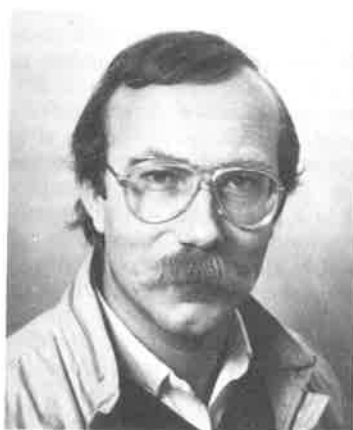


Applications de la résonance magnétique nucléaire haute résolution du phosphore 31 à l'étude physiologique et biochimique de tissus vivants

par Gaston Vermeersch ¹, Gérard Palavit ² et Xavier Marchandise ³

(¹ Laboratoire de physique, Faculté de Pharmacie, Université de Lille II, 59045 Lille Cedex; ² Laboratoire de chimie appliquée, Université des Sciences et Techniques de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex; ³ Laboratoire de biophysique, Faculté de Médecine, Université de Lille II, 59045 Lille Cedex)



G. Vermeersch



G. Palavit



X. Marchandise

Introduction

La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) est, depuis plus de vingt ans, l'une des méthodes analytiques les plus puissantes à la disposition des chimistes et a, ces vingt dernières années, fait irruption chez les biochimistes. Il était inévitable qu'elle trouve son application dans le domaine de la physiologie.

Son utilisation pour l'étude des tissus vivants et des organes est à la fois simple et complexe. Simple par le fait que l'analyse d'un fragment de tissu est facile et ne demande qu'un équipement relativement peu spécialisé; complexe, car l'interprétation des données pose nombre de problèmes expérimentaux et théoriques.

Le champ d'activité de cette R.M.N. *in vivo* s'élargit de jour en jour. Il consiste en l'examen de colonies de cellules, de tissus, de muscles ou d'organes entiers maintenus en vie dans le tube de R.M.N. Le centre d'intérêt de ces études est le métabolisme cellulaire; elles donnent la possibilité d'en suivre en temps réel les grandes lignes, ce qu'aucune autre méthode ne permettrait de faire. C'est une R.M.N. de haute résolution en ce sens que les espèces sur lesquelles elle renseigne sont en solution dans le cytoplasme ou le fluide vacuolaire des cellules et qu'on les identifie par les déplacements chimiques de leurs différents groupements fonctionnels.

Nous avons donc axé cet article sur l'utilisation, dans ce domaine, de la R.M.N. du phosphore 31, bien que d'autres noyaux soient exploités, et, après avoir justifié le choix du noyau ³¹P pour l'étude des tissus vivants, nous avons entrepris une revue des principaux travaux effectués à ce jour sur différents organes, travaux qui ont démontré que cette technique non destructive, non ionisante et surtout non invasive (qui ne nécessite pas de chirurgie) pouvait permettre aujourd'hui aux cliniciens l'étude des concentrations des métabolites et du pH intracellulaire chez l'homme et, dans un proche futur, se présenter comme une méthode inoffensive de diagnostic réellement originale et compétitive.

Choix du phosphore 31

Il est juste de se demander pourquoi les différents groupes de recherche ont initialement considéré le ³¹P comme le noyau le plus adapté à l'étude par R.M.N. des tissus.

Pour obtenir des spectres de haute résolution dans des systèmes aussi anisotropiques que ceux rencontrés normalement dans les organes et tissus vivants, il ne faut prendre en considération que les noyaux possédant un spin 1/2. En effet, les noyaux ayant un moment magnétique quadrupolaire donneront des raies élargies par l'interaction des noyaux quadrupolaires avec les gradients de champ électrique présents dans l'échantillon. Par conséquent, les noyaux pouvant être étudiés sont les suivants : ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P . Leurs propriétés magnétiques sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Noyau	Fréquence R.M.N., en MHz, pour un champ de 10 kilogauss (1T)	Abondance naturelle %	Moment magnétique μ	Sensibilité relative à champ constant
^1H	42,756	99,9844	2,792 68	1,000
^{13}C	10,705	1,108	0,702 20	$1,59 \cdot 10^{-2}$
^{15}N	4,315	0,365	— 0,283 04	$1,04 \cdot 10^{-3}$
^{31}P	7,236	100	1,130 5	$6,64 \cdot 10^{-2}$

La concentration nucléaire, la sensibilité et des considérations expérimentales réduisent cette liste en réalité à ^1H , ^{13}C et ^{31}P . Le proton est le plus intéressant du point de vue de la sensibilité et de la concentration. Malheureusement, la gamme des déplacements chimiques est très petite (de l'ordre de 5 ppm pour la plupart des protons présents dans les molécules biologiques (chaînes longues)). De plus, il faut une homogénéité de l'ordre de 10^{-8} sur tout le volume de l'échantillon pour permettre une étude détaillée des déplacements chimiques et une telle homogénéité de champ est pratiquement impossible pour de grands échantillons biologiques. En revanche, le ^{31}P bénéficie d'une gamme plus étendue de déplacements chimiques (~ 30 ppm pour les phosphates biologiques). De plus, les raies peuvent être résolues avec des homogénéités de champ de l'ordre de 10^{-7} qui sont facilement obtenues pour des champs jusqu'à 2 T. En outre, le déplacement chimique du signal d'un composé phosphoré donné est un indicateur sensible de l'environnement du noyau. Par exemple, les signaux obtenus pour des phosphates sous différents états d'ionisation apparaissent à des fréquences différentes, alors que les mélanges de ces mêmes phosphates donnent des signaux à des valeurs intermédiaires à cause de l'échange chimique rapide. On pourra donc déterminer facilement, à partir du déplacement chimique des phosphates, le pH apparent de leur environnement. D'autres interactions, comme la chélation des phosphates par des ions métalliques, se traduisent aussi par des spectres particuliers.

Le ^{13}C possède une gamme de déplacements chimiques encore plus étendue (~ 200 ppm) et, malgré sa faible abondance naturelle et sa sensibilité médiocre, on peut obtenir des spectres utilisables en quelques minutes.

R.M.N. du phosphore 31 des différents composants du sang

1. Étude par R.M.N. du phosphore 31 des globules rouges intacts

Moon et Richards (1) ont montré en 1973 :

- que l'on pouvait détecter le 2,3-diphosphoglycérate (D.P.G.) et le phosphate inorganique intra-érythrocytaire et en mesurer la concentration par R.M.N. du ^{31}P ;
- que le pH intra-érythrocytaire pouvait être évalué à partir des fréquences de résonance des pics de 2,3-diphosphoglycérate et du phosphate inorganique.

Ils ont aussi montré que le P_i dans le tampon avait un pH différent de celui situé dans la cellule. En effet, leurs signaux R.M.N. respectifs sont séparés de 0,2 ppm.

Un peu plus tard, une autre équipe (2) a publié une étude plus importante sur les globules rouges. Elle a détecté, en plus, les trois

raies des phosphores de l'A.T.P. dans les érythrocytes humains et a démontré que les pics préalablement attribués à la membrane des globules rouges étaient dus aux lipides du sérum. L'interaction connue entre l'hémoglobine et le D.P.G. peut entraîner des perturbations pouvant rendre difficile la détermination du pH à partir du déplacement chimique du D.P.G. et il faut en tenir compte (3). De plus, on a signalé qu'il peut y avoir une cause d'erreur si le D.P.G. est lié à d'autres composants cellulaires (4) et, en 1976, il a été montré que les déplacements chimiques du D.P.G. varient aussi avec la forme de la membrane des érythrocytes (5).

Nous venons donc de montrer que le ^{13}C et le ^{31}P sont des noyaux valables d'un point de vue R.M.N. Il s'agit maintenant de voir s'ils sont ou non utiles pour les biologistes. En d'autres termes, existe-t-il, dans les systèmes vivants, des processus importants dans lesquels ces noyaux interviennent ? La réponse est oui, surtout pour le ^{31}P . Il y a en effet d'importantes raisons biologiques de choisir le ^{31}P .

La première raison est que le phosphore n'apparaît dans la matière vivante que sous un nombre relativement limité de molécules distinctes et n'a pas l'ubiquité des protons. Ceci permet d'observer des raies discrètes en nombre relativement réduit dans un organe aussi complexe qu'une cellule vivante. De plus, les seules molécules qui sont observées par cette technique de R.M.N. des liquides sont des petits métabolites phosphorés (A.T.P., A.D.P., G.T.P., G.M.P., glucoses phosphates, créatine-phosphate, etc.), à l'exclusion des phospholipides des membranes et des A.D.N. ou A.R.N. qui, comme nous l'avons vu plus haut, donnent des raies beaucoup plus larges et faibles, indétectables dans ces conditions.

Ces petits métabolites jouent, comme on le sait, un rôle fondamental dans le fonctionnement énergétique des cellules.

Un second intérêt fondamental de choisir le ^{31}P comme noyau d'étude en R.M.N. provient du fait que le déplacement chimique de la raie du phosphore inorganique P_i , en particulier, dépend du pH. Comme ce résidu de réaction est pratiquement toujours visible, cela donne accès à la mesure du pH intracellulaire, ce qui était par ailleurs très difficile à réaliser en temps réel et de manière non invasive.

Nous allons donc voir, dans les paragraphes qui suivent, les principales applications de la R.M.N. du phosphore 31 dans l'étude des différents tissus vivants et organes, ainsi que le développement de cette méthode pour l'investigation clinique chez l'homme.

Il est bien évident que les applications que nous présentons ici ne sont pas les seules de la R.M.N. du ^{31}P . Des considérations de place ne nous permettent pas de développer les travaux concernant les systèmes cellulaires en suspension, les bactéries, les glandes surrénales, le sperme, les moisissures, etc. qui ont donné naissance à de nombreuses publications.

raies des phosphores de l'A.T.P. dans les érythrocytes humains et a démontré que les pics préalablement attribués à la membrane des globules rouges étaient dus aux lipides du sérum.

L'interaction connue entre l'hémoglobine et le D.P.G. peut entraîner des perturbations pouvant rendre difficile la détermination du pH à partir du déplacement chimique du D.P.G. et il faut en tenir compte (3).

