



# Mesure du métabolisme énergétique cérébral par RMN du 31P in vivo : Validation méthodologique multimodale et application à l'étude de la neurodégénérescence

Myriam Chaumeil

## ► To cite this version:

Myriam Chaumeil. Mesure du métabolisme énergétique cérébral par RMN du 31P in vivo : Validation méthodologique multimodale et application à l'étude de la neurodégénérescence. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Sud - Paris XI, 2008. Français. <tel-00743243>

**HAL Id: tel-00743243**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00743243>**

Submitted on 18 Oct 2012

**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.

N° D'ORDRE : 9112



## THESE DE DOCTORAT

DISCIPLINE : PHYSIQUE

*Ecole doctorale "Sciences et Technologies de l'Information  
des Télécommunications et des Systèmes"*

PRESENTEE PAR : Myriam CHAUMEIL

SUJET :

Mesure du métabolisme énergétique cérébral  
par RMN du  $^{31}\text{P}$  *in vivo* :  
Validation méthodologique multimodale  
et application à l'étude de la neurodégénérescence

Soutenue le **17 septembre 2008** devant les membres du jury :

Mr Jacques BITTOUN	Examineur
Mr Jean-Michel FRANCONI	Rapporteur
Mr Philippe HANTRAYE	Directeur de thèse
Mr Vincent LEBON	Responsable du travail de thèse
Mr Luc PELLERIN	Examineur
Mme Sabrina RONEN	Invitée
Mr Christoph SEGEBARTH	Rapporteur

*A Loukoum et P'tite Vache  
et à Caillou bien sûr...*

# Remerciements

*Quand on ne sait rien, on peut tout de meme trouver des choses,  
Avec de l'imagination.*  
Boris Vian

Cette thèse est le fruit d'un nombre certain d'heures de travail et d'échanges scientifiques mais aussi d'un certain nombre d'heures de partage et d'échanges personnels. Au cours des prochaines lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à sa réalisation et qui ont partagé et égayé les trois dernières années de ma vie d'étudiante...

## *Au laboratoire...*

Cette thèse a été réalisée dans une atmosphère extrêmement agréable malgré toutes les difficultés que représente un changement de lieu de travail. Je tiens à remercier l'ensemble des personnes que j'ai eu la chance de côtoyer au SHFJ et à NeuroSpin au cours de ces trois années.

Un grand merci à Philippe Hantraye pour m'avoir fait confiance en acceptant de diriger ce travail de thèse, à Emmanuel Brouillet pour sa disponibilité et ses précieux conseils, à Gilles Bonvento pour ses remarques avisées, à Maryline pour avoir su gérer mon cas administratif délicat tout en gardant le sourire qui la caractérise, à l'ensemble du personnel du LBIOM, en particulier Lionel, Katel, Véronique et Séverine, pour leur aide précieuse et leur bonne humeur, et bien entendu à toutes les personnes du LRMN avec qui cela a été un plaisir de travailler. Un merci tout particulier à Luisa et Cécile pour leurs sourires tous les matins.

Un immense merci à mes deux prédécesseurs, Julien et Fawzi, pour avoir au cours des années précédentes ouvert une voie royale à la spectroscopie RMN in vivo et pour m'avoir ainsi permis de réaliser cette thèse dans des conditions plus qu'excellentes. Merci de m'avoir écoutée et épaulée tout au long de ces trois années, merci pour votre amitié, votre aide plus que précieuse et votre enthousiasme à toute épreuve. En espérant que nos chemins se recroisent prochainement...

Un grand merci à mes collègues-amis de tous les jours : Sébastien pour sa gentillesse et son humour, Aurélie pour sa générosité et toutes nos discussions caféinées, Yann pour son sourire et sa bonne humeur à l'épreuve des balles, Disa pour notre trek mémorable et son énergie venue du froid.

Un merci tout particulier à Gaëlle pour m'avoir activement supportée lors des longues expériences menées sur le 7T, pour avoir rédigé avec moi l'abstract le plus rapide de l'histoire, pour nos ballades en moto sur l'autoroute, mais également et avant tout pour son aide et son amitié en dehors du labo. Rendez-vous à 4000m dès que je rentre !

Une pensée toute spéciale pour mes trois acolytes fans de karaoké et de conversations interminables : Albertine, milles mercis pour tout... Pour ton amitié, ton soutien de tous les jours autour de millions de tasses de café, nos soirées japonais ou champagne... Martine, alias Monkey Chef, je te remercie de m'avoir enseigné l'art martial du maniement du cathéter et du laryngo ('Cause I gotta have faith...). Anne So, merci pour toutes nos discussions au labo ou en dehors... En espérant avoir bientôt l'occasion de partager avec vous de nouvelles expériences scientifiques et/ou musicales !

Un grand merci à Pierre Carlier pour m'avoir accueilli le temps de quelques mois dans son laboratoire. Merci également à toute son équipe, en particulier Céline, Jacques, Sandrine, Claire et Didier pour leur aide précieuse et leur écoute.

Pour ses conseils avisés et son sens de l'improvisation, un grand merci à Pierre-Gilles Henry.

Je souhaiterais également remercier les membres de mon jury de thèse, Mme Sabrina Ronen et MM Jacques Bittoun, Jean-Michel Franconi, Christoph Segebarth et Luc Pellerin, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour leurs remarques extrêmement enrichissantes et leurs conseils avisés.

Et enfin, je ne remercierai jamais assez la personne qui m'a entourée de son expertise scientifique mais également de son enthousiasme débordant pendant ces trois années de thèse ; un immense et profond merci à Vincent. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir épaulée pendant les moments difficiles (et il y en a eu !), d'avoir toujours pris le temps de m'écouter au SHFJ, à NeuroSpin, dans le RER, à Vienne ou ailleurs, d'avoir su me laisser l'espace dont j'avais besoin tout en sachant être là des qu'il le fallait, de m'avoir appris tellement de choses, d'avoir confirmé et décuplé mon goût pour la recherche ; merci de savoir être sérieux lorsque les circonstances l'exigent mais également de faire preuve d'humour et de dérision lorsque d'autres circonstances l'exigent... Un immense et profondément sincère merci à toi. J'espère de tout coeur que nous aurons l'occasion de partager ensemble de nouvelles aventures scientifiques et humaines.

---

*Et en dehors...*

Parlons de ce genre de personnes qui vous suivent à chaque étape, et qui vous suivront encore longtemps. Merci à mes petits Kebs, mes potes du Sud Ouest, mes partenaires de jour et de nuit... Juju alias Caliente Néréis, Maga le petit oursin australien, Marisou dans le rôle du mur, Lucile ou DJ Lul, et mes trois soeurette WKC, Claire mon p'tit Keb adoré, Jenny the vampire slayer (t'es plus forte que Buff'), Perrine mon énergie cinétique... Merci à vous d'avoir été la tout au long du chemin, depuis le cours de l'Argonne qui nous a rendu célèbre jusqu'aux rues parisiennes (ou toulousaines ou burundaises) qui vous abritent maintenant. Criquet, grenouille, gardon, flic, carpelle, pistil, kapok, panneau, poivre, TS, SC, danse du pollen, carré/rond/triangle... et kebab bien sur.

Sophie et Florent, ou l'art du sourire, de l'hospitalité et de la mitochondrie. Soso, merci pour ton écoute, ton soutien et ton amitié sans faille. Eve se lèvera toujours avec nous... Floflo, merci d'avoir transformé mon rêve mitochondrial en réalité p. 102 et dans PNAS, t'es le plus fort.

*Rien de plus futile, de plus faux, de plus vain, rien de plus nécessaire que le théâtre* (L. Jovet) Merci à Solène, Mimi, Nat, Ad, Emilie, Gaby, Hanif, Marco, Ramy, Odile, Marion, Jean-Paul, Disa, Kalina, Adèle, Max, JD, Doro, Fabrice, Mab, Alice, Julian, et tant d'autres pour avoir partagé le temps de quelques actes cette passion nécessaire à mon équilibre. Un remerciement tout particulier à Chouchou, la plus pro d'entre nous, pour tous nos échanges théâtraux, on stage or backstage (ne m'oublie pas quand tu seras une super star).

Au couple phare de la 120, Marion et Alex, merci pour tout. Je n'oublierai pas nos fondues avalées en 1 heure sur la plaque électrique Marionette, ni nos réglages de Michelson Binôme...

Merci aux filles de la 120, Marion, Hélène, Solène, Odile, Mimi et Nat pour tous nos repas pas si " filles " que ça. En espérant remettre ça un de ces jours...

Et dans le cosmos, il y a Odile et Ramy, les amis de tous les jours. Dilou, merci pour tout et encore plus, nos cafés, nos voyages en 6D, nos cafés, nos chasses à la souris renégate, nos cafés, nos échanges plus ou moins studieux pendant les années d'école, nos cafés, tes réveils toniques du matin à la rez, nos cafés, nos fatigues partagées pendant la rédaction, nos cafés, et encore tellement de choses... Ramy, mon cosmochef, merci pour ton sourire, pour tout nos échanges théâtraux (je joue, tu montes ou tu joues, je monte?), pour notre slow interminable, pour nos karaokés endiablés, pour nos danses sur BS (pour ne pas la citer), pour tenter de chanter à la tierce sur toutes les chansons du monde (On a tenu la distance)... Merci à vous de votre amitié. Rendez-vous le 11 juillet.

Un merci très spécial à Céline, ma soeurette de master et de thèse. Merci pour ton

écoute, nos échanges scientifiques ou non, ton aide plus que précieuse au laboratoire de RMN de la Pitie Salpêtrière, mais surtout merci pour ton amitié, ton soutien, nos journées DCo, nos soirées japonaises ou basquaises, ton énergie pétillante et ton humour a toute épreuve. Skwini à toi choupette.

Pour m'avoir permis de me rendre compte que la main d'un orang-outang c'est grand!, pour nos barbecues VIP à coté de Nesquik, pour les tonnes de foin dérobées, mais surtout pour sa générosité, son sourire et son amitié, un immense merci à Christelle.

