnetization transfer between 5-FBAPTA and its complexes. An alternative means for measuring free Ca^{2+} concentration, and detection of complexes with protein in erythrocytes, *NMR Biomed.* 7 (1994) 330-338.

- [90] K.M. Ward, A.H. Aletras, R.S. Balaban, A new class of contrast agents for MRI based on proton chemical exchange dependent saturation transfer (CEST), *J. Magn. Reson.* 143 (2000) 79-87.
- [91] J. Zhou, J.-F. Payen, D.A. Wilson, R.J. Traystman, P.C.M. van Zijl, Using the amide proton signals of intracellular proteins and peptides to detect pH effects in MRI, *Nat. Med.* 9 (2003) 1085-1090.
- [92] J. Zhou, P.C.M. van Zijl, Chemical exchange saturation transfer imaging and spectroscopy, *Prog. Nucl. Magn. Reson.* 48 (2006) 109-136.
- [93] P.C.M. van Zijl, C.K. Jones, J. Ren, C.R. Malloy, A.D. Sherry, MRI detection of glycogen *in vivo* by using chemical exchange saturation transfer imaging (glycoCEST), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007) 4359-4364.
- [94] A.D. Sherry, M. Woods, Chemical exchange saturation transfer contrast agents for magnetic resonance imaging, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 10 (2008) 391-411.
- [95] P.C.M. van Zijl, N.N. Yadav, Chemical exchange saturation transfer (CEST): What is in a name and what isn't?, *Magn. Reson. Med.* 65 (2011) 927-948.
- [96] G. Liu, X. Song, K.W.Y. Chan, M.T. McMahon, Nuts and bolts of chemical exchange saturation transfer MRI, *NMR Biomed.* 26 (2013) 810-828.
- [97] J. Kim, Y. Wu, Y. Guo, H. Zheng, P.Z. Sun, A review of optimization and quantification techniques for chemical exchange saturation transfer MRI toward sensitive *in vivo* imaging, *Contrast Media Mol. Imaging* 10 (2015) 163-178.
- [98] Chemical exchange saturation transfer imaging: Advances and applications, Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., Singapore, 2017.
- [99] M. Kim, J. Gillen, B.A. Landman, J. Zhou, P.C.M. van Zijl, Water saturation shift referencing (WASSR) for chemical exchange saturation transfer (CEST) experiments, *Magn. Reson. Med.* 61 (2009) 1441-1450.
- [100] J. Närväinen, P.L. Hubbard, R.A. Kauppinen, G.A. Morris, Z-spectroscopy with alternating-phase irradiation, *J. Magn. Reson.* 207 (2010) 242-250.
- [101] J. Windschuh, M. Zaiss, J.-E. Meissner, D. Paech, A. Radbruch, M.E. Ladd, P. Bachert, Correction of B_1 -inhomogeneities for relaxation-compensated CEST imaging at 7 T, *NMR Biomed.* 28 (2015) 529-537.
- [102] P. Schuenke, J. Windschuh, V. Roeloffs, M.E. Ladd, P. Bachert, M. Zaiss, Simultaneous mapping of water shift and B_1 (WASABI)—Application to field-Inhomogeneity correction of CEST MRI data, *Magn. Reson. Med.* 77 (2017) 571-580.
- [103] P.C.M. van Zijl, W.W. Lam, J. Xu, L. Knutsson, G.J. Stanisz, Magnetization transfer contrast and chemical exchange saturation transfer MRI. Features and analysis of the field-dependent saturation spectrum, *Neuroimage* (2017).
- [104] M. Zaiss, B. Schmitt, P. Bachert, Quantitative separation of CEST effect from magnetization transfer and spillover effects by Lorentzian-line-fit analysis of z-spectra, *J. Magn. Reson.* 211 (2011) 149-155.
- [105] M. Zaiss, Z. Zu, J. Xu, P. Schuenke, D.F. Gochberg, J.C. Gore, M.E. Ladd, P. Bachert, A combined analytical solution for chemical exchange saturation transfer and semi-solid magnetization transfer, *NMR Biomed.* 28 (2015) 217-230.
- [106] T. Jin, P. Wang, X. Zong, S.-G. Kim, MR imaging of the amide-proton transfer effect and the pH-insensitive nuclear overhauser effect at 9.4 T, *Magn. Reson. Med.* 69 (2013) 760-770.
- [107] I.Y. Zhou, E. Wang, J.S. Cheung, D. Lu, Y. Ji, X. Zhang, G. Fulci, P.Z. Sun, Direct saturation-corrected chemical exchange saturation transfer MRI of glioma: Simplified decoupling of amide proton transfer and nuclear overhauser effect contrasts, *Magn. Reson. Med.* 78 (2017) 2307-2314.
- [108] D.J.A. Jenkins, T.M.S. Wolever, R.H. Taylor, H. Barker, H. Fielden, J.M. Baldwin, A.C. Bowling, H.C. Newman, A.L. Jenkins, D.V. Goff, Glycemix index of foods - A physiological-basis for carbohydrate exchange, *Am. J. Clin. Nutr.* 34 (1981) 362-366.