De plus, on a signalé qu'il peut y avoir une cause d'erreur si le D.P.G. est lié à d'autres composants cellulaires (4) et, en 1976, il a été montré que les déplacements chimiques du D.P.G. varient aussi avec la forme de la membrane des érythrocytes (5).

La R.M.N. du ^{31}P permet aussi la détermination de la quantité de magnésium libre dans les globules rouges humains (6).

Une autre façon d'aborder l'étude des érythrocytes par la R.M.N. du ^{31}P est de s'intéresser non plus aux déplacements chimiques et à l'intensité des raies de résonance des métabolites phosphorés, mais

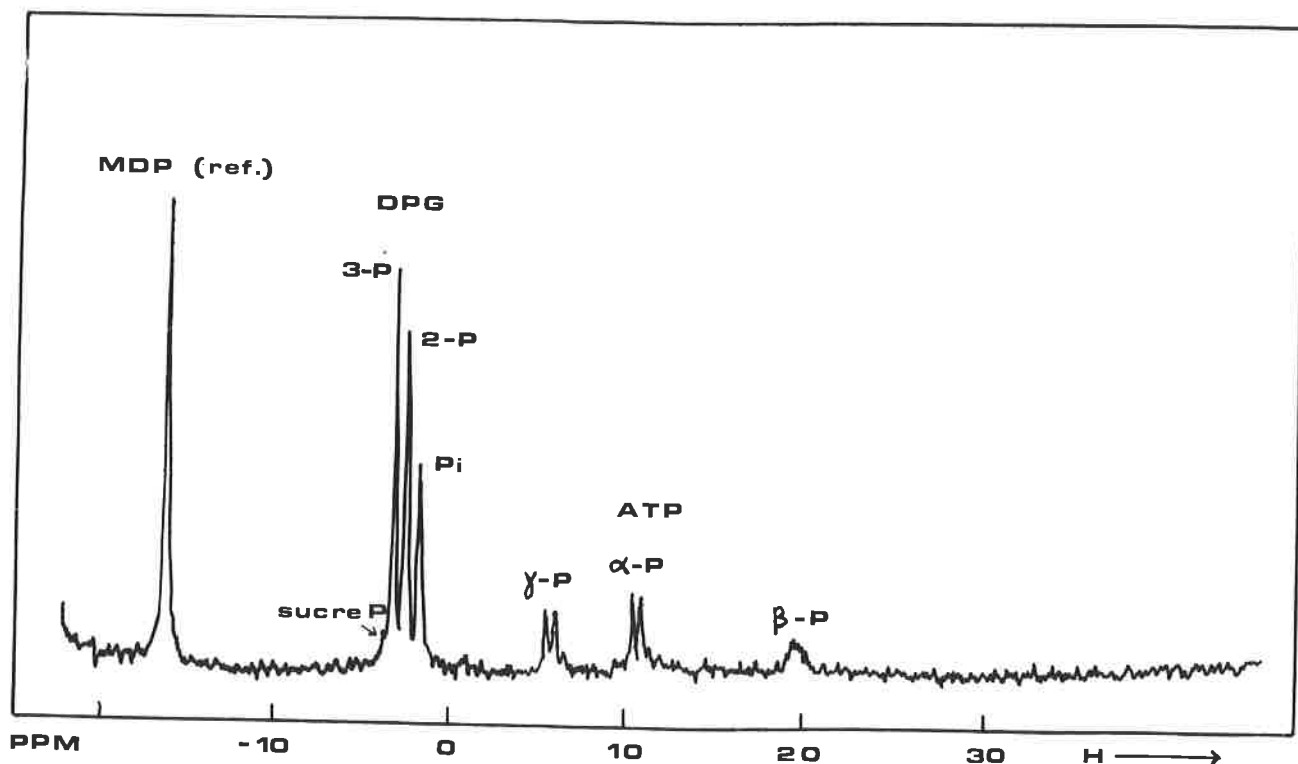


Figure 1. Spectres de R.M.N. du ^{31}P d'érythrocytes humains intacts d'un homme normal.

Sucre-P : sucres phosphorylés (— 3,7 ppm); DPG : 2,3 diphosphoglycérate (3-P, — 3,3 ppm; 2-P, — 2,6 ppm); P_i : phosphate inorganique (— 1,5 ppm); ATP : adénosine triphosphate (γ -P, + 5,9 ppm; α -P, + 10,7 ppm; β -P, + 2,02 ppm); Référence : 0,2 M méthylène diphosphonate (MDP) (d'après Lubansky et al. référ. 10b).

de mesurer les temps de relaxation des noyaux phosphorés de ces composés. C'est ce qui a été fait dans des travaux plus récents (7, 8). En 1980, un groupe a montré que les inverses des temps de relaxation spin réseau (T_1) des noyaux 2-P et 3-P du 2,3-diphosphoglycérate augmentent linéairement avec le pourcentage de liaison du D.P.G. à l'hémoglobine dans des solutions modèles d'hémoglobine.

On peut, aussi, mettre en évidence la polymérisation de l'hémoglobine S dans les globules rouges en s'intéressant aux mesures de T_1 et de T_2 du D.P.G. et aux variations de son spectre (9).

De plus, la R.M.N. du phosphore 31 a permis d'étudier les érythrocytes de personnes atteintes de dystrophie musculaire (voir figure 1) (10a). La concentration en phosphore total qui est calculée à partir de la somme de tous les signaux individuels du ^{31}P est 25 % plus faible dans les érythrocytes d'homme atteint de dystrophie myotonique que dans les érythrocytes normaux.

Enfin, la R.M.N. du ^{31}P a permis de mettre en évidence le transfert du phosphoenolpyruvate à travers la membrane des érythrocytes humains (10b). Ce résultat a été obtenu en comparant les spectres d'érythrocytes intacts dans différentes conditions :

- a) globules rouges en suspension dans un tampon citrate,
- b) glycolyse inhibé par du fluorure de sodium, ce qui permet de mettre en évidence l'accumulation du phosphoenolpyruvate dans les globules rouges alors que le signal du phosphoenolpyruvate se trouvant en solution dans le tampon est élargi par l'addition de sel paramagnétique de Mn (qui ne passe pas la membrane érythrocytaire).
- c) en absence de NaF, le signal de phosphoenolpyruvate (P.E.P.) intraérythrocytaire n'est pas observé, mais la concentration du 2,3-diphosphoglycérate augmente, preuve de la métabolisation du P.E.P. en pyruvate et D.P.G.

2. Études des autres composants du sang

Des spectres d'autres composants du sang ont également été étudiés (11). Les réticulocytes de lapin montrent une quantité

appréciable de phosphodiester G.P.C. et G.P.E., ainsi que la D.P.G., P_i et A.T.P. D'un autre côté, les plaquettes humaines ne contiennent pas de D.P.G., mais possèdent les phosphodiester contenus dans les autres tissus humains. Ces cellules possèdent

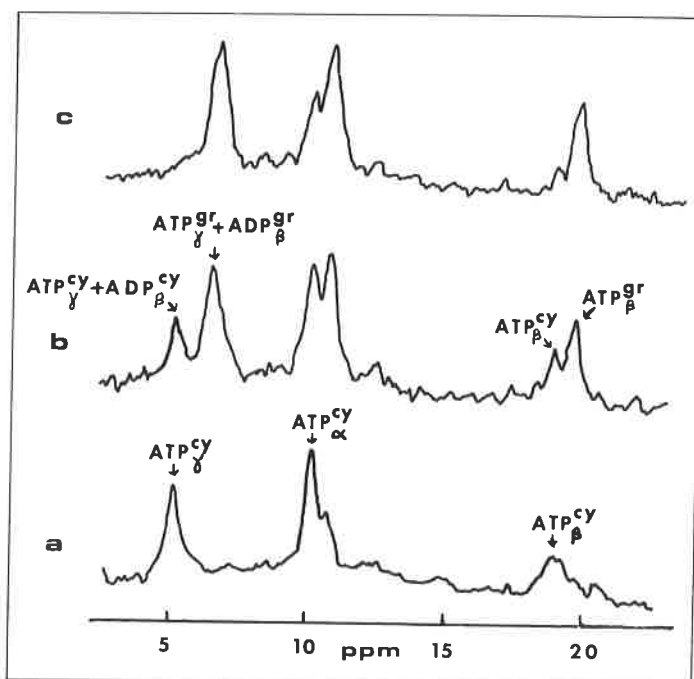


Figure 2. Résonances de l'ADP et de l'ATP de plaquettes de porc à 145,7 MHz.

a) Spectre à 4 °C; b) Spectres à 37 °C, 6' après addition de 12,5 µg d'Antimycin A par ml et 100 mM de 2 déoxyglucose; c) Spectres à 37° 14,5' après l'addition du mélange précédent.

Cy = cytoplasmique; gr = granulaire.

(D'après Urguil et al. référ. 13).

deux régions bien définies : le cytoplasme cellulaire et des vésicules de stockage incluses dans la membrane.

Le cytoplasme des plaquettes contient du phosphore inorganique, des sucres phosphorylés et une réserve de nucléotides de l'adénine servant de source d'énergie pour la plupart des fonctions cellulaires. Les vésicules contiennent une forte concentration de sérotonine, de l'A.D.P., de l'A.T.P., du pyrophosphate et du calcium. Différents groupes (12, 13) ont donc cherché à identifier les résonances des molécules situées dans les différentes régions cellulaires et à obtenir des informations au sujet de la liberté de mouvements de ces molécules. Une équipe (13) a notamment travaillé sur des plaquettes sanguines humaines et de porcs, après avoir préalablement réduit sélectivement le pool cytoplasmique des nucléotides par le 2-déoxyglucose et l'antimycine A. Après la réduction de l'A.T.P. cytoplasmique des plaquettes humaines, le

spectre de R.M.N. ^{31}P montre une disparition presque complète des résonances des nucléosides di et triphosphorés. Ceci indique que seuls les nucléotides cytoplasmiques sont observés et qu'il n'existe aucune contribution décelable des A.T.P., A.D.P. et pyrophosphates granulaires. Le faible mouvement des nucléotides granulaires, probablement dus à l'agrégation, est l'explication possible de leur non détection à 145,7 MHz. Les mêmes expériences menées avec des plaquettes de porcs ont montré que l'A.T.P. et l'A.D.P. granulaires ne sont pas détectés par la R.M.N. à 4°C, mais le sont à des températures plus importantes, ceci indiquant que l'agrégation se produit pour de basses températures. La figure 2 résume une partie de ce joli travail qui montre que la R.M.N. peut fournir des informations précises au sujet de l'environnement et de l'organisation des molécules contenues dans une cellule intacte.