Une petite ritournelle pour Sieur Sébastien M. Merci pour ton amitié et ton grand coeur. *C'était la Dolce Vita...*

Aux petites têtes qui m'ont accompagné lors de ces trois années, me tenant compagnie pendant les longues nuits de rédaction et criant à chaque ouverture du frigo. Une gratouille à Spike, Ciboulette, Muscade, Allumette, Echalote et Estragon.

Je tiens également à remercier les personnes qui m'ont connu avant même que je ne sache compter. Jean-Paul, mon compagnon de route, merci pour tout. Je sais maintenant que, quoi qu'il arrive, on ne débarrassera jamais l'un de l'autre... Julien (ou Cotuch' pour les intimes), merci pour ton amitié et nos échanges, sur un air de bandas! Et bien sur Lilou, mon amie de toujours, merci d'avoir été là toutes ces années, merci pour cette formidable amitié, tu sais tout ce que je te dois...

Comme disait un certain Pierre, *L'amour... il y a ceux qui en parlent et il y a ceux qui le font. A partir de quoi il m'apparaît urgent de me taire.* A Toi, je ne dirai donc rien d'autre que merci...

A Maman, Papa, Pioul et Delph... Mes p'tits frère et soeur, ne changez rien, vous êtes les plus beaux et les plus forts. Quand à vous, Papa et Maman, il vous en a fallu de la patience et de la confiance pour m'avoir aidée à devenir adulte. Je ne serai pas où j'en suis sans vous. Merci.

# Table des matières

<b>Remerciements</b>	<b>i</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>ix</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>I Contexte neurobiologique et technologique</b>	<b>1</b>
<b>1 Métabolisme énergétique cérébral et neurodégénérescence</b>	<b>3</b>
1.1 Introduction au métabolisme énergétique . . . . .	3
1.1.1 ATP et travail cellulaire . . . . .	5
1.1.2 Principaux mécanismes cataboliques cérébraux . . . . .	8
1.1.3 Variabilité métabolique . . . . .	17
1.1.4 Réserves et tampons énergétiques . . . . .	18
1.2 Neurodégénérescence : cas de la maladie de Huntington . . . . .	24
1.2.1 Présentation générale de la MH . . . . .	24
1.2.2 Altérations énergétiques dans la MH . . . . .	24
1.3 Conclusion . . . . .	30
<b>2 Méthodes de neuroimagerie du métabolisme énergétique <i>in vivo</i></b>	<b>31</b>
2.1 La tomographie par émission de positons . . . . .	32
2.1.1 Description générale . . . . .	32
2.1.2 Mesures métaboliques cérébrales accessibles . . . . .	34
2.1.3 Limitations . . . . .	37
2.2 La spectroscopie par résonance magnétique <i>in vivo</i> . . . . .	39
2.2.1 Mesure des concentrations métaboliques . . . . .	39
2.2.2 Mesure des flux métaboliques . . . . .	41



2.2.3	Mesure des paramètres d'équilibre . . . . .	53
2.2.4	Limitations . . . . .	55
<b>Partie I : Conclusion</b>		<b>56</b>
<b>II Validation multimodale de la mesure de synthèse d'ATP par RMN du <math>^{31}\text{P}</math></b>		<b>59</b>
<b>3</b>	<b>Plan expérimental</b>	<b>61</b>
3.1	Flux mesurés et couplages métaboliques . . . . .	62
3.2	Systèmes d'imagerie utilisés . . . . .	64
3.2.1	Système RMN 3 teslas . . . . .	64
3.2.2	Système TEP . . . . .	65
3.3	Manipulation des primates . . . . .	66
3.3.1	Positionnement des primates . . . . .	66
3.3.2	Anesthésie . . . . .	67
3.3.3	Suivi physiologique . . . . .	67
3.4	Volume d'intérêt et sensibilité . . . . .	68
3.4.1	Choix du volume d'intérêt . . . . .	68
3.4.2	Sensibilité des différentes méthodes et nombre de sessions . . . . .	69
<b>4</b>	<b>Mesure des flux métaboliques cérébraux</b>	<b>71</b>
4.1	Mesure du flux glycolytique CMRglc par $^{18}\text{F}$ -FDG TEP . . . . .	72
4.1.1	Matériel et Méthodes . . . . .	72
4.1.2	Résultats . . . . .	73
4.2	Mesure de la vitesse du cycle de Krebs $V_{TCA}$ par RMN du $^{13}\text{C}$ . . . . .	76
4.2.1	Matériel et Méthodes . . . . .	76
4.2.2	Résultats . . . . .	80
4.3	Mesure de la vitesse de synthèse d'ATP $V_{ATP}$ par RMN du $^{31}\text{P}$ . . . . .	83
4.3.1	Matériel et Méthodes . . . . .	83
4.3.2	Résultats . . . . .	89
<b>5</b>	<b>Validation de la méthode de transfert de saturation et évaluation du rendement énergétique cérébral</b>	<b>95</b>
5.1	Cohérence des flux mesurés . . . . .	95
5.1.1	Cohérence avec la littérature . . . . .	95

5.1.2	Compartimentation du métabolisme énergétique . . . . .	96
5.1.3	Couplage glycolyse/cycle de Krebs . . . . .	96
5.2	Validation de la mesure de $V_{ATP}$ . . . . .	97
5.3	Evaluation du rendement énergétique global . . . . .	101
<b>Partie II : Conclusion</b>		<b>102</b>
<b>III Applications à l'étude de la neurodégénérescence</b>		<b>105</b>
<b>6</b>	<b>Etude du métabolisme énergétique cérébral par RMN du <math>^{31}\text{P}</math> dans la maladie de Huntington</b>	<b>107</b>
6.1	Matériel et Méthodes . . . . .	109
6.1.1	Système RMN . . . . .	109
6.1.2	Sujets . . . . .	109
6.1.3	Spectroscopie du $^{31}\text{P}$ . . . . .	112
6.1.4	Traitement des données . . . . .	114
6.2	Résultats . . . . .	117
6.2.1	Evaluation de la contamination musculaire au signal $^{31}\text{P}$ détecté . .	117
6.2.2	Mesure des concentrations métaboliques . . . . .	117
6.2.3	Détermination du pH cérébral . . . . .	119
6.2.4	Détermination de $V_{ATP}$ . . . . .	122
6.3	Discussion . . . . .	125
6.3.1	Contamination musculaire limitée . . . . .	125
6.3.2	Stabilité des concentrations métaboliques . . . . .	125
6.3.3	Alcalinisation cérébrale significative . . . . .	126
6.3.4	Limites de la mesure de $V_{ATP}$ . . . . .	127
6.3.5	Séquence non localisée et interprétation des résultats . . . . .	134
6.4	Conclusion et Perspectives . . . . .	135
<b>7</b>	<b>Mesure du pH cérébral par RMN du <math>^{31}\text{P}</math> dans le modèle rongeur de la maladie de Huntington</b>	<b>137</b>
7.1	Matériel et Méthodes . . . . .	138
7.1.1	Système RMN . . . . .	138
7.1.2	Animaux et protocole d'intoxication . . . . .	140
7.1.3	Positionnement et anesthésie des rongeurs . . . . .	142

---

7.1.4	Acquisitions . . . . .	143
7.1.5	Traitement des données . . . . .	146
7.2	Résultats . . . . .	148
7.2.1	Suivi des animaux . . . . .	148
7.2.2	Détections de lésions . . . . .	149
7.2.3	Mesure du pH cérébral . . . . .	149
7.3	Discussion . . . . .	154
7.4	Conclusion . . . . .	160
	<b>Conclusion générale</b>	<b>160</b>
	<b>Annexe A : Résumé</b>	<b>164</b>
	<b>Annexe B : Publications</b>	<b>166</b>
	<b>Références bibliographiques</b>	<b>168</b>

# Liste des abréviations

3NP	Acide 3-nitropropionique
ADC	Coefficient de diffusion apparent
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AIM	Association institut de myologie
AK	Adénylate kinase
AMARES	Advanced method for accurate, robust and efficient spectral fitting
AMP	Adénosine monophosphate
Apaf1	Apoptotic protease activating factor 1
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
BGO	Bismuth germinate oxide
BHE	Barrière hématoencéphalique
BISTRO	B <sub>1</sub> insensitive train to obliterate signal
BOLD	Blood oxygen level dependent
BP	Broad pulse
CBV	Cerebral Blood Volume
CEA	Commissariat à l'énergie atomique
Cho	Choline
CK	Créatine kinase
CKa	Isoforme cytosolique liée de la CK
CKc	Isoforme cytosolique soluble de la CK
CKg	Isoforme cytosolique de la CK couplée à la glycolyse
CMR <sub>FA</sub>	Consommation cérébrale d'acides gras
CMRfdg	Consommation cérébrale de <sup>18</sup> F-FDG
CMRglc	Consommation cérébrale de glucose
CMRO <sub>2</sub>	Consommation cérébrale d'oxygène
CPT-1	Carnitine palmitoyltransferase 1
Cr	Créatine
DPG	2,3-diphosphoglycérate
DSCr	Débit sanguin cérébral régional
EEG	Electroencéphalographie
ERETIC	Electric REference To access In vivo Concentrations
FAD/FADH <sub>2</sub>	Flavine adénine dinucléotide