- [109] T.M. Wolever, D.J. Jenkins, A.L. Jenkins, R.G. Josse, The glycemic index: methodology and clinical implications, *Am. J Clin. Nutr.* 54 (1991) 846-854.
- [110] N.L. Soh, J. Brand-Miller, The glycaemic index of potatoes: the effect of variety, cooking method and maturity, *Eur. J. Clin. Nutr.* 53 (1999) 249-254.
- [111] L. Sokoloff, M. Reivich, C. Kennedy, M.H. Desrosiers, C.S. Patlak, K.D. Pettigrew, O. Sakurada, M. Shinohara, The [¹⁴C]deoxyglucose method for measurement of local cerebral glucose-utilization - theory, procedure, and normal values in conscious and anesthetized albino-rat, *J. Neurochem.* 28 (1977) 897-916.
- [112] S. Walker-Samuel, R. Ramasawmy, F. Torrealdea, M. Rega, V. Rajkumar, S.P. Johnson, S. Richardson, M. Gonçalves, H.G. Parkes, E. Årstad, D.L. Thomas, R.B. Pedley, M.F. Lythgoe, X. Golay, *In vivo* imaging of glucose uptake and metabolism in tumors, *Nat. Med.* 19 (2013) 1067.
- [113] M. Rivlin, J. Horev, I. Tsarfaty, G. Navon, Molecular imaging of tumors and metastases using chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI, *Sci. Rep.* 3 (2013) 3045.
- [114] K.W.Y. Chan, M.T. McMahon, Y. Kato, G. Liu, J.W.M. Bulte, Z.M. Bhujwalla, D. Artemov, P.C.M. van Zijl, Natural D-glucose as a biodegradable MRI contrast agent for detecting cancer, *Magn. Reson. Med.* 68 (2012) 1764-1773.
- [115] A.W. Overhauser, Polarization of nuclei in metals, *Phys. Rev.* 92 (1953) 411-415.
- [116] T.R. Carver, C.P. Slichter, Experimental verification of the Overhauser nuclear polarization effect, *Phys. Rev.* 102 (1956) 975.
- [117] A. Abragam, M. Goldman, Principles of dynamic nuclear-polarization, *Rep. Prog. Phys.* 41 (1978) 395-467.
- [118] P. Miéville, S. Jannin, L. Helm, G. Bodenhausen, NMR of insensitive nuclei enhanced by dynamic nuclear polarization, *Chimia* 65 (2011) 260-263.
- [119] J.H. Ardenkjær-Larsen, B. Fridlund, A. Gram, G. Hansson, L. Hansson, M.H. Lerche, R. Servin, M. Thaning, K. Golman, Increase in signal-to-noise ratio of > 10,000 times in liquid-state NMR, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 10158-10163.
- [120] K. Golman, R. in 't Zandt, M. Thaning, Real-time metabolic imaging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 11270-11275.
- [121] M.R. Clatworthy, M.I. Kettunen, D.-E. Hu, R.J. Mathews, T.H. Witney, B.W.C. Kennedy, S.E. Bohndiek, F.A. Gallagher, L.B. Jarvis, K.G.C. Smith, K.M. Brindle, Magnetic resonance imaging with hyperpolarized [1,4-¹³C₂]fumarate allows detection of early renal acute tubular necrosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (2012) 13374-13379.
- [122] S.E. Bohndiek, M.I. Kettunen, D.-e. Hu, B.W.C. Kennedy, J. Boren, F.A. Gallagher, K.M. Brindle, Hyperpolarized [1-¹³C]-ascorbic and dehydroascorbic acid: Vitamin C as a probe for imaging redox status *in vivo*, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 11795-11801.
- [123] L. Mazuel, R.F. Schulte, A. Cladière, C. Spéziale, M. Lagrée, M. Lereboure, B. Jean, F. Durif, C. Chassain, Intracerebral synthesis of glutamine from hyperpolarized glutamate, *Magn. Reson. Med.* 78 (2017) 1296-1305.
- [124] J.G. Skinner, L. Menichetti, A. Flori, A. Dost, A.B. Schmidt, M. Plaumann, F.A. Gallagher, J.-B. Hövener, Metabolic and molecular imaging with hyperpolarised tracers, *Mol. Imaging Biol.* 20 (2018) 902-918.
- [125] R.L. Hesketh, K.M. Brindle, Magnetic resonance imaging of cancer metabolism with hyperpolarized ¹³C-labeled cell metabolites, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 45 (2018) 187-194.
- [126] S. Reynolds, H. Patel, Monitoring the solid-state polarization of ¹³C, ¹⁵N, ²H, ²⁹Si and ³¹P, *Appl. Magn. Reson.* 34 (2008) 495-508.
- [127] L. Lumata, A.K. Jindal, M.E. Merritt, C.R. Malloy, A.D. Sherry, Z. Kovacs, DNP by thermal mixing under optimized conditions yields >60 000-fold enhancement of ⁸⁹Y NMR signal, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 8673-8680.
- [128] L. Lumata, M.E. Merritt, Z. Hashami, S.J. Ratnakar, Z. Kovacs, Production and NMR characterization of hyperpolarized ^{107,109}Ag complexes, *Angew. Chem.-Int. Ed.* 51 (2012) 525-527.