Études physiologiques et biochimiques des muscles par R.M.N. du phosphore 31

1. Spectres de R.M.N. du ^{31}P de muscles intacts

Après l'étude par R.M.N. du ^{31}P de systèmes cellulaires en suspension, l'étape suivante a été la prise de spectres de tissus vivants et nous allons voir, maintenant, quelques résultats concernant les muscles. De nombreuses études ont été effectuées (14-22) et le premier résultat intéressant a été la mesure du pH intracellulaire de différents muscles grâce au déplacement de la résonance du P_i en fonction du pH (19). La R.M.N. du ^{31}P a aussi permis de mettre en évidence des métabolites inconnus

jusqu'alors dans les muscles : en particulier le glycéro 3-phosphorylcholine qui a été mis en évidence en grande quantité dans le muscle pectoral d'un poulet atteint de dystrophie musculaire. Le diester phosphorique de la L sérine éthanolamine a également été mis en évidence (20).

Mais les études les plus intéressantes faites sur les muscles consistent en l'enregistrement des spectres de R.M.N. lors de leurs contractions et de leurs récupérations (23-27). La figure 3 montre le résultat d'une expérience typique dans laquelle un gastrocnémien de grenouille a été stimulé de façon répétitive pendant 5 secondes toutes les 5 minutes. Les enregistrements de la force développée sont représentés sur le côté droit. On remarque, faits bien connus, que la force diminue progressivement et que la relaxation devient de plus en plus lente. Sur la partie gauche, on a les variations correspondantes dans les spectres de R.M.N. Le pic de phosphocréatine (PCr) s'effondre alors que P_i s'accumule; les pics de l'A.T.P. ne sont touchés que dans le cas d'une fatigue extrême. On remarque aussi que le pic du phosphore inorganique P_i est déplacé vers la gauche, indiquant la formation d'acide lactique. Au cours de l'interprétation de ces résultats, Dawson et al. (26) ont réalisé qu'il était possible de calculer plusieurs quantités intéressantes qui ne pouvaient être déterminées directement à partir des spectres. Ce sont :

1. La concentration de l'A.D.P. libre (la plupart des molécules d'A.D.P. sont liées soit à l'actine, soit à la myosine).
2. La variation d'énergie libre pendant l'hydrolyse de l'A.T.P. Ceci est important car elle est égale à l'énergie maximale théoriquement disponible par mole d'A.T.P. dégradée, soit pour un travail mécanique, soit pour un transport actif contre le gradient de concentration.

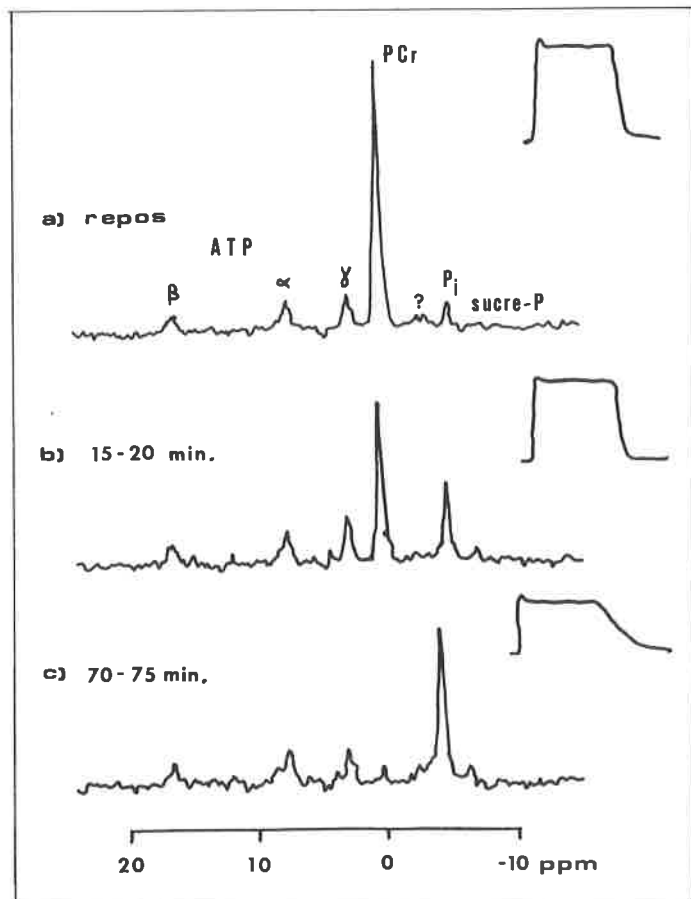


Figure 3. Spectres d'un gastrocnémien de grenouille obtenu à 4°C lors d'une série de contractions de 5" répétée toutes les 5'.

L'enregistrement mécanique du développement de la force isométrique en fonction du temps est représenté sur la droite de la figure. On remarque que la force décroît progressivement alors que la relaxation devient plus lente. (D'après Dawson et al., réf. 26).

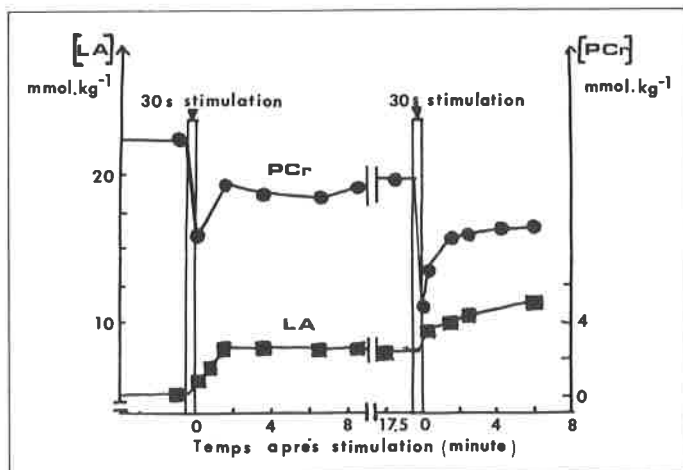


Figure 4. Variations dans le temps des concentrations en phosphocréatine (PCr) et acide lactique (LA) résultant de deux tétanisations de 30" de muscle en anaérobie. (D'après Dawson et al., réf. 28).

3. La quantité d'acide lactique formée par glycogénolyse. Celle-ci est calculée grâce à la décroissance de pH observée, combinée avec les meilleures informations disponibles au sujet des tampons internes des muscles de grenouilles.

2. Étude de la glycolyse

Dawson et al. (28) ont aussi appliqué ces méthodes à l'étude du contrôle de la glycolyse. En effet, les vitesses auxquelles la phosphocréatine est hydrolysée et l'acide lactique formé sont fortement dépendantes du type de stimulation (26). Cependant, cette différence peut être complètement évitée en ajustant convenablement les échelles de temps.

Un exemple, avec une bonne résolution temporelle, est donné par

Études d'organes entiers par R.M.N. du ^{31}P

Le résultat principal de l'étude de la plupart des affections est la corrélation entre la physiopathologie et la capacité métabolique réduite de la région qui subit la lésion ou qui présente une anomalie. Ce problème est d'une importance primordiale pour les conditions qui font intervenir un mauvais débit sanguin ou une mauvaise oxygénation d'un organe ou d'une partie d'organe, comme par exemple l'infarctus du myocarde ou l'occlusion cérébrovasculaire (congestion cérébrale). Les éléments clés dans le traitement clinique de ces accidents sont les déterminations de la localisation, de la taille et de l'importance de la lésion. Il faut aussi connaître la cinétique d'appauvrissement métabolique et le seuil du dommage irréversible. Les techniques basées sur les rayons X, les ultra-sons et la médecine nucléaire peuvent être utilisées pour déterminer la taille et le lieu de la lésion, mais il n'existe pas de méthode applicable à l'homme pour estimer directement et d'une façon non invasive la capacité métabolique du site lésé. Une méthode, pour étudier la fonction métabolique d'une manière non invasive, serait extrêmement utile pour caractériser l'importance de la détérioration et contrôler l'efficacité des thérapies.

Nous allons voir, dans ce paragraphe, que la R.M.N. du ^{31}P répond parfaitement aux impératifs posés ci-dessus.

1. Le cœur

Les premiers travaux ont été effectués sur des cœurs non perfusés (29, 30), refroidis à 4 °C après le prélèvement, puis réchauffés à 37 °C. Ces études ont permis de mettre en évidence les principaux composés phosphorés contenus dans le muscle cardiaque : A.T.P., A.D.P., PCr, P_i et sucres phosphorylés. Puis, pour se rapprocher des conditions physiologiques réelles, des expériences ont été faites sur des cœurs perfusés en train de battre en période normale et en période d'ischémie provoquée (33-40). Les résultats recueillis ont permis de calculer le pH intracellulaire lors de ces différentes périodes, l'augmentation de l'acidification et les variations de concentration des différents métabolites lors d'ischémies provoquées.