FASTMAP	Fast automatic shimming technique by mapping along projections
$^{18}\text{F}$ -FDG	2- $^{18}\text{F}$ - fluoro-2-désoxy-D-glucose
$^{18}\text{F}$ -DOPA	L-6- $^{18}\text{F}$ -fluoro-3,4-dihydroxyphénylalanine
FLASH	Fast low angle shot
FID	Signal d'induction libre
FOV	Champ de vue
GABA	Acide $\gamma$ -amino-butyrique
GADPH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
Glu	Glutamate
GPC	Glycérophosphocholine
GPE	Glycérophosphoéthanolamine
HD	Atteint de la maladie de Huntington
HLSVD	Hankel-Lanczos singular value decomposition
HTRA2	HtrA serine peptidase 2
Htt	Huntingtine
i.v.	Intraveineux
i.m.	Intramusculaire
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IRM <sub>f</sub>	Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
ISIS	Image selected <i>in vivo</i> spectroscopy
jMRUI	Java-based MR user interface
KO	Knock Out
LC	Lumped Constant
LPSVD	Linear Predictive Singular Value Decomposition
MEG	Magnétoencéphalographie
MH	Maladie de Huntington
mHtt	Huntingtine mutée
Mi-CK	Isoforme mitochondriale de la CK
Mnd2	Motor neuron degeneration 2
MP	Phospholipides membranaires
NAA	N-acétyl aspartate
NAD <sup>+</sup> /NADH,H <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
OEF	Oxygen extraction fraction
OVS	Outer volume suppression
PC	Phosphocholine
PCr	Phosphocréatine
PDE	Phosphodiesters
PE	Phosphoéthanolamine
PGC1- $\alpha$	Peroxisome proliferator activator receptor $\gamma$ coactivator-1 $\alpha$
PGK	Phosphoglycérate kinase
Pi	Phosphate inorganique
PME	Phosphomonoesters
ppi	Purifié pour injection

---

ppm	Partie par million
PRESS	Point resolved spectroscopy
PSer	Phosphosérine
QUEST	Quantitation based on quantum estimation algorithm
RARE	Rapid acquisition with relaxation enhancement
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SDH	Succinate déshydrogénase
SHFJ	Service Hospitalier Frédéric Joliot
SNR	Rapport signal sur bruit
SRM	Spectroscopie par résonance magnétique
STEAM	Stimulated echo acquisition mode
TA	Temps d'acquisition
TE	Temps d'écho
TEP	Tomographie par émission de positons
TM	Temps de mélange
TNA	Translocases des nucléotides adényliques
TR	Temps de répétition
UCP	Uncoupling protein
UHDRS	Unified Huntington's disease rating scale
UIIBP	Unité d'imagerie isotopique, biochimique et pharmacologique
VAPOR	Variable power RF pulses with optimized relaxation delays
$V_{ATP}$	Vitesse de synthèse d'ATP à partir du Pi
$V_{NT}$	Vitesse de neurotransmission
$V_{PCr}$	Vitesse de synthèse d'ATP à partir de la PCr
$V_{TCA}$	Vitesse du cycle de Krebs
$V_{TCA,A}$	Vitesse du cycle de Krebs astrocytaire
$V_{TCA,N}$	Vitesse du cycle de Krebs neuronal
VOI	Volume d'intérêt
$W_{chimique}$	Travail chimique
$W_{mcanique}$	Travail mécanique
$W_{chimio-osmotique}$	Travail chimio-osmotique
YAC	Yeast artificial chromosomes



# Première partie

## Contexte neurobiologique et technologique





# Chapitre 1

## Métabolisme énergétique cérébral et neurodégénérescence

### 1.1 Introduction au métabolisme énergétique

*Tout échange ou transformation d'énergie dans un système ouvert augmente sa tendance spontanée vers le désordre.*

Comment concilier le second principe de la thermodynamique (énoncé ci-dessus), qui suppose l'augmentation constante de l'entropie de l'Univers, avec la nature hautement organisée des êtres vivants ? Pour comprendre cette observation, il est nécessaire de considérer chaque système biologique (biosystème) comme un système ouvert en déséquilibre permanent. En effet, afin d'assurer sa survie par une continuelle auto-réplication de sa forme et de sa structure, un biosystème doit en permanence se maintenir hors équilibre en assurant le renouvellement de ses molécules et le maintien des grandeurs dites de tension des compartiments qui le composent. Pour ce faire, un organisme vivant puise de l'énergie dans l'environnement afin de la convertir en travail utile, et rejète de la chaleur et des molécules de faible énergie dans le milieu extérieur. Par ce processus, l'énergie libre du biosystème augmente au fur et à mesure que son entropie propre diminue et que l'entropie de l'Univers (système biologique + environnement) augmente. Ainsi, les organismes vivants sont des îlots de faible entropie qui, en combattant leur propre tendance au désordre, contribuent à rendre l'Univers de plus en plus désordonné.

**Notion d'énergie libre** Dans le monde animal, toute l'énergie utilisée par les biosystèmes dit hétérotrophes provient exclusivement de la scission de molécules organiques directement ou indirectement produites par le monde végétal, et qui portent le nom de nutriments ou substrats énergétiques. Au niveau de l'organisme, la conversion de l'énergie contenue dans ces nutriments en travail utile a lieu au cours de réactions biochimiques complexes. L'ensemble de ces réactions de synthèse et de dégradation est appelé *métabolisme* (du grec *metabolê* changement). Afin de pouvoir comprendre les différentes voies métaboliques, il est tout d'abord nécessaire de classifier les différentes réactions biochimiques et, pour ce faire, d'introduire la notion d'énergie libre. Par définition, l'énergie libre  $G$ , ou énergie de Gibbs, est la partie de l'énergie d'un système qui peut produire du travail à température et à pression constante. Par extension aux systèmes biologiques, l'énergie libre  $G'_0$ , énergie utilisable par les cellules, mesurée *in vitro* dans les conditions biochimiques suivantes (dites conditions standard biologiques) :  $T=298\text{K}$ ,  $\text{pH}=7$ ,  $P=101.3\text{kPa}$ ,  $[\text{S}]=1\text{M}$ . Elle est donnée par l'équation :

$$G'_0 = H'_0 - TS'_0 \quad (1.1)$$

où  $H'_0$  est l'énergie potentielle totale (enthalpie) contenue dans les liaisons chimiques,  $T$  la température du biosystème et  $S'_0$  l'entropie de la molécule qui quantifie sa propension à perdre de l'énergie sous forme de chaleur. Ainsi, l'énergie libre prend en compte le fait que la dégradation d'un substrat énergétique s'accompagne irrémédiablement d'une perte d'énergie sous forme de chaleur, énergie non utilisable par les cellules et donc évacuée. Considérons alors une réaction chimique simple, dans laquelle un substrat (S) donne un produit (P). Les systèmes biologiques opérant à température et à pression constante, il est possible de prévoir le sens et le degré de spontanéité des réactions qui s'y déroulent en évaluant la différence d'énergie libre  $\Delta G'_0$  entre les produits et les réactifs (**Equations 1.2**).



où  $K_e$  est la constante d'équilibre de la réaction,  $R$  est la constante des gaz parfaits ( $R = 8,314472 J.K^{-1}.mol^{-1}$ ), et  $T$  est la température du système (ici  $T=298K$  car conditions standard biologiques). Ainsi, une réaction exergonique ( $\Delta G'_0 < 0$ ) est une réaction qui s'accompagne d'une libération nette d'énergie ; cette réaction peut être spontanée ou nécessiter l'apport d'une énergie dite d'activation  $\Delta E_a > 0$  pour avoir lieu. Au contraire, une réaction endergonique ( $\Delta G'_0 > 0$ ) est forcément non spontanée et nécessite l'apport d'une énergie au minimum égale à  $\Delta G'_0$  pour se produire.

**Métabolisme énergétique cérébral** Le terme de métabolisme regroupe l'ensemble des réactions chimiques de synthèse et de dégradation ayant lieu dans un biosystème. Dans ce rapport, nous nous intéresserons exclusivement au *métabolisme énergétique cérébral* et plus spécifiquement aux voies métaboliques cérébrales de synthèse d'énergie. En effet, les demandes énergétiques du cerveau sont colossales : alors qu'il représente seulement 2% de la masse corporelle, sa consommation d'oxygène et de glucose représente environ 20% de celle de l'organisme complet et le flux sanguin qu'il reçoit 10% du flux cardiaque total (Magistretti et al., 1999). Ainsi, dans les sections suivantes seront tout d'abord énoncées brièvement les différents voies endergoniques correspondant aux différents travaux cellulaires puis seront détaillés les différents mécanismes biochimiques de synthèse d'énergie occurring dans le cerveau.

### 1.1.1 ATP et travail cellulaire

Le rôle principal du métabolisme énergétique cellulaire est de transférer de l'énergie aux réactions endergoniques en les couplant à des réactions exergoniques, *via* un intermédiaire énergétique phosphorylé : on parle de couplage énergétique cellulaire. Au niveau cérébral, tout comme d'ailleurs dans la majorité des autres organes, la molécule énergétique phosphorylée la plus utilisée est l'adénosine tri-phosphate (ATP), molécule à haute énergie libre stockée massivement dans les cellules. L'ATP est un nucléoside tri-phosphate formé d'une adénine liée à un ribose, lui-même relié à trois groupements phosphates (**Figure 1.1**).

La queue triphosphatée de l'ATP est un segment thermodynamiquement instable, les trois groupements phosphates portant des charges négatives exerçant entre elles des forces ré-

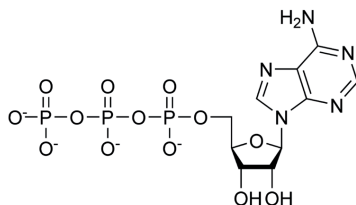
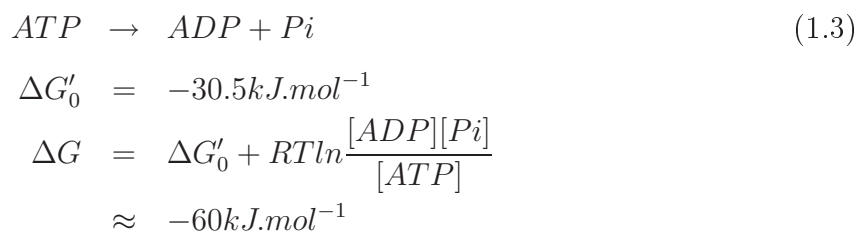


FIG. 1.1 – **Structure chimique d'une molécule d'ATP** L'ATP est un nucléoside tri-phosphate formé d'une adénine liée à un ribose, lui même relié à trois groupements phosphates

pulsives. Ainsi, l'ATP est une molécule facilement hydrolysable au niveau de la dernière liaison phosphate, les produits de cette réaction étant l'adénosine di-phosphate (ADP) et le phosphate inorganique (Pi), produits thermodynamiquement plus stables (**Equations 1.3**). L'hydrolyse de l'ATP est donc une réaction exergonique libérant en conditions standard biologiques une énergie de 30.5kJ par mole d'ATP hydrolysée. *In vivo*, on estime que la valeur de  $\Delta G$  se situe plutôt autour de 60 kJ par mole (Erecinska and Silver, 1989). En effet, *in vivo*, les concentrations relatives d'ATP, d'ADP et de Pi sont maintenues hors équilibre ( $[ATP]_{in vivo} > [ATP]_{in vitro}$ , contrairement aux conditions standard biologiques où les composés sont en équilibre ( $K=K_e$ ).