- [129] W.N. Jiang, L. Lumata, W. Chen, S.R. Zhang, Z. Kovacs, A.D. Sherry, C. Khemtong, Hyperpolarized N-15-pyridine derivatives as pH-sensitive MRI agents, *Sci. Rep.* 5 (2015) 6.
- [130] L. Lumata, M.E. Merritt, C.R. Malloy, A.D. Sherry, Z. Kovacs, Impact of Gd³⁺ on DNP of [1-¹³C]Pyruvate doped with trityl OX063, BDPA, or 4-oxo-TEMPO, *J. Phys. Chem. A* 116 (2012) 5129-5138.
- [131] L. Lumata, Z. Kovacs, A.D. Sherry, C. Malloy, S. Hill, J. van Tol, L. Yu, L. Song, M.E. Merritt, Electron spin resonance studies of trityl OX063 at a concentration optimal for DNP, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 9800-9807.
- [132] L. Lumata, M.E. Merritt, Z. Kovacs, Influence of deuteration in the glassing matrix on ¹³C dynamic nuclear polarization, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 7032-7035.
- [133] D. Merunka, M. Kveder, M. Jokić, B. Rakvin, Effect of glassy modes on electron spin–lattice relaxation in solid ethanol, *J. Magn. Reson.* 228 (2013) 50-58.
- [134] F. Jähnig, G. Kwiatkowski, M. Ernst, Conceptual and instrumental progress in dissolution DNP, *J. Magn. Reson.* 264 (2016) 22-29.
- [135] A. Bornet, S. Jannin, Optimizing dissolution dynamic nuclear polarization, *J. Magn. Reson.* 264 (2016) 13-21.
- [136] S. Jannin, A. Bornet, S. Colombo, G. Bodenhausen, Low-temperature cross polarization in view of enhancing dissolution Dynamic Nuclear Polarization in NMR, *Chem. Phys. Lett.* 517 (2011) 234-236.
- [137] A. Bornet, R. Melzi, A.J. Perez Linde, P. Hautle, B. van den Brandt, S. Jannin, G. Bodenhausen, Boosting dissolution dynamic nuclear polarization by cross polarization, *J. Phys. Chem. Lett.* 4 (2013) 111-114.
- [138] J. Milani, B. Vuichoud, A. Bornet, P. Miéville, R. Mottier, S. Jannin, G. Bodenhausen, A magnetic tunnel to shelter hyperpolarized fluids, *Rev. Sci. Instrum.* 86 (2015) 024101.
- [139] T. Cheng, M. Mishkovsky, J.A.M. Bastiaansen, O. Ouari, P. Hautle, P. Tordo, B. van den Brandt, A. Comment, Automated transfer and injection of hyperpolarized molecules with polarization measurement prior to *in vivo* NMR, *NMR Biomed.* 26 (2013) 1582-1588.
- [140] M. Durst, U. Koellisch, A. Frank, G. Rancan, C.V. Gringeri, V. Karas, F. Wiesinger, M.I. Menzel, M. Schwaiger, A. Haase, R.F. Schulte, Comparison of acquisition schemes for hyperpolarised ¹³C imaging, *NMR Biomed.* 28 (2015) 715-725.
- [141] A. Comment, Dissolution DNP for *in vivo* preclinical studies, *J. Magn. Reson.* 264 (2016) 39-48.
- [142] P.J. Mulquiney, P.W. Kuchel, Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations: equations and parameter refinement, *Biochem. J.* 342 (1999) 581-596.
- [143] S.E. Day, M.I. Kettunen, F.A. Gallagher, D.-E. Hu, M. Lerche, J. Wolber, K. Golman, J.H. Ardenkjær-Larsen, K.M. Brindle, Detecting tumor response to treatment using hyperpolarized ¹³C magnetic resonance imaging and spectroscopy, *Nat. Med.* 13 (2007) 1382-1387.
- [144] T. Harris, G. Eliyahu, L. Frydman, H. Degani, Kinetics of hyperpolarized ¹³C₁-pyruvate transport and metabolism in living human breast cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009) 18131-18136.
- [145] V. Breukels, K.F.J. Jansen, F.H.A. van Heijster, A. Capozzi, P.J.M. van Bentum, J.A. Schalken, A. Comment, T.W.J. Scheenen, Direct dynamic measurement of intracellular and extracellular lactate in small-volume cell suspensions with ¹³C hyperpolarised NMR, *NMR Biomed.* 28 (2015) 1040-1048.
- [146] C.J. Daniels, M.A. McLean, R.F. Schulte, F.J. Robb, A.B. Gill, N. McGlashan, M.J. Graves, M. Schwaiger, D.J. Lomas, K.M. Brindle, F.A. Gallagher, A comparison of quantitative methods for clinical imaging with hyperpolarized ¹³C-pyruvate, *NMR Biomed.* 29 (2016) 387-399.
- [147] F. Wiesinger, E. Weidl, M.I. Menzel, M.A. Janich, O. Khegai, S.J. Glaser, A. Haase, M. Schwaiger, R.F. Schulte, IDEAL spiral CSI for dynamic metabolic MR imaging of hyperpolarized [1-¹³C]pyruvate, *Magn. Reson. Med.* 68 (2012) 8-16.