Tous ces travaux concernant en majeure partie des cœurs perfusés, étaient des modèles dont la validité n'était pas établie. C'est pour cela que Grove et coll. (41) ont essayé d'obtenir le spectre de R.M.N. en ^{31}P d'un cœur de rat *in vivo* et ont comparé les résultats obtenus à ceux d'un cœur de rat perfusé. Ils ont procédé comme suit : la trachée d'un rat anesthésié est intubée par trachéotomie et l'animal est ventilé mécaniquement. L'abdomen est ouvert et la bobine réceptrice est introduite dans l'incision abdominale à travers le diaphragme et est positionnée autour des ventricules. L'animal est ensuite immobilisé dans la sonde de R.M.N. La figure 5 montre le spectre obtenu et le compare au spectre d'un cœur de rat perfusé. Les deux spectres sont remarquablement semblables avec des sensibilité et résolution similaires. Les attributions des résonances sont données dans la légende de la figure 5. On remarque que le faible niveau de 2,3-diphosphoglycérate indique que le sang circulant dans le cœur ne contribue que très faiblement aux signaux de l'A.T.P. Dans le spectre du cœur perfusé, les pics 7 et 8 représentent respectivement les phosphates

l'expérience représentée sur la figure 4. Les muscles sont tétanisés pendant 30 secondes, provoquant ainsi une petite mais rapide décroissance du taux de PCr. La production consécutive d'acide lactique et la resynthèse de PCr démarrent rapidement et se terminent après environ deux minutes, malgré le fait que la PCr ne retrouve pas son niveau initial. Par la suite, il ne se produit plus de glycolyse jusqu'à ce que le muscle soit restimulé. Il semble bizarre que le muscle ne profite pas de l'opportunité de se recharger en PCr alors qu'il dispose de toute l'arsenal enzymatique et des substrats pour le faire. Des travaux sont actuellement en cours sur les variations d'énergie libre et sur le calcul du rapport A.D.P./A.T.P. pour tenter d'élucider ce problème. Néanmoins, la conclusion semble sûre : ce qui déclenche la glycolyse est associé très étroitement à la contraction et ses effets ne se maintiennent qu'un temps très court après la fin de la relaxation.

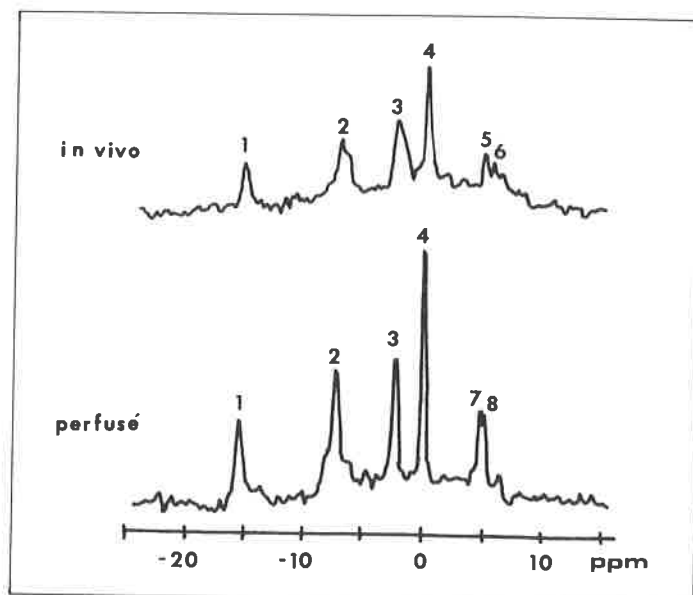


Figure 5. Comparaison des spectres R.M.N. de ^{31}P des cœurs de rat perfusé et *in vivo*.

Les deux spectres ont été obtenus à partir de cœur d'animal de 300 g. 1 : β -ATP; 2 : α -ATP + α -ADP + phosphodiester; 3 : γ -ATP + β -ADP; 4 : PCr; 5 : P_i + 2-phosphate du 2,3-diphosphoglycérate; 6 : 3-phosphate du 2,3-diphosphoglycérate; 7 : P_i intracellulaire; 8 : P_i provenant du tampon de perfusion Krebs-Henseleit. (D'après Grove et al., réf. 41).

inorganiques intra et extracellulaires correspondant aux pH de 7,11 et 7,32.

La possibilité de mesurer des variations dynamiques dans le cœur *in vivo* en suivant les variations du spectre de phosphore 31 a été appliquée au cas de l'arrêt respiratoire. Après la prise du spectre de référence, la ventilation de l'animal est arrêtée. Le rat passe alors par une suite de normoxies, hypoxies et finalement anoxies. Lors de cette séquence, le cœur ralentit graduellement et s'arrête. Durant les 10 premières minutes, la concentration en phosphocréatine diminue jusqu'à une valeur indétectable; celle de P_i augmente, tandis que celle de l'A.T.P. reste constante. Lorsque la phosphocréatine est consommée métaboliquement, la concentration d'A.T.P. diminue jusqu'à ne plus être détectée au bout de 17 minutes.

Un des intérêts de telles études métaboliques est de pouvoir évaluer ou tester un traitement pharmacologique lors d'une attaque cardiaque. C'est ce qu'on fait Pieper et coll. (42) en étudiant par R.M.N. du ^{31}P l'action du propranolol sur l'acidose du tissu myocardique lors d'épisodes ischémiques. Les cœurs préalablement protégés par le propranolol (1 mg/litre) ont montré une diminution

très nette du développement de l'acidose par rapport à la longueur de l'ischémie. De plus, le propranolol aide au retour à la normale du pH intramyocardique lors de la reperfusion.

Toutes les études précédentes sur les ischémies cardiaques ont toujours été faites en utilisant des configurations normales pour les bobines réceptrices de R.M.N., ce qui ne permettait pas de sélectivité spatiale. C'est-à-dire que l'on recueillait le spectre R.M.N. du cœur total et non pas uniquement de la zone d'ischémie. Ce qui fait qu'on ne pouvait observer que la variation de pH grâce au signal du phosphore inorganique, mais que ni la variation des concentrations des autres phosphates dans la zone d'ischémie elle-même, ni la localisation exacte de cette zone ne

pouvaient être faites. Ackerman et al. (43) ont révolutionné la technique conventionnelle de R.M.N. du ^{31}P en utilisant des électroaimants de grande ouverture et surtout des bobines réceptrices plates de surface pour dresser une carte de la distribution des métabolites phosphorylés dans les cerveaux et les membres d'animaux entiers. Nunnally et Bottomley ont repris cette technique pour étudier le métabolisme régional de cœurs perfusés (44). Ils ont surtout étudié les effets d'un infarctus localisé sur le métabolisme du phosphore et l'efficacité des traitements par deux médicaments : le Vérapamil et la Chlorpromazine. La figure 6 montre le cœur perfusé avec l'endroit de la ligature permettant de provoquer une surface ischémique localisée dans le ventricule gauche, ainsi que l'emplacement de la bobine de détection. Sur cette figure, on peut aussi comparer les spectres obtenus avant et pendant l'ischémie dans une sonde de R.M.N. conventionnelle (a et b) avec les mêmes spectres obtenus avec les bobines de surface (c et d). La figure 7 représente les spectres obtenus lors de l'étude comparative de l'influence métabolique du Vérapamil et de la Chlorpromazine sur l'infarctus provoqué. On remarque que le cœur protégé par le Vérapamil garde des concentrations presque normales en métabolites phosphorylés (PCr et A.T.P.) dans la région rendue ischémique. La Chlorpromazine a un effet moins spectaculaire mais néanmoins observable.

2. Le rein

Il est évident que le type d'expériences que nous venons de décrire peut s'appliquer à l'étude de presque tout organe pouvant être perfusé dans un état isolé. En particulier, le rein est l'organe dont la transplantation est la plus répandue. Outre les problèmes immunologiques, la conservation des tissus et la prévision de la viabilité sont d'intérêts à la fois théorique et pratique. Le groupe de Radda, d'Oxford, et celui du Renal Transplant Unit, de Liverpool, ont développé en commun un programme de recherche utilisant des modèles animaux pour estimer la valeur de la R.M.N. du ^{31}P dans l'étude du métabolisme du rein, en vue d'une transplantation. Les premiers travaux de Sehr et al. (45) ont porté sur deux types de mesures sur des reins de petits rats. Dans un premier temps, un rein retiré d'un jeune rat est ensuite refroidi à 4°C . L'enregistrement des spectres de R.M.N. commence dans les quatre minutes suivant la néphrectomie. Le spectre initial montre la présence d'A.T.P., une petite quantité de phosphocréatine et d'autres substances, comme le montre la figure 8. Un des métabolites, dont la fréquence correspond à celle d'un diester phosphorique, a une concentration très importante. De plus, le niveau d'A.M.P. est aussi plus important dans le tissu rénal que dans les autres tissus déjà examinés.

Le deuxième type de mesures consiste en l'enregistrement des spectres d'un rein ischémique isolé relié à la circulation sanguine d'un autre animal anesthésié. Après un certain temps, la concentration initiale en A.T.P. est rétablie, même si au cours de la perfusion sanguine des périodes d'ischémies ont été provoquée. Les reins perfusés de cette façon produisent de l'urine et il est donc envisagé, en utilisant ce modèle, de mesurer les effets métaboliques des étapes intervenant dans une transplantation rénale.

Une étude semblable, mais faite à partir de rein de lapin, a permis de préciser certains points (46). En particulier, le pic non identifié dans le spectre du rein de rat est retrouvé et semble correspondre à la position de glycérophosphorylcholine déjà identifié dans certains muscles (18, 19).

D'après ces résultats, il est clair que la R.M.N. fournit une méthode d'étude métabolique non destructive, permettant de sonder les bases biochimiques de la viabilité rénale.