A l'intérieur des cellules, l'énergie libre dégagée par cette hydrolyse est directement transférée à des processus endergoniques grâce à des enzymes spécifiques de couplage. Ces enzymes permettent le transfert du groupement phosphate de l'ATP sur le substrat de la réaction, créant un intermédiaire phosphorylé moins stable mais plus réactif que le substrat original. Ce phénomène est connu sous le nom de *phosphorylation au niveau du substrat*. La création de ces intermédiaires phosphorylés permet la réalisation des divers travaux cellulaires, dont les trois types principaux sont :

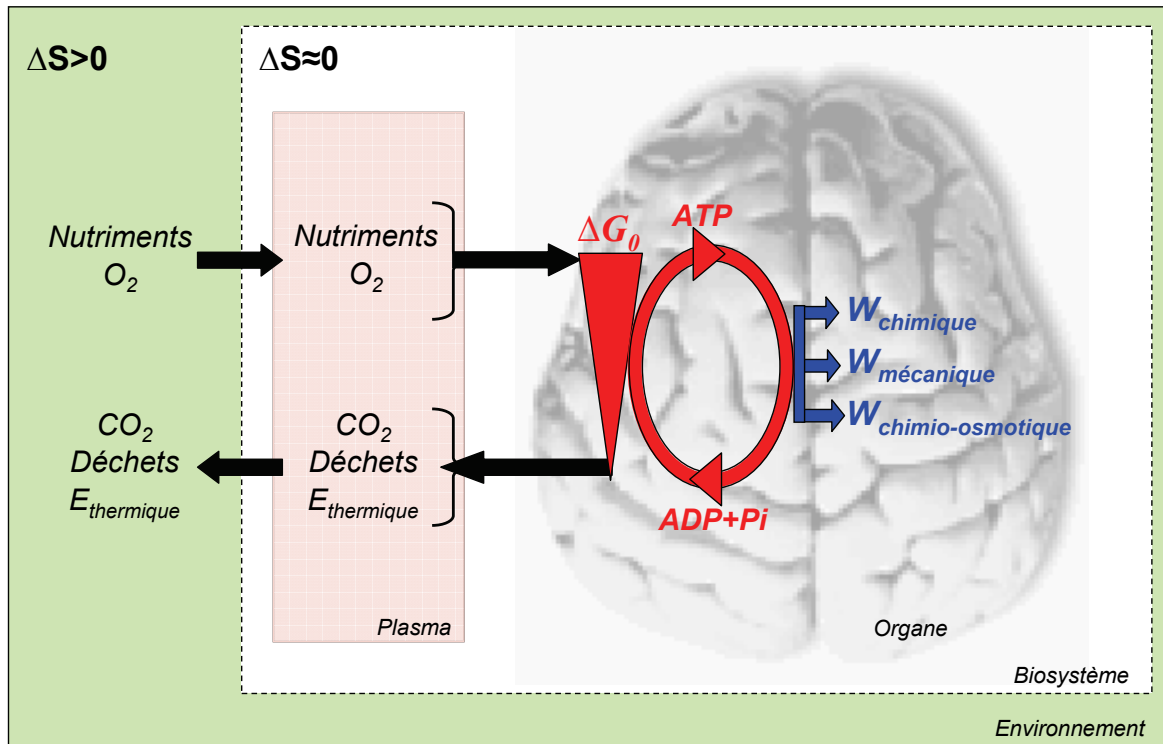


FIG. 1.2 – **Schéma énergétique général d'un biosystème.** Les nutriments énergétiques et le dioxygène sont prélevés dans l'environnement par le biosystème dans lesquels ils sont convertis en molécules d'ATP utilisées pour les différents travaux cellulaires ( $W$ ).

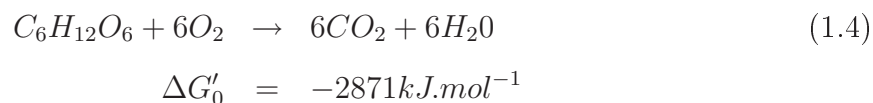
- Le travail de synthèse chimique, tel que la synthèse de polymères complexes à haute énergie libre à partir de monomères (synthèse d'acides nucléiques à partir de nucléotides ou de protéines à partir d'acides aminés par exemple).
- Le travail mécanique, qui inclut le transport de vésicules le long des fibres du cytosquelette ou les phénomènes d'endocytose et d'exocytose se produisant lors de transmissions synaptiques par exemple.
- Le travail osmotique ou chimio-osmotique, consistant principalement à maintenir les potentiels de membrane (cellulaires et mitochondriaux) en maintenant l'homéostasie cellulaire et les gradients ioniques en particulier.

Ces travaux cellulaires sont également appelés voies *anaboliques* car ce sont des voies qui consomment l'énergie produite. Afin de fournir l'ATP nécessaire à ces travaux, il existe également des voies dites *cataboliques* qui, utilisant l'énergie libre fournie par les nutriments et le dioxygène issu de la respiration, permettent la synthèse du stock d'ATP

cellulaire et sa régénération permanente (Erecinska and Silver, 1989).

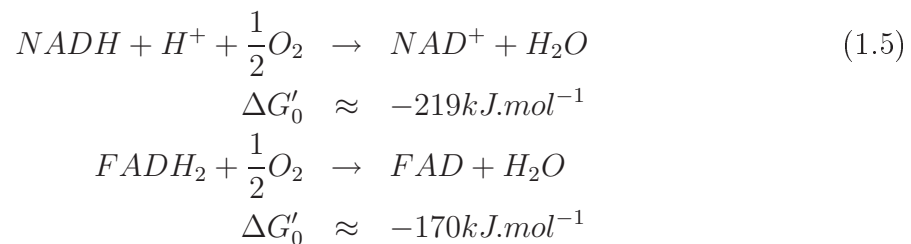
### 1.1.2 Principaux mécanismes cataboliques cérébraux

Dans cette section, nous nous intéresserons plus précisément aux différents mécanismes de synthèse d'ATP ayant lieu dans les cellules cérébrales (neurones ou cellules gliales), l'importance relative des différents mécanismes cataboliques variant considérablement d'un organe à l'autre. Dans le cerveau, la principale voie catabolique utilisée par les cellules est la respiration cellulaire aérobie. Cette voie peut se décomposer en trois étapes principales que nous décrirons en détail par la suite : *(i)* la glycolyse, *(ii)* le cycle de Krebs et *(iii)* la phosphorylation oxydative. Bien que les glucides, les lipides et les protéines puissent, après traitement, devenir des combustibles de la respiration cellulaire aérobie, il est d'usage de présenter les étapes de la respiration cellulaire aérobie en décrivant la dégradation du glucose ( $C_6H_{12}O_6$ ). L'équation bilan théorique de cette voie catabolique est la suivante :



**Mécanismes d'oxydoréduction** Par définition, une réaction d'oxydoréduction (rédox) est une réaction au cours de laquelle des électrons  $e^-$  sont transférés entre deux composés X et Y :  $Xe^- + Y \rightarrow X + Ye^-$ . La substance X, i.e. le donneur d'électrons, est appelée agent réducteur et est oxydée au cours de la réaction. De même, la substance Y, i.e. l'accepteur d'électrons, est appelée agent oxydant et est réduite au cours de la réaction. Cependant, il faut noter que les réactions rédox n'impliquent pas toujours le transfert complet des électrons d'une substance à l'autre ; certaines ne font que modifier le degré de mise en commun des électrons dans les liaisons covalentes. Cette variation de degré de mise en commun est déterminée par les électronégativités respectives des donneurs et des accepteurs. Ainsi, un électron libère de l'énergie potentielle lorsqu'il est transféré d'un atome faiblement électronégatif vers un atome fortement électronégatif, et vice versa. Etant donné sa forte électronégativité, le dioxygène  $O_2$  figure parmi les agents oxydants les plus puissants.

Considérons maintenant l'équation bilan de la respiration aérobie (**Equation 1.4**) sous l'angle de l'oxydoréduction. Cette réaction correspond à une oxydation du glucose couplée à une réduction du dioxygène, au cours de laquelle il y a libération d'énergie potentielle par transfert d'électrons. En effet, le degré de covalence des électrons change lorsque l'hydrogène est transféré à l'oxygène. Ainsi, les nutriments énergétiques sont des réservoirs d'électrons associés à l'hydrogène. Malgré son caractère fortement exergonique  $\Delta G'_0 < 0$ , la combustion du glucose par l'oxygène n'est pas une réaction spontanée mais nécessite pour être amorcée l'apport d'une énergie d'activation  $\Delta E_a > 0$ . *In vivo*, le franchissement de la barrière d'activation est rendu possible par la présence d'enzymes spécifiques. Cependant, il faut noter qu'il est difficile d'exploiter efficacement l'énergie lorsqu'elle se libère d'un bloc d'un combustible. Ainsi, la respiration cellulaire n'oxyde pas le glucose en une seule étape explosive mais en une série d'étapes toutes catalysées par un coenzyme. Lors de certaines de ces étapes, des atomes d'hydrogène sont arrachés à la molécule de glucose et permettent la réduction de coenzymes particuliers : le nicotinamide adénine dinucléotide ( $NAD^+$ ) et la flavine adénine dinucléotide ( $FAD$ ).