- [148] T. Jézéquel, C. Deborde, M. Maucourt, V. Zhendre, A. Moing, P. Giraudeau, Absolute quantification of metabolites in tomato fruit extracts by fast 2D NMR, *Metabolomics* (2015) 1-12.

ABREVIATIONS

ADC	Apparent Diffusion Coefficient Coefficient de diffusion apparent
ATP	Adénosine TriPhosphate
CAP 20-25	Clermont Auvergne Project 2020-2025
CEPIA	Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture
CEST	Chemical Exchange Saturation Transfer Transfert d'aimantation saturée par échange chimique
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CP	Cross Polarization Polarisation croisée
CPER	Contrat de Plan Etat-Région
2DG	2-DéoxyGlucose
2DG-6P	2-DéoxyGlucose-6-Phosphate
DNP	Dynamic Nuclear Polarization Polarisation nucléaire dynamique
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
FDG	FluoroDésoxyGlucose
GI	Glycaemic Index Indice glycémique
I-SITE	Initiative Science Innovation Territoires Economie
INRA	Institut National de la Recherche en Agronomie
IRMf	Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle
FmR α	Fall minus Rise (at height) α
HRMAS	High Resolution Magic Angle Spinning
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique (nucléaire)
LDH	Lactate DesHydrogénase
MAS	Magic Angle Spinning Rotation à l'angle magique
MCMC	Markov Chain Monte Carlo Monte-Carlo par chaînes de Markov
MTR _{asym}	Magnetization Transfer Ratio asymmetry Ratio d'asymétrie du transfert d'aimantation OU facteur d'asymétrie
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH	Forme réduite de NAD
NOE	Nuclear Overhauser Effect
ODS	OctaDécylSilane
PFG	Pulsed Field Gradient Gradient de champ magnétique pulsé
QuaPA	Qualité des Produits Animaux
RF	Radiofréquence
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SRM	Spectroscopie de Résonance Magnétique
TEP	Tomographie par Emission de Positrons
WASSR	Water Saturation Shift Referencing

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des phases chromatographiques utilisées.....	48
Tableau 2 : Estimation des différents paramètres du modèle permettant de régresser les données présentées sur la Figure 27.	75

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Première séquence d'impulsions proposée pour mesurer les coefficients de diffusion. Les lignes RF et G représentent respectivement les impulsions radiofréquences et celles de gradients de champ magnétique. La séquence RF est un écho de spin classique (90- τ -180- τ -Acquisition). Les deux impulsions de gradients sont de même aire ($g \times \delta$) mais leur effet sur les spins est inversé grâce à l'impulsion RF à 180°. Les molécules diffusent pendant le temps Δ . Figure adaptée de **P39**. 41