3. Le foie

La première étude par R.M.N. du ^{31}P concernant le foie a été faite simplement sur des hépatocytes isolés (47). Peu de temps après, le premier spectre d'un foie perfusé de rat a été enregistré. Salhany et coll. (48) ont en effet étudié les changements métaboliques associés à l'intoxication par le cyanure. Ils ont montré que le cyanure inhibe comme prévu le métabolisme oxydatif, mais que cette inhibition

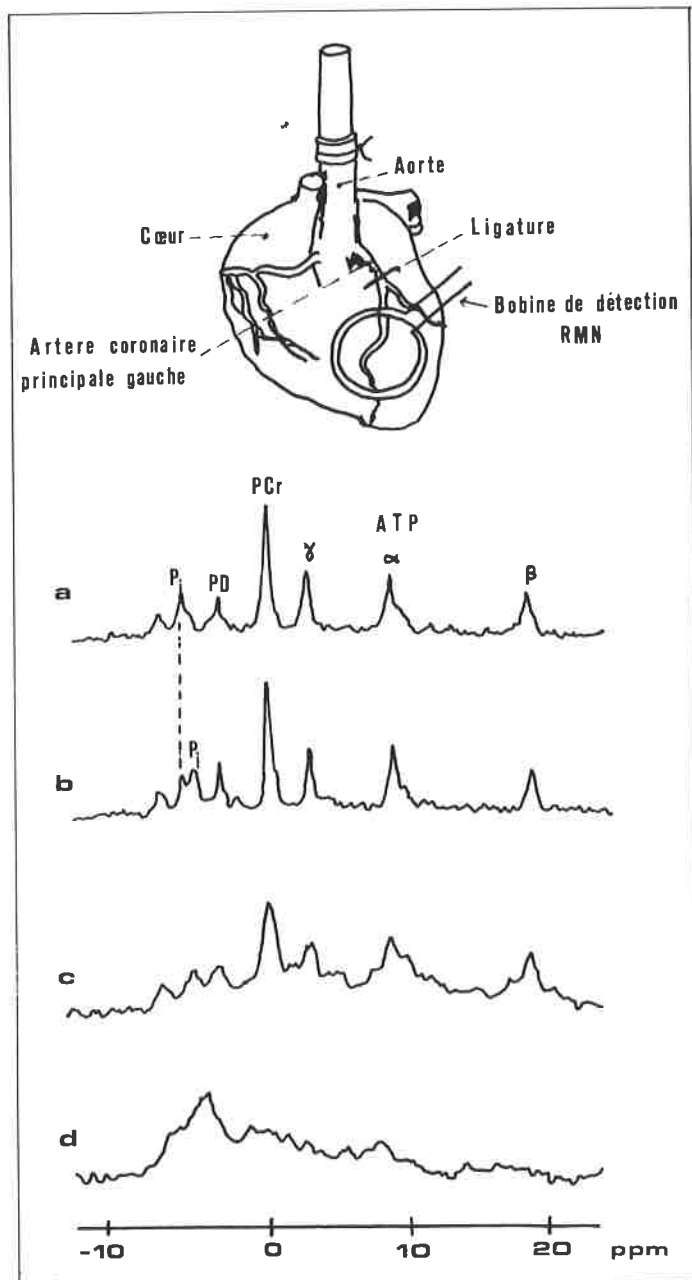


Figure 6. Schéma du cœur perfusé montrant l'emplacement de la bobine de surface et l'endroit de la ligature provoquant l'ischémie locale.

a et b : Spectre d'un cœur perfusé avant et après ligature dans une sonde conventionnelle (5', 150 accumulations).
c : Spectre de l'aire ventriculaire gauche du cœur perfusé avec bobine de surface de 8 mm de diamètre (25', 1 000 accumulations).
d : Même spectre que le précédent, mais obtenu après ligature. (D'après Nunnally et al., réf. 44).

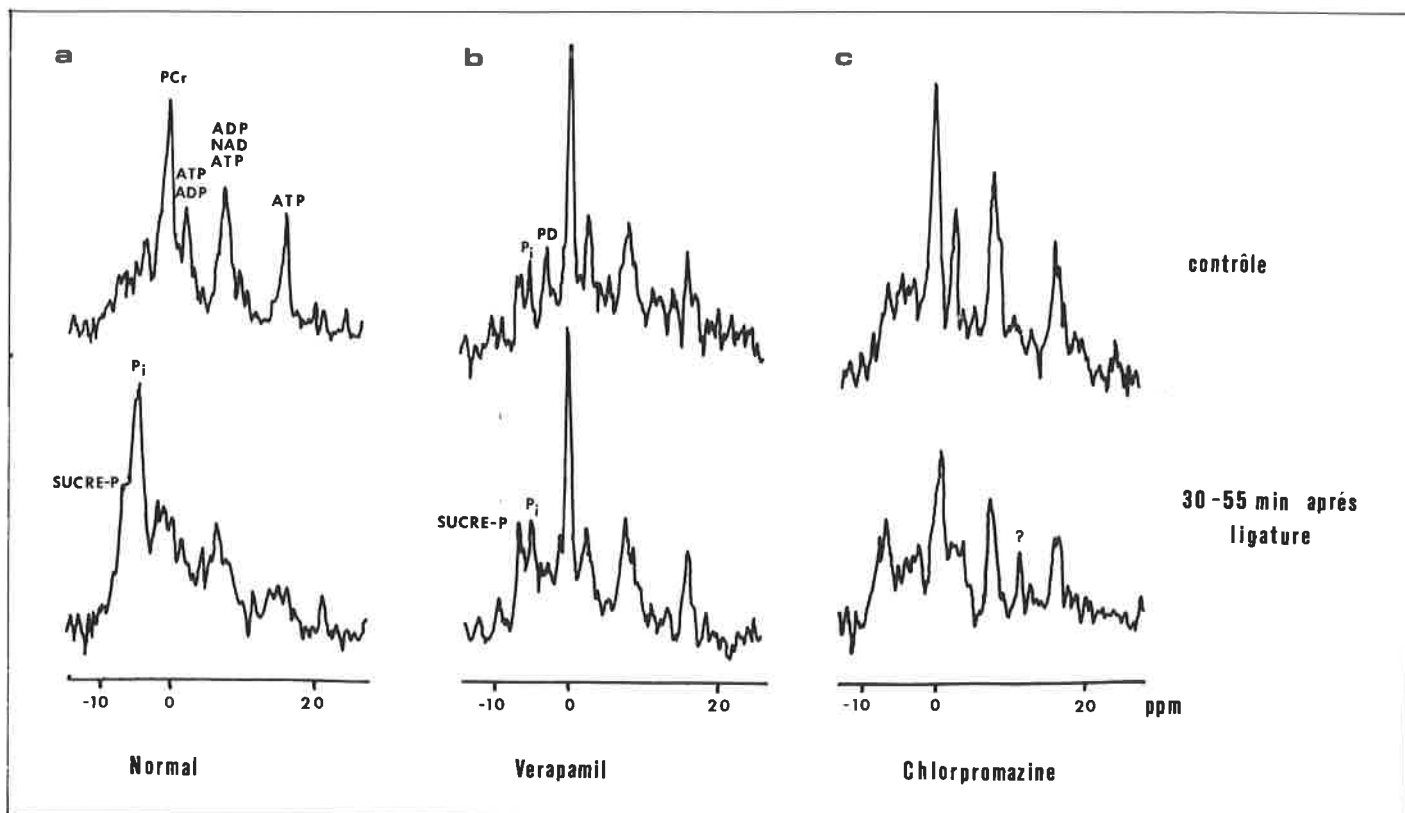


Figure 7. *a*) Spectre d'un cœur perfusé (région ventriculaire gauche) normalement oxygéné (haut) et en ischémie locale (bas).

b) Idem mais cœur traité au Vérapamil; *c*) Idem mais cœur traité à Chlorpromazine. (D'après Nunnally et *al.*, réf. 44).

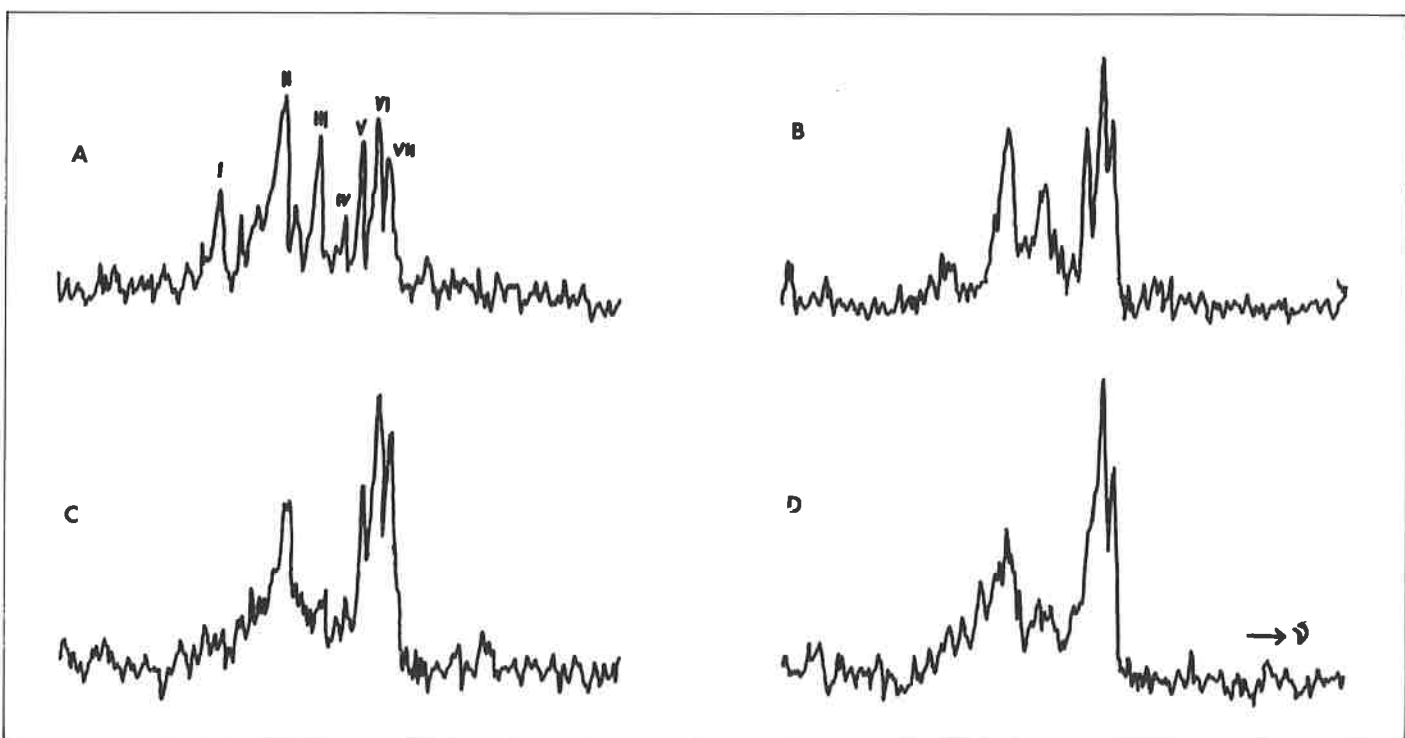


Figure 8. Spectres R.M.N. ^{31}P d'un rein de rat non perfusé à 4 °C. Les accumulations ont démarré 1'(A), 15'(B), 41'(C) et 57'(D) après le début de l'ischémie.