Lors de ces réductions, contrôlées par des enzymes dites déshydrogénases, les électrons transférés perdent peu de leur énergie potentielle. Ainsi, les coenzymes réduits  $NADH$ ,  $H^+$  et  $FADH_2$  représentent une réserve d'énergie qui sera utilisée par la chaîne respiratoire pour synthétiser de l'ATP.

## Glycolyse

La glycolyse, littéralement *dégradation du glucose*, a lieu dans le cytoplasme des cellules et est le premier stade catabolique de la respiration cellulaire aérobie. Elle débute la dégradation du glucose en le scindant en deux molécules de pyruvate  $C_3H_4O_3$ . Cette dégradation peut se subdiviser en dix étapes successives chacune catalysée par une enzyme spécifique (**Figure 1.3**). Les cinq premières étapes représentent la phase dite d'investissement



d'énergie durant laquelle des molécules d'ATP sont consommées afin de phosphoryler les molécules combustibles. Au cours des cinq dernières étapes, *i.e.* la phase de libération d'énergie, des molécules d'ATP et de  $NADH, H^+$  sont synthétisées. Le bilan net de la glycolyse est le suivant :



Ainsi, l'énergie libre stockée par les cellules dans les produits de la glycolyse (ATP et coenzymes réduits) est environ  $\Delta G'_0 = 2 \times (-60kJ.mol^{-1}) + 2 \times (-219kJ.mol^{-1}) = -558kJ.mol^{-1}$ , c'est-à-dire approximativement 19% de l'énergie libérable par mole de glucose (**Equation 1.4**). Le reste de l'énergie reste stocké dans les molécules de pyruvate.

### Cycle de Krebs

Les molécules de pyruvate libérées par la glycolyse entrent dans les mitochondries où elles sont converties en acétylCo-A par un complexe multi-enzymatique. Cette réaction exergonique permet la formation d'une molécule de  $NADH, H^+$  par molécule de pyruvate. L'acétyl-CoA va alors subir un cycle de dégradation totale dans la matrice mitochondriale. Ce cycle catabolique est appelé cycle de Krebs (Krebs, 1940b, Krebs, 1940a) ou encore cycle de l'acide citrique (**Figure 1.4**). A chaque tour du cycle de Krebs, deux atomes de carbone entrent sous la forme relativement réduite de l'acétyl-CoA et deux autres atomes de carbone ressortent sous la forme totalement oxydée du dioxyde de carbone  $CO_2$ . La majeure partie de l'énergie fournie par les étapes d'oxydation du cycle de Krebs est stockée sous forme de coenzymes réduits ( $3NADH, H^+$  et  $1FADH_2$  produits par molécule d'acétyl-CoA dégradé), une seule molécule d'ATP étant produite directement le long du cycle de Krebs par le mécanisme de phosphorylation au niveau du substrat. Les coenzymes réduits ainsi engendrés sont ensuite utilisés le long de la chaîne de transport d'électrons afin de synthétiser de l'ATP.

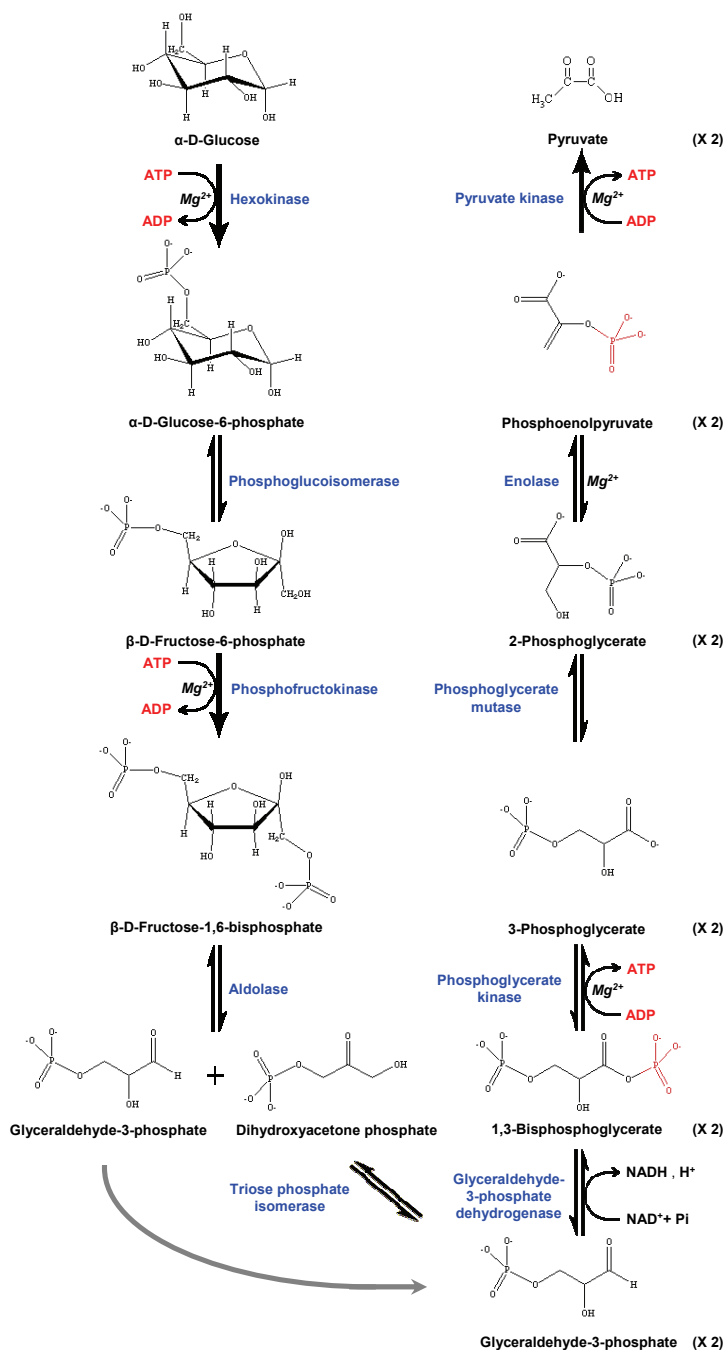


FIG. 1.3 – **Glycolyse** Chaque molécule de glucose est dégradée en deux molécules de pyruvate au cours de dix étapes consécutives. Deux molécules d'ATP et deux molécules de  $NADH, H^+$  sont ainsi libérées. D'après Karl J. Miller, *www.gwu.edu*.

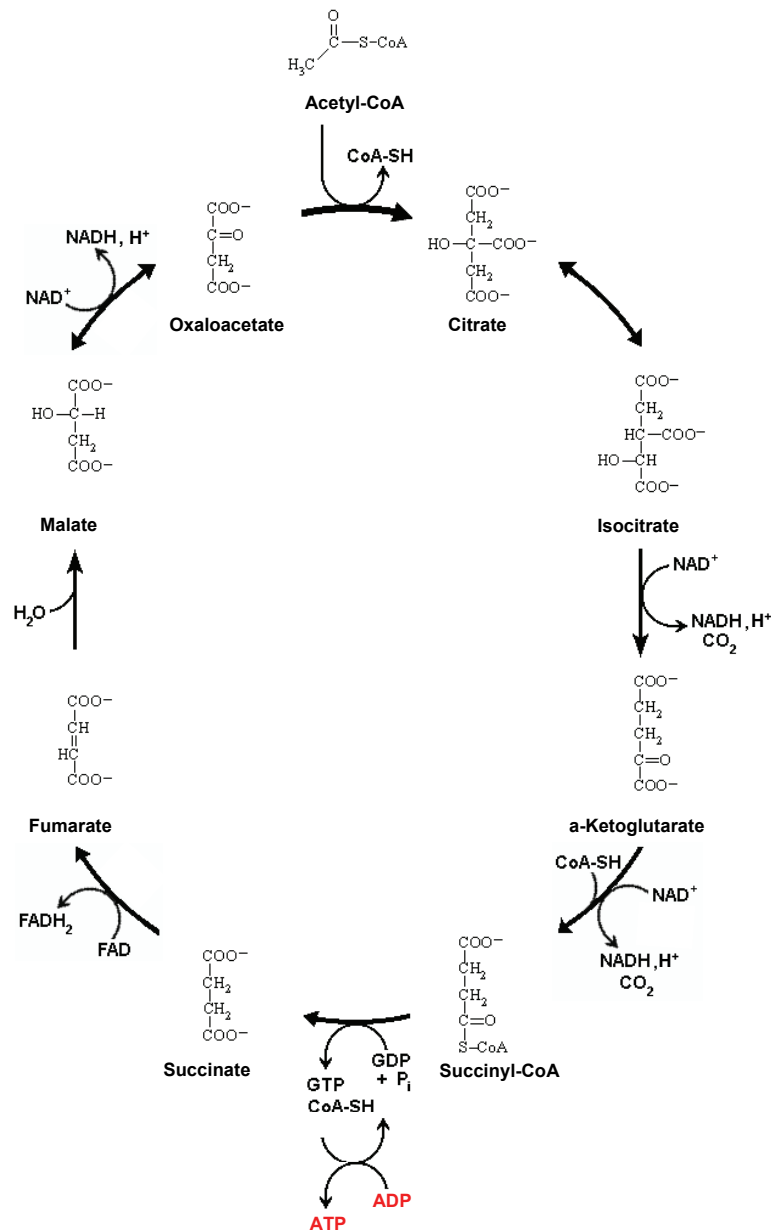


FIG. 1.4 – **Cycle de Krebs** A chaque tour du cycle de Krebs, deux atomes de carbone entrent sous la forme réduite de l'acétyl-CoA et deux autres atomes de carbone ressortent sous la forme totalement oxydée du dioxyde de carbone  $\text{CO}_2$ . La majeure partie de l'énergie fournie par les étapes d'oxydation du cycle de Krebs est stockée sous la forme de  $3\text{NADH}, \text{H}^+$  et  $2\text{FADH}_2$ , une seule molécule d'ATP étant produite directement. D'après Karl J. Miller, *www.gwu.edu*.