- Figure 2** : Illustration du déroulé d'une expérience de RMN de diffusion sur un échantillon d'herbe de cannabis dissout dans du CDCl₃ enregistré sur un spectromètre RMN ayant une fréquence de Larmor de 400 MHz pour le ¹H. (A) Des spectres sont enregistrés avec différentes intensités de gradients g . (B) L'intensité du signal RMN en fonction des paramètres expérimentaux permet de remonter à l'ADC (pour une identification des signaux tracés en rouge et bleu, voir la projection sur spectre dans la partie C). (C) Une analyse de l'ensemble du spectre permet d'isoler le spectre RMN de chacun des composés du mélange (ici, traitement des données de type DOSY). Figure adaptée de **P39**. 42
- Figure 3** : Représentation d'un rotor RMN aligné le long du champ magnétique B_0 puis basculé et mis en rotation à l'angle magique. Figure adaptée de ma thèse. 44
- Figure 4** : Cartes DOSY d'un mélange de benzène, naphthalène et anthracène dissout dans de l'acétonitrile enregistré (A) sans et (B) avec une phase chromatographique ODS. Les échelles de diffusion sont en unité logarithmique ; les coefficients de diffusion les plus rapides sont donc en bas de la carte 2D. Figure adaptée de **P3**. 45
- Figure 5** : Cartes DOSY de la série homologue des cétones obtenues dans l'acétonitrile deutérié (A) sans et (B) avec une phase chromatographique ODS. Dû à des problèmes de superposition de signaux, les cartes DOSY ont été enregistrées pour chacune des molécules seules puis superposées. Figure adaptée de **P3**. 46
- Figure 6** : Représentation des résultats obtenus avec deux différentes compositions de l'éluant pour la série homologue des (A) aromatiques et (B) cétones. Les résultats sont représentés de telle sorte à pouvoir être comparé avec un chromatogramme. Figure adaptée de **P3**. 47
- Figure 7** : Illustration résumant les résultats sur la comparaison de l'effet du greffage en CLHP et en « RMN Chromatographique ». Cette illustration a été publiée en tant que page interne de couverture de la partie communication du numéro d'*Angewandte Chemie, International Edition* dans lequel a été publié l'article **P5**. 48
- Figure 8** : Cartes DOSY obtenues avec la série homologue aromatiques dissoute dans un mélange d'acétonitrile deutérié (A) sans et avec une phase chromatographique ODS (B) non poreuse et (C) poreuse (100Å). Figure adaptée de ma thèse. 49
- Figure 9** : Cartes DOSY obtenues avec la série homologue aromatiques dissoute dans un mélange d'acétonitrile deutérié (A) sans et avec une phase chromatographique vierge (B) non poreuse et (C) poreuse (100Å). Figure adaptée de ma thèse. 49
- Figure 10** : Représentation schématique des trois options pour choisir l'échantillonnage de l'intensité des PFG. La quatrième approche, la semi-gaussienne, est l'échantillonnage que j'ai proposé pour étudier les mélanges complexes. Figure adaptée de **P36**. 51
- Figure 11** : Intensité du signal RMN en fonction de l'intensité des PFG pour des rampes (verte) linéaire, (noire) quadratique, (rouge) exponentielle et (bleue) semi-gaussienne enregistré sur une gélule Esoméprazole Cristers dont le contenant a été dissout dans du DMSO-d₆ pour le signal (A) du principe actif (singulet à 8,24 ppm) et (B) la région entre 1,45 et 0,98 ppm contenant un mélange de