I, β -ATP; II, α -ATP; III, γ -ATP; IV, phosphocréatine; V, non identifié; VI, phosphate inorganique; VII, nucléotide monophosphate plus sucres phosphorylés. (D'après Sehr et *al.*, réf. 45).

peut être levée par une reperfusion de tampon exempt de cyanure. D'autres études ont été faites concernant les effets de courtes périodes d'ischémie (49) d'une part, et les effets métaboliques du fructose (50) d'autre part.

4. Le cerveau

L'un des organes le plus difficile à étudier biochimiquement et par technique de perfusion est le cerveau. Des techniques variées telles que la congélation par aspersion et la R.M.N. à basse température ont été développées pour évaluer l'état énergétique *in vivo* de ce tissu et ceci à cause de son métabolisme oxydatif très rapide et de sa grande sensibilité aux courtes périodes d'hypoxie ou d'ischémie.

Chance et *al.* (51) ont enregistré et comparé les spectres R.M.N. obtenus, d'une part, pour un cerveau de rat rapidement congelé et, d'autre part, pour un cerveau de rat vivant en état d'aérobie et d'anaérobie.

Comme nous l'avons déjà signalé plus haut, Ackerman et coll. (43), grâce à l'utilisation d'une bobine de surface placée sur le sommet d'une tête de rat, directement au-dessus du cerveau, ont obtenu un excellent spectre de celui-ci. Comme il n'y a pas de tissus musculaire entre la bobine et le cerveau, ces expériences sont sélectives pour les tissus du cerveau et la boîte crânienne. La contribution très large due à l'os peut être facilement éliminée du spectre par la technique de différence par convolution (figure 9).

Cette expérience leur a permis de constater que, d'après les déplacements chimiques des trois raies de l'A.T.P., ce métabolite est surtout sous une forme complexée avec un cation divalent qui pourrait être le magnésium. Ils ont aussi calculé le rapport PCr/A.T.P.; cette valeur calculée par R.M.N. est plus élevée que les meilleures valeurs obtenues des concentrations d'A.T.P., d'A.D.P. et de P_i. Ils sont arrivés à la conclusion que l'état de phosphorylation des tissus ($\{A.T.P.\}/\{A.D.P.\} + \{HPO_4^{2-}\}$) du cerveau est au moins d'un ordre de grandeur plus important que la valeur généralement acceptée ($3,400 M^{-1}$).

Résonance magnétique nucléaire localisée

Nous avons vu, dans les paragraphes précédents, de nombreuses expériences sur les organes isolés, intacts et perfusés, qui ont permis d'établir la R.M.N. du ³¹P comme moyen d'étude important des processus biochimiques à tous les niveaux de l'organisation biologique.

Cependant, le but ultime a toujours été d'utiliser la R.M.N. du ³¹P comme une manière non invasive d'investigation de la fonction biochimique chez l'animal intact, puis chez l'homme.

Pour développer ces applications, *in vivo*, l'Oxford Research Systems Limited, en collaboration avec le Département de biochimie de l'Université d'Oxford, a développé un système de Résonance Magnétique Nucléaire Localisée (Topical Magnetic Resonance ou T.M.R.).

Le T.M.R. est une technique qui permet d'obtenir des spectres de résonance magnétique nucléaire de haute résolution d'une zone bien précise d'un échantillon important. Les bobines de surface (43) étaient une première approche.

Dans la spectroscopie de T.M.R., un volume sensible est provoqué en superposant des gradients de champ magnétique d'ordre élevé au champ magnétique principal, de façon à définir une région centrale de champ uniforme entourée par une couronne de champs variant rapidement.

La figure 10 montre une section l'axe z de cette répartition de champ. A l'intérieur du volume sensible, les élargissements des raies dues à l'inhomogénéité du champ magnétique sont plus faibles que les largeurs de raies classiques du ³¹P et on peut recueillir des spectres de haute résolution de cette partie de l'échantillon qui se trouve à l'intérieur de ce volume à peu près sphérique. Contiguë à

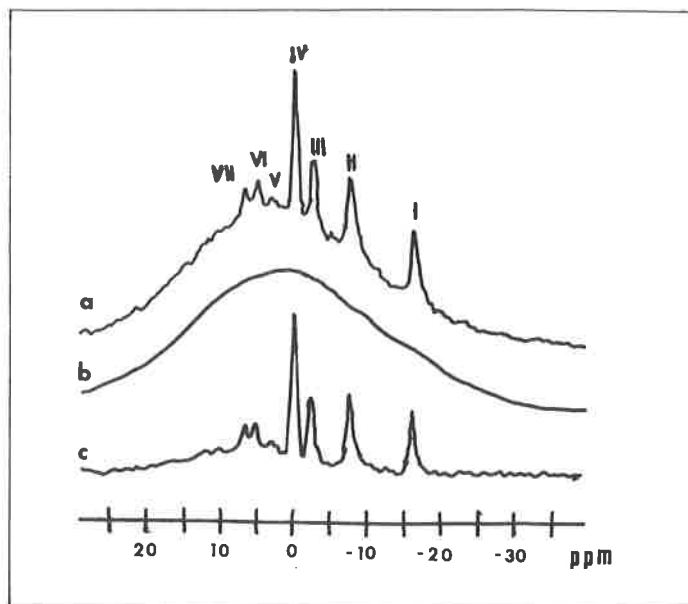


Figure 9. Spectres R.M.N. ³¹P du cerveau d'un rat vivant obtenu avec une bobine de surface.

Les spectres a et c montrent l'effet de la technique de différence par convolution en éliminant la contribution étalée provenant du ³¹P de l'os.

a) Spectre original du cerveau (300 accumulations avec multiplication exponentielle de 15 Hz).

b) Idem, mais multiplication exponentielle de 400 Hz.

c) Spectre différence de a-b.

I, β-ATP; II, α-ATP; III, γ-ATP; IV, phosphocréatine; V, phosphodiester; VI, phosphate inorganique et 2-phosphate du 2,3-disphosphoglycérate; VII, sucres phosphorylés et 3-phosphate du 2,3-disphosphoglycérate.

(D'après Ackerman et *al.*, réf. 43).

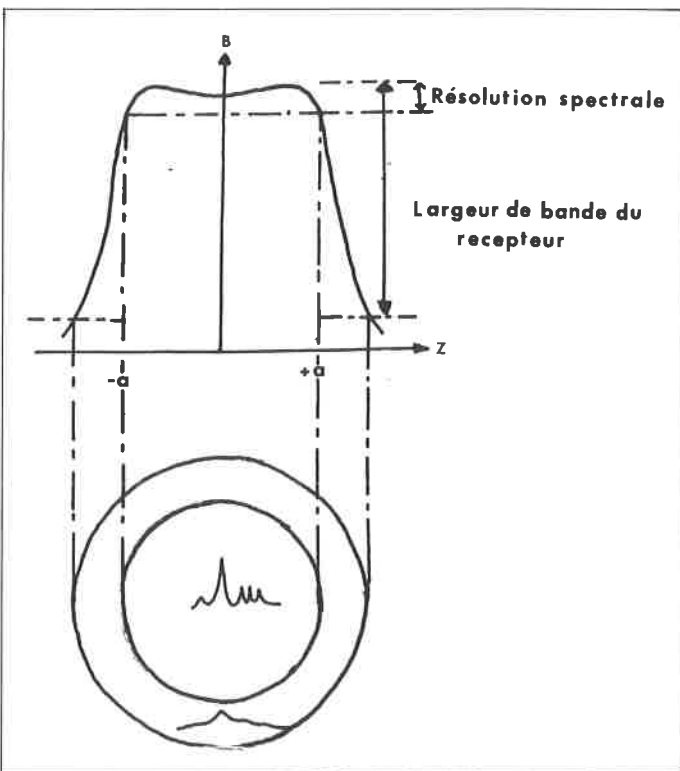


Figure 10. (D'après un document Oxford Research Systems).

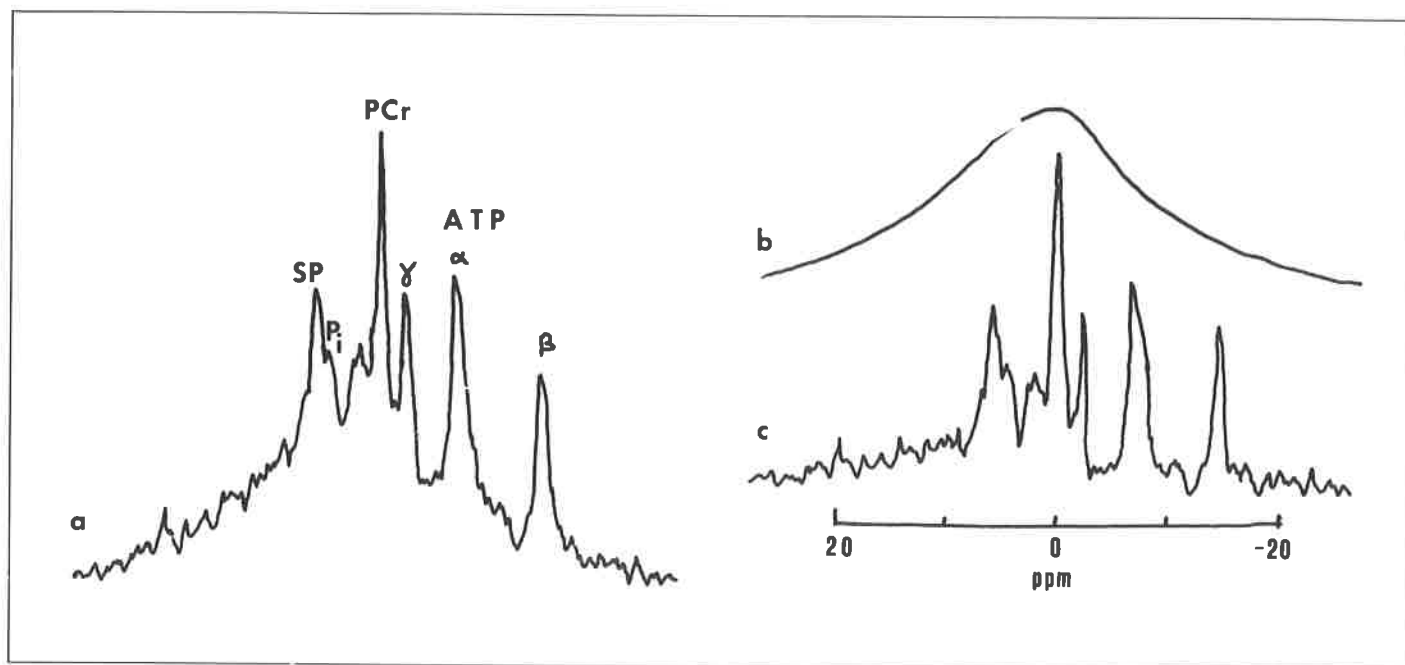


Figure 11. (D'après un document Oxford Research Systems).

ce volume central, se trouve une région dans laquelle le champ magnétique varie très rapidement avec le lieu. Cette région donne naissance à des spectres mal résolus et très élargis car la gamme des fréquences du signal reste encore dans la largeur de bande du récepteur du spectromètre. Dans toutes les autres régions de l'échantillon, les raies spectrales seront élargies et tellement déplacées que les fréquences du signal seront en dehors de la largeur de bande du récepteur et ne sont pas détectées.