## Chaîne de transport d'électrons et phosphorylation oxydative

A ce stade de la respiration cellulaire, la dégradation d'une mole de glucose a seulement permis la production directe de deux moles d'ATP par phosphorylation au niveau du substrat. La majeure partie de l'énergie initiale du glucose est en effet stockée dans les coenzymes réduits  $NADH, H^+$  et  $FADH_2$ .

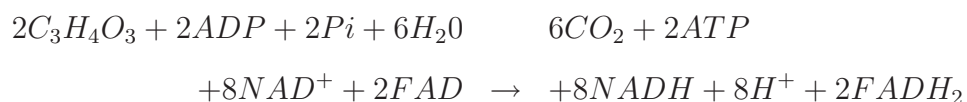
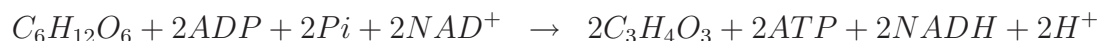
**Chaîne de transport d'électrons** La chaîne de transport d'électrons est un ensemble de molécules enchassées dans la membrane interne mitochondriale (**Figure 1.5 (a)**), membrane dont la surface est considérablement accrue par la présence de crêtes. Toutes les molécules de la chaîne de transport, excepté l'ubiquinone, sont des protéines liées à des groupements dits prosthétiques qui, lors du transport d'électrons le long de la chaîne, oscillent entre les états réduits et oxydés. La fonction de cette chaîne de transport consiste à transférer les électrons des nutriments, stockés sous forme de coenzymes réduits  $NADH, H^+$  et  $FADH_2$ , à l'oxygène moléculaire, accepteur final de la chaîne, en une série d'étapes libérant l'énergie de manière contrôlée. Afin de comprendre comment la chaîne de transport d'électrons produit de l'énergie, il est nécessaire de concevoir le transport d'électrons le long de la chaîne comme une "descente" énergétique, c'est-à-dire une suite de réactions redox visant à réduire l'intervalle d'énergie libre entre les donneurs d'électrons initiaux ( $NADH, H^+$  et  $FADH_2$ ) et l'accepteur final  $O_2$ . Il faut également noter que, alors que les molécules de  $NADH, H^+$  libèrent leurs électrons au niveau du complexe I, les coenzymes  $FADH_2$  transfèrent leurs électrons plus en aval, au niveau du complexe II (Succinate déshydrogénase SDH). Ainsi, la chaîne d'électrons fournit environ 30% moins d'énergie à la synthèse d'ATP lorsque le donneur d'électrons est  $FADH_2$  que lorsqu'il s'agit de  $NADH, H^+$ . L'énergie libérée au cours de la descente énergétique est utilisée afin de véhiculer des protons  $H^+$  à travers la membrane interne mitochondriale, de la matrice vers l'espace intermembranaire, créant ainsi un gradient électrochimique à l'origine d'une force dite protomotrice.

**Couplage chimio-osmotique** Outre les chaînes de transport d'électrons, la membrane interne mitochondriale renferme de nombreux exemplaires d'un complexe protéique appelé ATP synthétase (**Figure 1.5 (b)**). Ces complexes protéiques étant les seuls segments

membranaires perméables aux protons, les  $H^+$  accumulés dans l'espace intermembranaire vont, sous l'effet de leur gradient électrochimique, traverser la membrane au niveau de ces complexes. Le passage du flux protonique entraîne alors des changements complexes de conformation du complexe protéique ainsi que des mouvements de rotation qui sont à l'origine de la synthèse d'ATP (Noji et al., 1997, Elston et al., 1998, Rastogi and Girvin, 1999, Stock et al., 1999). Ce mécanisme de couplage est appelé *chimio-osmose*.

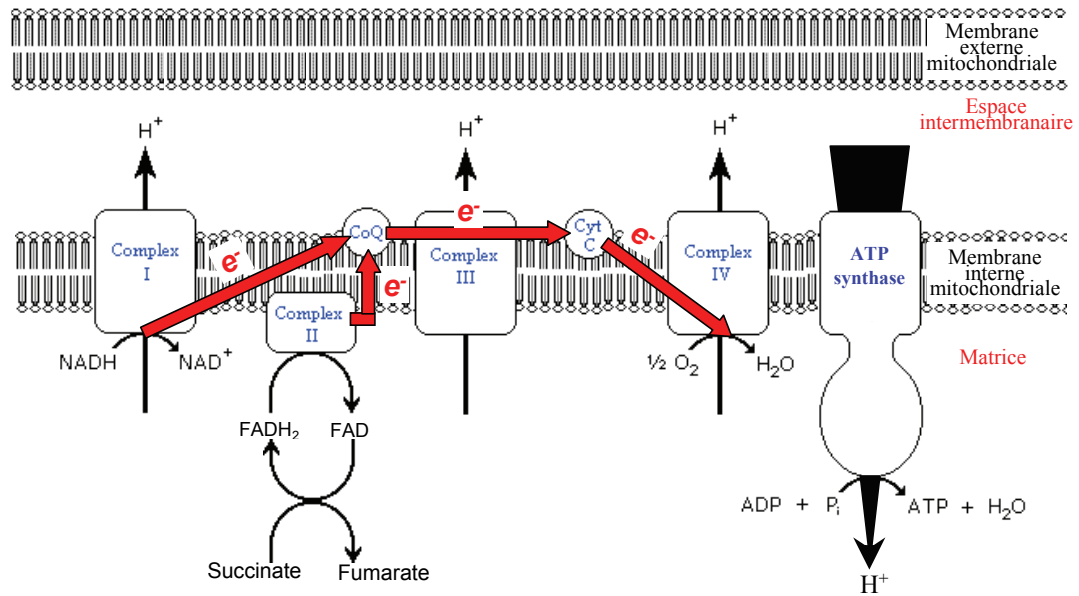
### Bilan énergétique

Considerons tout d'abord les équations bilan des deux premières étapes de la respiration cellulaire aérobie, à savoir la glycolyse et le cycle de Krebs :

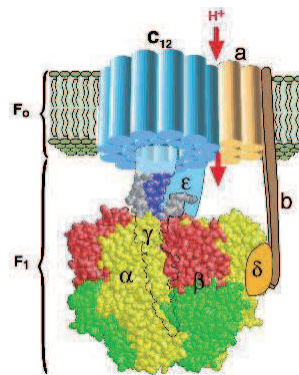


Notons dans un premier temps que les deux moles de  $NADH, H^+$  produites dans le cytoplasme au cours de la glycolyse sont ensuite converties en  $FADH_2$  lors de leur passage dans la matrice mitochondriale. Ainsi, au final, une mole de glucose produit en réalité 8 moles de  $NADH, H^+$  et 4 moles de  $FADH_2$  qui vont être utilisées par la chaîne de transport d'électrons.

Pour pouvoir établir un bilan énergétique total de la respiration cellulaire, il est alors nécessaire d'introduire le rapport dit  $P/O$ . Par définition, le rapport  $P/O$  est le nombre de molécules d'ATP synthétisées par atome d'oxygène réduit. La mesure des valeurs réelles des rapports  $P/O_{NADH, H^+}$  et  $P/O_{FADH_2}$  a longtemps présenté de nombreuses difficultés, en particulier *in vivo*, ce qui explique une variabilité importante des valeurs rapportées dans la littérature (Hinkle, 2005 pour revue). On a en effet longtemps considéré que



(a)



(b)

FIG. 1.5 – (a) Chaîne de transport d'électrons et (b) ATP synthétase. La fonction de la chaîne respiratoire (a) consiste à transférer les électrons des nutriments, stockés sous forme de coenzymes réduits  $NADH, H^+$  et  $FADH_2$ , à l'oxygène moléculaire, accepteur final de la chaîne, en une série d'étapes libérant l'énergie de manière contrôlée. Le gradient protonique résultant est à l'origine d'un flux de protons qui, en traversant la membrane externe mitochondriale, va entraîner des changements de conformations complexes de l'ATP synthétase (b) à l'origine de la synthèse d'ATP (Stock et al., 1999).

le transfert des électrons du  $NADH, H^+$  à l'oxygène le long de la chaîne respiratoire produisait environ 3 ATP ( $P/O_{NADH, H^+} = 3$ ), et que celui du  $FADH_2$  générait environ 2 ATP ( $P/O_{FADH_2} = 2$ ). Ces valeurs ont cependant été corrigées et déterminées avec précision depuis. Une étude récente a en effet permis de déterminer les valeurs de ces rapports, en montrant que le phénomène de translocation, c'est-à-dire l'échange d'un ATP sortant contre un ADP entrant lors du passage du flux protonique à travers l'ATP synthétase, contribuait à ce que les rapports P/O soient des nombres fractionnaires :  $P/O_{NADH, H^+} = 2.3$  et  $P/O_{FADH_2} = 1.4$  (Stock et al., 1999, Hinkle, 2005).

Les valeurs des rapports  $P/O_{NADH, H^+}$  et  $P/O_{FADH_2}$  étant maintenant connues précisément, il est alors possible d'effectuer un bilan énergétique théorique de la respiration cellulaire. Sachant que  $P/O_{NADH, H^+} = 2.3$  et que  $P/O_{FADH_2} = 1.4$ , la respiration cellulaire produit théoriquement  $N = 4 + 8 \times 2.3 + 4 \times 1.4 = 28$  moles d'ATP par mole de glucose dégradée. Sachant de plus que l'oxydation de chaque mole de coenzymes réduits ( $NADH, H^+$  et  $FADH_2$ ) s'accompagne de la réduction d'une mole d'oxygène (**Equations 1.6**), le rapport  $P/O_{global}$  théorique de la respiration cellulaire est de  $P/O_{global} = 28/12 = 2,33$ . Etant donné que l'oxydation complète d'une mole de glucose libre en conditions standard biologiques une énergie de  $\Delta G'_0 = -2871 kJ.mol^{-1}$  et que l'hydrolyse d'une mole d'ATP en conditions physiologiques libre une énergie de  $\Delta G \approx -60 kJ.mol^{-1}$ , il est possible d'établir le rendement théorique maximal  $r$  de la respiration cellulaire. On obtient un rendement de l'ordre de  $r \approx 59\%$ , le reste de l'énergie étant perdu sous forme de chaleur. Cependant, il faut souligner que le rapport  $P/O_{global}$  et le rendement théorique calculés précédemment sont *a priori* largement surestimés. En effet, les calculs précédents sont basés sur l'hypothèse que les couplages entre glycolyse, cycle de Krebs et phosphorylation oxydative sont parfaits, c'est-à-dire qu'il n'existe aucune perte et/ou qu'aucun autre flux n'intervient dans ces couplages, ce qui n'est probablement pas le cas *in vivo*. Par conséquent, afin de déterminer le rapport  $P/O_{global}$  et le rendement réel de la respiration cellulaire *in vivo*, il est nécessaire de connaître les valeurs réelles des vitesses du flux glycolytique, du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative afin d'évaluer leur couplage.