- molécules. Les régressions ont été réalisées avec un modèle (A) mono- et (B) bi-exponentiel. Pour des facilités de lecture, les rampes de gradients ont été translattées de 2 G.cm^{-1} entre chaque rampe. Figure adaptée de **P36**..... 53
- Figure 12** : Carte DOSY de l'Esoméprazole 40 mg fabriqué par TEVA obtenue par un échantillonnage des PFG en utilisant une rampe semi-gaussienne. Le copolymère est composé d'acide métacrylique et d'écrylate d'éthyl. Figure adaptée de **P36**. 53
- Figure 13** : Chronogramme de la séquence proposée par Pelta et al. [61]. Les deux impulsions de gradients bipolaires ont une intensité différente d'un facteur $\pm\alpha$. Les différents termes ont été définis dans la Figure 1..... 55
- Figure 14** : Décroissance du signal RMN de l'eau dans une suspension d'érythrocytes (taux d'hématocrite 70%) en fonction de l'intensité des PFG (représentée par la valeur q). Espace- q enregistré avec (carrés rouge) une séquence PFG classique en 40 min et (triangles bleus) une séquence PFG rapide en 5 min. Figure adaptée de **P9**..... 57
- Figure 15** : Décroissance du signal RMN de l'eau enregistrée avec une séquence PFG rapide et dans une suspension d'érythrocytes (taux d'hématocrite 70%) ayant une forme (carrés rouges) de discocyte ou (triangles bleus) de sphérocyte. Figure adaptée de **P9**..... 57
- Figure 16** : Spectres RMN du ^{31}P en fonction du temps écoulé après arrêt de la glycolyse par du fluorure de sodium enregistrés sur une solution d'érythrocytes à 70% et à une température de 37°C . Le pourcentage de discocytes (rouge) et la quantité d'ATP en fonction du temps sont représentés dans l'insert. Figure adaptée de **P9**..... 58
- Figure 17** : Illustration schématique de la consommation de glucose en aérobie. Le glucose est converti en pyruvate par la glycolyse. Ce dernier est transformé en acétyl-CoA avant d'intégrer le cycle de Krebs. Figure issue de http://teachtogether.chedk12.com/teaching_guides/view/142 (lien en date du 18/01/2019) 60
- Figure 18** : Illustration du principe du CEST. (A) Spectre RMN théorique (gauche) avant et (droite) après saturation à 8,25 ppm. (B) En mesurant l'intensité du signal de l'eau lorsque la saturation est réalisée à plusieurs offsets, le spectre-Z est enregistré. (C) Celui-ci peut être analysé par asymétrie pour quantifier l'échange chimique. Figure adaptée de [95]. 62
- Figure 19** : Spectre-Z réalisé à 37°C (bleu) d'un tampon acétate à 2 mmol.L^{-1} , (rouge) d'amidon de riz (concentration équivalente en glucose 100 mmol.L^{-1}) autoclavé avec un tampon d'acétate et (noir) de 100 mmol.L^{-1} de glucose en solution dans le tampon acétate. Le spectre RMN du glucose est superposé le long de l'axe des offsets. Figure adaptée de **P15**. 64
- Figure 20** : Evolution de la concentration d' α - et β -glucose en fonction du temps tel que mesuré par RMN CEST. La régression des données a été effectuée avec le système d'équation approprié. Figure adaptée de **P15**..... 65
- Figure 21** : (A) Pour illustrer l'effet de la digestion sur le spectre-Z, différents tubes ont été préparés contenant chacun une concentration équivalente de 100 mmol.L^{-1} de glucose dans un tampon acétate. Les concentrations en glucose libre sont de (rouge) 0, (orange) 10, (jaune) 40, (vert) 60, (bleu) 90 et (violet) 100 mmol.L^{-1} ; le complément pour atteindre la concentration finale est obtenu en ajoutant de l'amidon autoclavé. (B) Suivi cinétique de la digestion de l'amidon par la glucoamylase obtenue par RMN (bleu) CPMG et (rouge) CEST. Figure adaptée de **P15**. 65
- Figure 22** : (A) Images GlucoCEST d'une coupe du cerveau d'un rat en fonction du temps suivant l'injection de 2DG (quantité injectée spécifiée en haut de la série d'images). L'image anatomique est représentée en