La figure 11a montre un spectre T.M.R. classique. Il contient à la fois les raies fines de haute résolution et les raies très élargies provenant de la région inhomogène. Ces deux types de raies doivent donc être séparées puisque seul nous intéresse le spectre de haute résolution du volume sensible. Le T.M.R. utilise des techniques de déconvolution pour éliminer la composante inhomogène et les spectres (b) et (c) de la figure 11 illustrent les étapes de cette méthode.

Applications de la spectroscopie de T.M.R.

Les premières mesures *in vivo* par T.M.R. pour démontrer la capacité de focalisation de cette technique ont été faites sur un rat anesthésié (52). La bobine de R.M.N. entoure la partie de l'abdomen contenant le foie, de telle façon que les signaux provenant des muscles du squelette, des muscles viscéraux et des tissus du foie soient recueillis. Le spectre 12a est obtenu de cette partie du rat entier en quelques minutes. On remarque clairement les raies de l'A.T.P., de la PCr et du P_i , ainsi que celles dues aux sucres phosphorylés. La figure 12b montre la différence significative obtenue en réduisant le diamètre de base du volume sensible à 2 cm. La diminution très nette du pic de phosphocréatine est une indication très parlante du fait que le spectre provient d'une façon prédominante du foie, qui est connu pour ne contenir qu'un faible pourcentage de PCr. Le pic résiduel de PCr provient probablement du muscle du diaphragme ou de l'intestin. On remarquera la faible concentration en phosphate inorganique dans le tissu sain.

Les auteurs, ayant chirurgicalement privé le foie de son approvisionnement en sang, ont effectué ensuite les mêmes mesures sur le même animal. Ils ont observé, après la ligature, une réduction nette du niveau d'A.T.P., ainsi qu'une augmentation de la concentration en phosphate inorganique correspondant à un foie malade ischémié. Ceci confirme donc bien l'origine et l'interprétation des spectres T.M.R. enregistrés précédemment. De plus, l'intensité du pic de PCr est très voisine de celle observée dans les spectres du foie sain, ce qui indique que l'état métabolique du muscle est peu affecté par l'opération.

Après ces études préliminaires, le T.M.R. a été étendue à des recherches sans danger et non invasives sur l'homme. Des

expériences récentes ont, en effet, montré que l'étude du métabolisme des muscles humains peut être faite sans le besoin de biopsies (53). Le patient met simplement son avant-bras, par exemple, dans l'électroaimant et on enregistre ainsi les spectres de R.M.N. du ^{31}P des muscles de l'avant-bras en une minute chacun et sous quatre conditions différentes : lorsque le muscle est au repos, pendant un exercice (flexions des doigts) avec circulation sanguine normale, pendant la récupération après l'exercice et pendant un exercice en anoxie (circulation sanguine bloquée par un garrot au niveau du bras (54, 55).

En reprenant ces techniques d'investigations, Ross et Radda ont réussi à établir un diagnostic clinique par R.M.N. du ^{31}P du syndrome de McArdle (56). Ces mêmes auteurs ont ainsi montré que la R.M.N. pouvait diagnostiquer une autre myopathie, la myopathie mitochondriale, qui est aussi une affection rare mais dont les méthodes de diagnostics existantes sont très longues et difficiles à mettre en œuvre (57).

D'autres applications de cette méthode ayant plus d'intérêt pour une utilisation clinique ont aussi été sondées par le groupe d'Oxford avec succès. Ils ont par exemple, récemment (58), achevé l'étude d'un modèle pour déterminer si la méthode peut être utilisée pour prévoir comment un rein fonctionnera après une transplantation. Ils ont pour cela utilisé les avantages de deux techniques : les bobines de surface et la spectroscopie de T.M.R. Avec la possibilité offerte par cette technique d'utiliser des aimants à grande ouverture, ils espèrent que, dans un proche avenir, non seulement les reins humains pourront être testés de la même façon (46), mais qu'il sera aussi possible de contrôler *in situ* le rein après la transplantation.

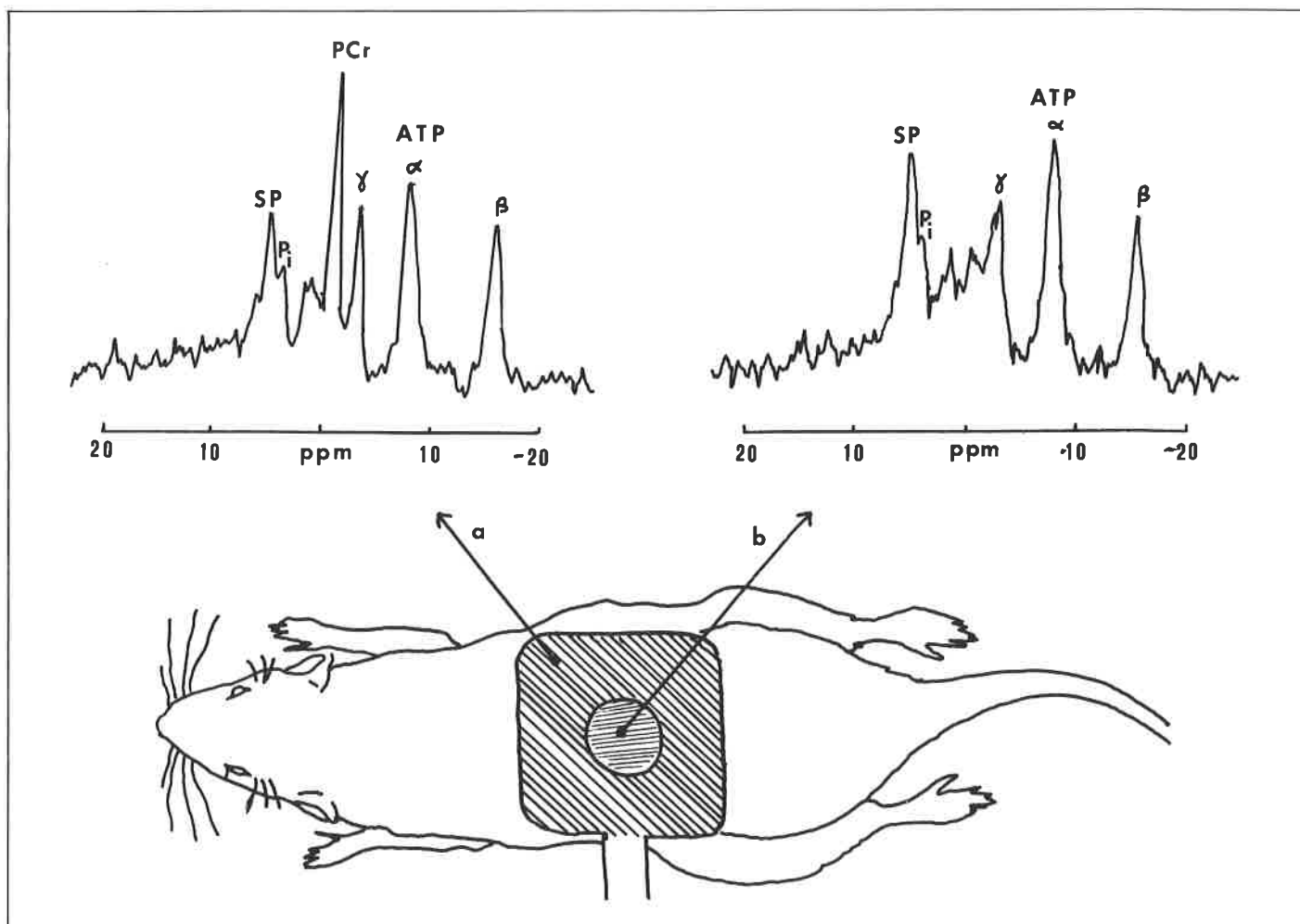


Figure 12. Spectres TMR « in vivo » obtenus de l'abdomen d'un rat en utilisant un volume sensible de diamètre de base : a) $2a = 5$ cm; b) $2a = 2$ cm.

(D'après document Oxford Research Systems).

Conclusion

Nous avons vu, dans cet article, une partie des applications possibles de la R.M.N. du ^{31}P dans les tissus vivants et organes perfusés. Cette méthode non destructive et non invasive permet d'obtenir des informations détaillées au sujet de la biochimie et de la physiologie des systèmes vivants.

En médecine, la connaissance et le traitement d'une maladie est normalement l'aboutissement de plusieurs techniques diagnostiques et thérapeutiques combinées. Il n'est pas alors interdit de penser que, si l'extension de l'utilisation de la R.M.N. du ^{31}P , au cours des cinq dernières années, est maintenue, cette méthode complètera l'arsenal diagnostique déjà existant et ouvrira de nouvelles perspectives sur l'analyse fonctionnelle et la caractérisation des tissus; elle promet un impact important en médecine clinique.