### 1.1.3 Variabilité métabolique

Outre les variations métaboliques temporelles, liées à l'activité cérébrale et aux conditions physiologiques, le cerveau présente une variabilité métabolique régionale remarquable. Au niveau macroscopique, il a été montré qu'il existe une différence de niveau de métabolisme énergétique entre les matières grises et blanches (Clarke and Sokoloff, 1994, Valette et al., 2008).

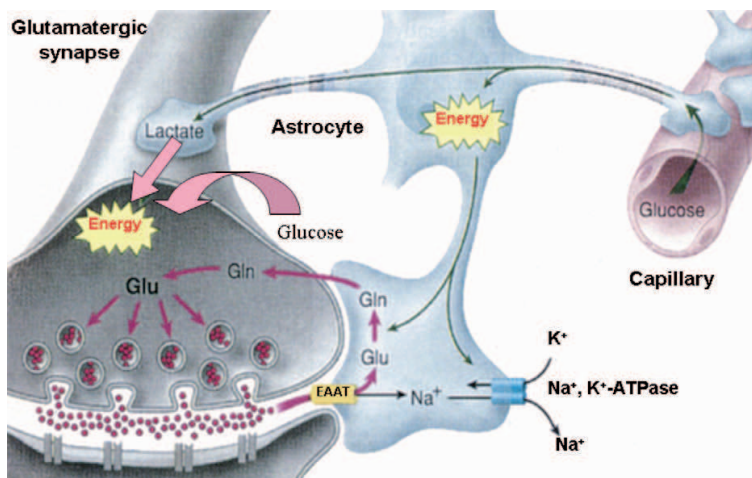


FIG. 1.6 – **Astrocyte-neuron lactate shuttle** Ce modèle décrit comment, lors de l'activation, le lactate issu de la glycolyse astrocytaire peut être transféré des astrocytes vers les neurones où il sera utilisé comme substrat énergétique. D'après Magistretti *et al.*, 1999.

Cette variabilité se retrouve également au niveau cellulaire. Le cerveau est en effet un organe complexe composé de deux types cellulaires majeurs, les neurones et les cellules gliales. Cependant, même si approximativement 90 à 95% de la synthèse et de la consommation d'énergie est attribuée aux neurones et est majoritairement oxydative (Erecinska and Silver, 1989, Attwell and Laughlin, 2001, Gruetter et al., 2001, Magistretti et al., 1999), le rôle des astrocytes n'est pas à négliger. En effet, de nombreuses études ont montré que la capture du glucose plasmatique et sa dégradation par voie glycolytique ont lieu préférentiellement dans les astrocytes (Pellerin and Magistretti, 1994, Pellerin and Magistretti, 2003, Véga et al., 2003). Au contraire, l'oxygène plasmatique étant majoritairement capté par les neurones, le métabolisme neuronal est principalement oxydatif (Attwell and Laughlin, 2001, Gruetter et al., 2001). Cette compartimentation métabolique est à l'origine d'un couplage énergétique entre les deux types cellulaires. Durant



la dernière décennie, le rôle essentiel des astrocytes dans le couplage entre activité synaptique et utilisation de glucose a largement été montré (Bittar et al., 1996, Pellerin et al., 1998, Kasischke et al., 2004, Loaiza et al., 2003, Serres et al., 2004), donnant naissance à un modèle appelé "astrocyte-neuron lactate shuttle" (pour revue voir Pellerin and Magistretti, 2003, Pellerin and Magistretti, 2004). Ce modèle décrit les mécanismes moléculaires se produisant lors d'une transmission synaptique glutamatergique et peut être résumé séquentiellement comme suit :

- recapture  $Na^+$ -dépendante du glutamate synaptique par des transporteurs spécifiques situés sur les astrocytes
- capture du glucose plasmatique par couplage à des pompes ATPasiques  $Na^+/K^+$  astrocytaires
- dégradation glycolytique du glucose dans les astrocytes
- transfert du lactate résultant des astrocytes vers les neurones, ce dernier pouvant être utilisé comme substrat énergétique lors des fortes demandes énergétiques associées à la transmission synaptique.

Ainsi, le métabolisme du glucose apparaît être fortement lié à l'activité neuronale glutamatergique via un couplage astrocytaire.

### 1.1.4 Réserves et tampons énergétiques

#### Réserves énergétiques

Au niveau cérébral, le glucose est stocké sous la forme de deux types de polymères principalement, à savoir le glycogène et les acides gras.

**Glycogène** Le glycogène cérébral est principalement stocké dans les astrocytes à une concentration de 6 à 12  $\mu mol.g^{-1}$  (Cruz and Dienel, 2002). Il est donc 10 à 50 fois moins concentré dans le cerveau que dans le foie et le muscle squelettique. Au vu de cette concentration relativement faible, le glycogène a longtemps été considéré comme une réserve d'énergie relativement insignifiante. Cependant, de nombreuses études récentes montrent que le glycogène est une réserve importante d'équivalents glucose modulée par un grand nombre de facteurs tels que les concentrations de neurotransmetteurs et de glucose (pour

revue voir Gruetter, 2003, Brown and Ransom, 2007, Magistretti and Allaman, 2007). Ainsi, il apparaît que lors de périodes d'hypoglycémie ou d'activation importante, le glycogène astrocytaire est dégradé en lactate *a posteriori* transféré aux neurones adjacents où il est utilisé comme substrat énergétique. Ainsi, le glycogène astrocytaire joue un rôle de protection contre le déficit énergétique associé à l'hypoglycémie et permet de maintenir les fonctions neuronales pendant des périodes d'activation intenses.

**Acides Gras** La synthèse des acides gras (*lipogenèse*), réalisée au niveau d'un complexe multi-enzymatique appelé *acide gras synthase* (Maier et al., 2006) localisé dans le cytoplasme, consiste à synthétiser un acide gras par condensation d'unités acétyl fournies par l'acétyl-CoA, l'énergie nécessaire à cette condensation étant fournie par des molécules d'ATP. Ainsi produits et stockés dans le cytoplasme des neurones, les acides gras sont utilisés comme réserve d'équivalents glucose. Lors de périodes de déficit énergétique (hypoglycémie, activation importante), ces molécules sont transportées dans la matrice mitochondriale par un mécanisme de transport facilité catalysé par l'enzyme Carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1), puis sont dégradées en acétyl-CoA par  $\beta$ -oxydation (Ronnett et al., 2006). Contrairement au glycogène, la concentration en acides gras varie considérablement d'un individu à l'autre. En effet, la fonction des enzymes de la voie des acides gras change selon la demande énergétique, oscillant entre états anaboliques de stockage d'énergie et états cataboliques de consommation de l'énergie stockée.

### **Tampon énergétique : le système CK/PCr**

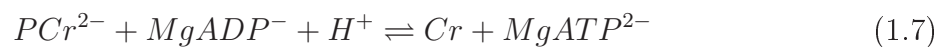
Comme énoncé en introduction de cette partie, un des principes physiologiques fondamentaux d'un biosystème est le maintien strict des concentrations en métabolites énergétiques, principalement en ATP et en oxygène intracellulaire (Hochachka, 1999, Hochachka, 2000). Dans les cellules à activité importante et fluctuante, telles que les cellules musculaires ou nerveuses par exemple, alors que la consommation d'ATP peut varier de plusieurs ordres de grandeur en moins d'une seconde, les concentrations en ATP restent remarquablement stables et les ratios ATP/ADP et ATP/AMP sont maintenus aussi élevés que possible afin de répondre aux besoins énergétiques (Wallimann and Hemmer, 1994, Hemmer and Wallimann, 1993). L'homéostasie de l'ATP et le maintien de ratios ATP/ADP et ATP/AMP

élevés sont facilités par l'action de deux systèmes enzymatiques :

- le système créatine kinase (CK) qui régénère de l'ATP à partir de la phosphocréatine (Wallimann et al., 1992, Wallimann et al., 1998).
- le système adénylate kinase (AK), qui convertit 2 ADP en un ATP et un AMP (Zeleznikar et al., 1995).

Ces deux systèmes enzymatiques fonctionnant en parallèle (Wallimann et al., 1992, Dzeja et al., 1998) permettent de tamponner temporellement mais également spatialement les concentrations subcellulaires en ATP (Bessman and Geiger, 1981, Saks et al., 1994, Ventura-Clapier et al., 1998, Schlattner and Wallimann, 2000, Schlattner et al., 2001, Schlattner et al., 2006, Schlattner and Wallimann, 2000). Le système prépondérant dans le cerveau étant le système CK (Hemmer and Wallimann, 1993), nous allons uniquement détailler ce système.