niveaux de gris sur la gauche. (B) Spectre du ^{31}P enregistré (bleu) sans et (rouge) 38 minutes après l'injection de $1,0 \text{ g.kg}^{-1}$ de 2DG et réalisé sur l'ensemble du cerveau. Le signal du 2DG-6P n'est présent que lorsque le 2DG est injecté. Figure adaptée de P26	67
Figure 23 : Images GlucoCEST d'une coupe de cerveau de rat en fonction du temps, lorsque le D-glucose est (haut) perfusé dans l'animal, (milieu) injecté en une fois ou lorsque le L-glucose est injecté. Figure adaptée de P26	68
Figure 24 : Aimantation théorique d'un électron et d'un proton dans un champ magnétique de 3,35 T. Le principe de la DNP est de transférer de la polarisation depuis l'électron vers le proton (flèche rouge). Figure adaptée de [118].	70
Figure 25 : Décroissance du signal RMN hyperpolarisé d'un spin ayant un temps de relaxation T_1 de 40 s en (rouge) absence et (bleu) présence d'impulsions RF de lecture à 4° appliquées toutes les secondes. L'insert illustre la perte discrète d'aimantation due aux impulsions RF. Figure adaptée de P25	72
Figure 26 : Représentation d'un modèle cinétique simple qui doit être mis en œuvre pour mesurer les constantes lorsque les molécules sont hyperpolarisées. * dénote que la substance est hyperpolarisée. Figure adaptée de P25	73
Figure 27 : Suivi cinétique en RMN du ^{13}C de la production de lactate après ajout de pyruvate hyperpolarisé dans un lysat d'érythrocytes. (A) Spectres RMN en fonction du temps (30 mM NADH) et (B) évolution de l'intensité du signal RMN du lactate en fonction du temps et de la concentration en NADH lorsque 80 mM de pyruvate sont ajoutés au lysat. Figure adaptée de P33	74
Figure 28 : Evolution de la concentration des différents métabolites après ajout de 80 mM de pyruvate hyperpolarisé dans un lysat d'érythrocytes (points). Les lignes représentent la meilleure régression des données avec un modèle complet. La partie (B) de la figure est un zoom sur l'axe y de (A). Figure adaptée de P33	75
Figure 29 : Illustration de la méthode FmR_α . A partir de trois mesures sur l'évolution temporelle des signaux RMN d'un substrat (S_1) et d'un produit (S_2), il est possible de déterminer T_1 et k_1 . Figure adaptée de P35	76
Figure 30 : Représentation de mes différentes expériences de recherche avec les compétences acquises (texte noir) et les domaines d'applications (texte bleu). Les flèches rouges illustrent les endroits où j'ai acquis les compétences qui m'ont permis d'obtenir de nouveaux contrats de travail.	78
Figure 31 : Représentation schématique du projet de recherche et de ses interactions. Les financements des différentes parties sont représentés dans le cadre projet de recherche. Les couleurs verte et rouge représentent des thématiques liées à l'INRA ou aux sciences du vivant, respectivement. Le financement entre parenthèse de l'ANR n'est pas acquis à l'heure de la finalisation de ce manuscrit	82
Figure 32 : Exemples de résultats préliminaires obtenus avec notre instrument de RMN <i>in situ</i> . (A) L'IRM <i>in situ</i> avec son vecteur de transport en train de réaliser une mesure sur un arbre. (B) Extraction du flux de xylème (valeurs positives = flux du bas vers le haut) après une analyse par asymétrie du propagateur brut à une profondeur de 1 cm. (C) Mesure de la teneur en eau (ronds bleus) dans le rhizotron représenté en photo (le carré rouge représentant le lieu de mesure) pendant plusieurs jours (rectangles jaunes) et nuits (zones grisées). La teneur en eau a tendance à diminuer pendant la journée (transpiration) et à augmenter (stockage) durant la nuit. Figure adaptée du projet OutLabMRI, déposé à l'appel à projet 2019 de l'ANR.....	89