D'autre part, la R.M.N. du ^{31}P peut être considérée plus comme un complément, qu'un concurrent des méthodes par rayons X (scanographes, etc.) qui produisent des images de la structure du corps. Toutefois, si la R.M.N. du ^{31}P peut être combinée avec les méthodes d'imagerie telles que celles déjà développées pour la R.M.N. du proton, il sera alors possible d'obtenir des images en deux ou trois dimensions des tissus et organes humains qui fourniront à la fois des informations biochimiques et structurales. Des méthodes d'imagerie R.M.N. haute résolution applicables à de petits volumes ont déjà été proposées avec des résultats encourageants (59, 60, 61). La transposition à de grands volumes pose cependant de nombreux et difficiles problèmes.

Bibliographie

- (1) R. B. Moon et J. H. Richards, *J. Biol. Chem.*, 1973, **248**, 7276.
- (2) T. O. Henderson, A. J. R. Costello et A. Omachi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, **71**, 2487.
- (3) A. J. R. Costello, W. E. Marshall, A. Omachi et T. O. Henderson, *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, **427**, 481.
- (4) W. E. Marshall, A. J. R. Costello, T. O. Henderson et A. Omachi, *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, **490**, 290.
- (5) E. T. Fossel et A. K. Solomon, *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, **436**, 505.
- (6) R. K. Gupta, J. L. Benovic et Z. B. Rose, *J. Biol. Chem.*, 1978, **253**, 6172.
- (7) R. K. Gupta, J. L. Benovic et Z. B. Rose, *J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, 8250.
- (8) H. J. Lubansky, A. Omachi et C. T. Burt, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1980, **97**, 1170.
- (9) M. E. Fabry, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1980, **97**, 4, 1399.
- (10) a) G. Sarpel, H. J. Lubansky, M. J. Danon et A. Omachi, *Arch. Neurol.*, 1981, **38**, 271.
b) N. Hamasaki, A. M. Wyrwicz, H. J. Lubansky et A. Omachi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, **100**, 879.
- (11) R. J. Labotka, T. Glonek, M. A. Hruby et G. R. Honig, *Biochem. Med.*, 1976, **15**, 311.
- (12) J. L. Costa, C. M. Dobson, K. L. Kirk, F. M. Poulsen, C. R. Valeri et J. J. Vecchione, *F.E.B.S. Letters*, 1979, **99**, 1, 141.
- (13) K. Urigibil, H. Holmsen et R. G. Shulman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**, 5, 2227.

- (14) D. I. Hoult, S. J. W. Busby, D. G. Gadian, G. K. Radda, R. E. Richards et P. J. Seeley, *Nature*, 1974, **252**, 285.
- (15) C. T. Burt, T. Glonek et M. Barany, *J. Biol. Chem.*, 1976, **251**, 2584.
- (16) M. Barany, K. Barany, C. T. Burt, T. Glonek et T. C. Myers, *J. Supramol. Struct.*, 1975, **3**, 125.
- (17) S. M. Cohen et C. T. Burt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, **74**, 4271.
- (18) P. J. Seeley, S. J. W. Busby, D. G. Gadian, G. K. Radda et R. E. Richards, *Biochem. Soc. Trans.*, 1976, **4**, 62.
- (19) C. T. Burt, T. Glonek et M. Barany, *Biochemistry*, 1976, **15**, 22, 4850.
- (20) J. M. Chalovich, C. T. Burt, S. M. Cohen, T. Glonek et M. Barany, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1977, **182**, 683.
- (21) C. T. Burt, T. Glonek et M. Barany, *Science*, 1977, **195**, 145.
- (22) J. M. Chalovich, C. T. Burt, S. M. Cohen, T. Glonek et M. Barany, *Ann. New-York Acad. Sci.*, 1978, **317**.
- (23) M. J. Dawson, D. G. Gadian et D. R. Wilkie, *J. Physiol.*, 1976, **258**, 82.
- (24) M. J. Dawson, D. G. Gadian et D. R. Wilkie, *J. Physiol.*, 1978, **267**, 703.
- (25) M. J. Dawson, D. G. Gadian et D. R. Wilkie dans « NMR in Biology », R. Dwek (Ed.), New-York, Academic Press, p. 289 (1977).
- (26) M. J. Dawson, D. G. Gadian et D. R. Wilkie, *Nature*, 1978, **274**, 861.
- (27) a) M. J. Dawson, D. G. Gadian et D. R. Wilkie, *J. Physiol.*, 1980, **299**, 465.
b) D. G. Gadian, G. K. Radda, T. R. Brown, E. M. Chance, J. M. Dawson et D. R. Wilkie, *Biochem. J.*, 1981, **194**, 215.
- (28) M. J. Dawson, D. G. Gadian et D. R. Wilkie, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 1980, **289**, 445.
- (29) D. G. Gadian, D. I. Hoult, G. F. Radda, P. J. Seeley, B. Chance et C. Barlow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976, **73**, 4446.
- (30) D. P. Hollis, R. L. Nunnally, W. E. Jacobus et G. J. Taylor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, **75**, 1086.
- (31) W. E. Jacobus, G. J. Taylor, D. P. Hollis et R. L. Nunnally, *Nature*, 1977, **265**, 756.
- (32) P. B. Garlick, G. K. Radda, P. J. Seeley et B. Chance, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, **74**, 1256.
- (33) G. J. Taylor, W. E. Jacobus, D. P. Hollis, R. L. Nunnally et M. L. Weisfeldt, *Clin. Res.*, 1977, **25**, 257.
- (34) P. B. Garlick, P. J. Seeley, M. K. Battersby et G. K. Radda, dans « Regulatory Mechanisms of Carbohydrate Metabolism » Ed. V. Esmann, p. 297-302 (Oxford, New-York), Pergamon Press (1978).
- (35) D. P. Hollis, R. L. Nunnally et B. H. Bulkey, *Biophys. J.*, 1978, **21**, 218a.
- (36) D. P. Hollis, R. L. Nunnally, G. J. Taylor, M. L. Weisfeldt et N. E. Jacobus, *J. Magn. Reson.*, 1978, **29**, 319.
- (37) J. T. Flaherty, W. E. Jacobus, M. L. Weisfeldt, D. P. Hollis, T. J. Gardner et V. L. Gott, Résumé de « American College of Cardiology, 28th Annual Scientific Session », 11-15 mars 1979, Miami, Floride.
- (38) R. L. Nunnally et D. P. Hollis, *Biochemistry*, 1979, **18**, 3642.
- (39) E. T. Fossel, H. E. Morgan et J. S. Ingwall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, **77**, 3654.
- (40) a) A. Rossi, J. Martin et D. de Leiris, *J. Physiol.*, 1980, **76**, 902.
b) I. A. Bailey, S. R. Williams, G. K. Radda et D. G. Gadian, *Biochem. J.*, 1981, **196**, 171.
- (41) T. H. Grove, J. J. H. Ackerman, G. K. Radda et P. J. Bore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, **77**, 299.
- (42) G. M. Pieper, G. L. Todd, S. T. Wu, J. M. Salhany, F. C. Clayton et R. S. Eliot, *Cardiovasc. Res.*, 1980, **14**, 646.
- (43) J. J. H. Ackerman, T. M. Grove, G. G. Wong, D. G. Gadian et G. K. Radda, *Nature*, 1980, **283**, 167.
- (44) R. L. Nunnally et P. A. Bottomley, *Science*, 1981, **211**, 177.
- (45) P. A. Sehr, G. K. Radda, P. J. Bore et R. A. Sells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, **77**, 195.
- (46) J. J. Ackerman, P. J. Bore, D. G. Gadian, T. H. Grove et G. K. Radda, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 1980, **289**, 425.
- (47) S. M. Cohen, S. Ogawa, H. R. Ottenberg, P. Glynn, T. Yamane, T. R. Brown, R. G. Shulman et J. R. Williamson, *Nature*, 1978, **273**, 554.
- (48) J. M. Salhany, S. J. Stohs, L. A. Reinke, G. M. Pieper et J. M. Hassing, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, **86**, 1077.
- (49) A. C. McLaughlin, H. Takeda et B. Chance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**, 5445.
- (50) R. A. Iles, J. R. Griffiths, D. G. Gadian et R. Porteous, *Clinical Science*, 1980, **58**, 2.
- (51) B. Chance, Y. Nakase, M. Bond, J. S. Leigh Jr. et G. McDonald, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, **75**, 4925.
- (52) R. E. Gordon, P. E. Hanley, D. Shaw, D. G. Gadian, G. K. Radda, P. Styles, P. J. Bore et L. Chan, *Nature*, 1980, **287**, 736.
- (53) I. D. Cresshull, R. E. Gordon, P. E. Hanley et al., *Bull. Magnet. Reson.*, 1981, **2**, 426.
- (54) I. D. Cresshull, M. J. Dawson, D. G. Gadian, R. E. Gordon, G. K. Radda, D. Shaw et D. R. Wilkie, *J. Physiol.*, 1981, **317**, 18.
- (55) a) R. E. Gordon, P. E. Hanley, D. Shaw, D. G. Gadian, G. K. Radda et P. Styles, Nuclear Magnetic Imaging Symposium, Vanderbilt University School of Medicine 26-27 octobre 1980.
b) P. Henley, *Chemistry in Britain*, 1981, **17**, 8, 374.
- (56) B. D. Ross, G. K. Radda, D. G. Gadian, G. Rocker, M. Esiri et J. Falconer-Smith, *N. England. J. Med.*, 1981, **304**, 1338.
- (57) D. G. Gadian, B. Ross, P. Bore, G. Radda, J. Hockaday, D. Taylor et P. Styles, *The Lancet*, 1981, p. 774.
- (58) R. S. Balaban, D. G. Gadian et G. K. Radda, *Kidney Int.*, 1981, **20**, 5, 575.
- (59) P. Bendel, C. M. Lai et P. C. Lauterbur, *J. Mag. Res.*, 1980, **38**, 343.
- (60) S. T. Cox et P. Styles, *J. Mag. Res.*, 1980, **40**, 209.
- (61) J. L. Delayre, J. S. Ingwall, C. Malloy et E. T. Fossel, *Sciences*, 1981, **212**, 935.