Figure 33 : Organigramme organisationnel du projet OutLabMRI soumis à l'appel à projet générique 2019 de l'ANR.....	89
--	----

Résumé :

Ce mémoire décrit une synthèse de mes activités de recherche réalisées ces quinze dernières années ainsi que l'orientation que je souhaite apporter à mes travaux. La première partie est une présentation de mon parcours professionnel, des encadrements effectués ainsi que de la valorisation de mon travail.

Le manuscrit continue avec la description de mon activité de recherche qui est basée sur le développement de méthodes en résonance magnétique nucléaire (RMN) pour étudier des milieux complexes. J'ai choisi de focaliser mon mémoire sur les trois thématiques principales sur lesquelles j'ai travaillées. Dans un premier temps, je m'intéresse à l'apport de la mobilité moléculaire pour étudier différents systèmes. Ensuite, je me focalise sur l'application d'un contraste basé sur l'échange chimique pour étudier la production/consommation de glucose dans différents systèmes. Je termine ce paragraphe en montrant la difficulté à extraire des informations quantitatives depuis un spectre RMN acquis à partir de molécules hyperpolarisées.

La dernière partie du document décrit mon projet de recherche, constitué autour de deux thématiques : les contrastes métaboliques en imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'IRM *in situ*. Ce projet de recherche est basé sur mes compétences décrites dans la partie précédente ainsi que sur mon environnement de travail.

Abstract:

This manuscript contains a summary of my research activities followed by a presentation of my future work. In the first section, I describe my different professional activities, student supervising as well as the outputs of my work.

In the second chapter, I present my work which was based on the development of new methods in nuclear magnetic resonance (NMR) to study complex systems. I focus on three themes. First, I describe how characterizing the molecular mobility leads to useful information on the system. Secondly, I demonstrate how a contrast based on chemical exchange can be implemented to study glucose consumption or production. Finally, I present the difficulty to extract quantitative data from NMR data recorded thanks to a hyperpolarized metabolites.

The last chapter of this manuscript describes my future work. This research project has been built around two themes: metabolic contrasts in MRI and *in situ* MRI. This new orientations have been chosen by combining my skills and expertise as well as my research environment.