**Description du système CK/PCr** Le système CK ou système CK/PCr ou encore circuit PCr, peut être décrit de façon globale par la réaction d'échange d'un groupement phosphate entre la phosphocréatine (PCr) et l'adénosine triphosphate (ATP) :



Cette réaction est catalysée par les enzymes de type créatine kinase (CK). Bien que ce type d'enzyme soit présent dans quasiment tous les tissus, le système CK/PCr n'a été décrit précisément que dans les types cellulaires spécialisés ayant un métabolisme énergétique important et surtout fluctuant (neurones, fibres musculaires en particulier) (Wallimann and Hemmer, 1994, Hemmer and Wallimann, 1993). Dans ces types cellulaires, la CK existe sous plusieurs isoformes, appelées isoenzymes, ayant chacune une spécificité spatiale et fonctionnelle associée (Wallimann et al., 1992, Wallimann et al., 1998). Quatre principaux isoenzymes, chacun associé à un compartiment cellulaire peuvent ainsi être distingués (**Figure 1.7**) :

- l'isoenzyme cytosolique soluble CKc dont le rôle principal est d'équilibrer de façon réversible les ratios PCr/Cr et ATP/ADP
- l'isoenzyme cytosolique CKg fonctionnellement couplé à la glycolyse, et catalysant uniquement la réaction de production de la PCr.

- l'isoenzyme cytosolique CKa spécifiquement associé à des structures subcellulaires localisées sur les sites à forte consommation d'ATP (vésicules de neurotransmission par exemple). CKa catalyse uniquement les réactions de dégradation de la PCr.
- l'isoenzyme mitochondrial Mi-CK fonctionnellement couplé à la phosphorylation oxydative et catalysant uniquement les réactions de production de la PCr.

Ayant détaillé ces principales isoenzymes et leurs fonctions, il est possible de résumer le circuit PCr comme suit (**Figure 1.7**) : les molécules d'ATP produites par phosphorylation oxydative dans la matrice mitochondriale sont transportées à travers la membrane interne mitochondriale par des translocateurs ATP/ADP transmembranaires (Translocase des Nucléotides Adényliques TNA), puis sont transphosphorylées par Mi-CK pour former des molécules de PCr. Ces molécules de PCr, sous forme anionique soluble, quittent ensuite l'espace intermembranaire par des porines localisées dans la membrane externe mitochondriale pour rejoindre le cytosol. Il est à noter qu'il existe une seconde voie de production de PCr cytosolique, catalysée par CKg, qui utilise l'ATP produit par la glycolyse. Dans le cytosol, les molécules de PCr peuvent être dégradées directement par CKc afin d'augmenter le ratio ATP/ADP cytosolique ou diffuser suivant leur gradient de concentration jusqu'aux sites à forts besoins énergétiques afin de fournir l'ATP nécessaire aux enzymes ATPasiques. En fin de circuit, les molécules de Cr résultant de la dégradation des molécules de PCr entrent dans l'espace intermembranaire mitochondrial afin d'être à nouveau transphosphorylées par Mi-CK. Il est à noter que tous les mouvements cytosoliques décrits ici sont des mouvements de diffusion simple qui sont régis par les gradients de concentration des molécules de Cr et PCr. Ainsi, la PCr, consommée au niveau des ATPases, diffusera vers ces sites, alors que la Cr, transphosphorylée dans les mitochondries, diffusera vers ces organites.

**Rôles du système CK/PCr** Les fonctions attribuées à ce système sont multiples. Une fonction largement admise est celle dite de *tampon temporel*. En effet, en cas de forte activité, le système CK/PCr permet de maintenir constante dans le temps la concentration d'ATP intracellulaire ainsi que les ratios ATP/ADP et ATP/AMP. La seconde fonction de ce système, plus controversée, est celle de *tampon spatial*. En effet, le couple PCr/Cr catalysé par les CK peut être considéré comme une " navette " permettant le transfert d'énergie des lieux de synthèse (mitochondries pour la phosphorylation oxydative, cyto-

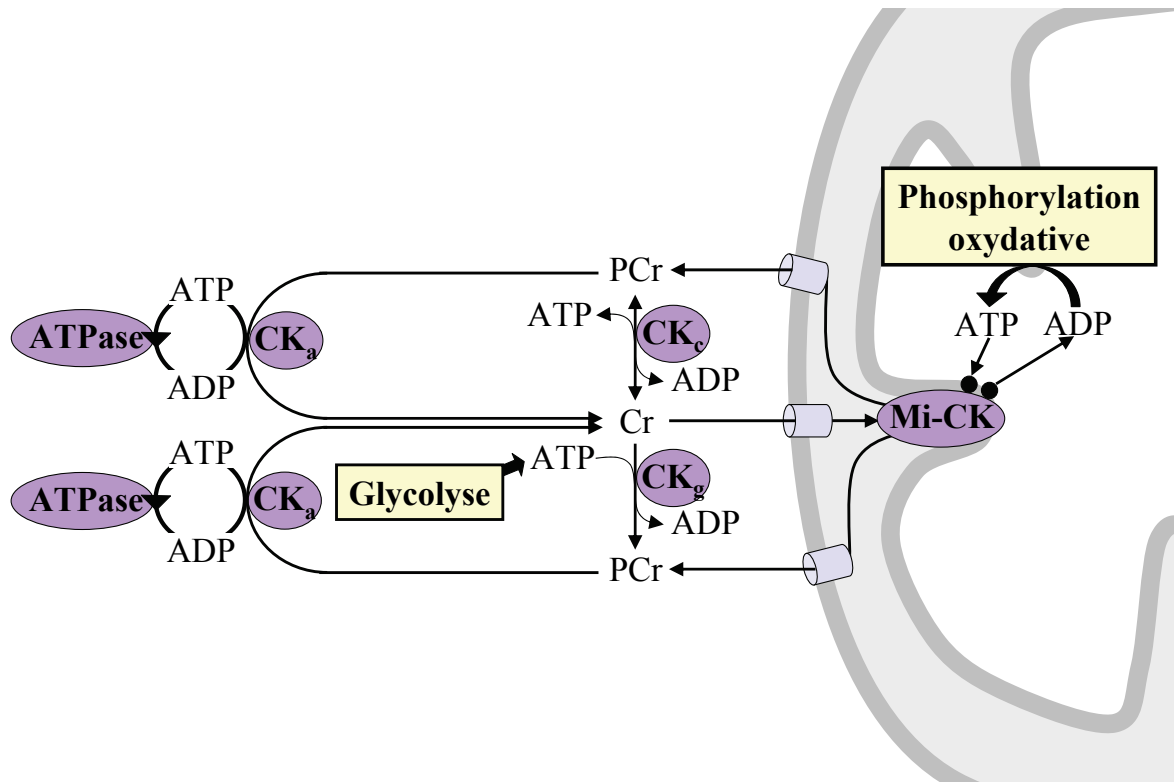


FIG. 1.7 – **Système CK/PCr** Les molécules d'ATP produites par phosphorylation oxydative dans la matrice mitochondriale sont transportées à travers la membrane interne mitochondriale puis sont transphosphorylées par Mi-CK pour former des molécules de PCr. Ces molécules, sous forme anionique soluble, quittent ensuite l'espace intermembranaire pour rejoindre le cytosol. Il est à noter qu'il existe une seconde voie de production de PCr cytosolique, catalysée par CK<sub>g</sub>, qui utilise l'ATP produit par la glycolyse. Dans le cytosol, les molécules de PCr peuvent être dégradées directement par CK<sub>c</sub> afin d'augmenter le ratio ATP/ADP cytosolique ou diffuser suivant leur gradient de concentration jusqu'aux sites à forts besoins énergétique afin de fournir l'ATP nécessaire aux enzymes ATPasiques. En fin de circuit, les molécules de Cr résultant de la dégradation des molécules de PCr entrent dans l'espace intermembranaire mitochondrial afin d'être à nouveau transphosphorylées par Mi-CK.

sol pour la glycolyse) vers les nombreux sites de consommation énergétique (vésicules de neurotransmission par exemple). Il existe plusieurs avantages à l'utilisation du couple PCr/Cr pour le transport d'énergie par rapport à l'utilisation du couple ATP/ADP. En premier lieu, les molécules de PCr, tout comme les molécules de Cr, sont plus petites et portent moins de charges locales que les molécules d'ATP et d'ADP. Ainsi, leur diffusion cytosolique est plus rapide, et leur transport transmembranaire moins coûteux en

énergie. De plus, de nombreuses enzymes, en particulier les ATPases, étant sensibles aux concentrations en ADP et ATP, un transport direct d'ATP des sites de production vers les sites de consommation perturberait l'homeostasie et l'activation des nombreuses enzymes ATP-sensibles. Enfin, le système CK/PCr joue également un rôle de *tampon pHmétrique*, prévenant des variations de concentrations en protons lors de fortes demandes énergétiques.

## 1.2 Neurodégénérescence : cas de la maladie de Huntington

### 1.2.1 Présentation générale de la MH

La maladie de Huntington (MH), ou Chorée de Huntington, est une maladie neurodégénérative héréditaire à transmission autosomique dominante découverte en 1872 par Georges Huntington. Sa prévalence, hautement variable selon les populations, est estimée entre 3 et 7 pour 100 000 habitants en Europe Occidentale. Cette pathologie à ce jour incurable apparaît généralement vers l'âge de 40-50 ans et évolue en une quinzaine d'année jusqu'au décès. Au niveau anatomique, elle se traduit par une neurodégénérescence préférentielle du striatum (noyau caudé et putamen) (Harper, 1991) suivie par une atrophie corticale globale (Aylward et al., 1994). Au niveau génétique, la mutation principale se situe au niveau du gène IT15 situé sur le locus p16.3 du chromosome 4 et consiste en une répétition du triplet CAG codant pour la glutamine (extension polyglutamique)(HDCRG, 1993). Plus précisément, cette mutation se situe dans un gène codant pour une protéine de 348 KDa appelé Huntingtine (Htt). Ainsi, dans la MH, l'Htt est mutée (mHtt) et contient une expansion polyglutaminique de longueur variable. Le nombre de répétitions du triplet CAG semble être hautement corrélé à l'âge d'apparition de la maladie (Penney et al., 1997). Cependant, les facteurs génétiques ne permettent pas de prédire de manière fiable l'âge d'apparition et il est probable que des facteurs environnementaux interviennent (Wexler et al., 2004).

### 1.2.2 Altérations énergétiques dans la MH

**Hypothèse mitochondriale** Les mécanismes de mort neuronale associés à la MH sont en grande partie inconnus et il est possible que les causes de ces mécanismes soient multifactorielles. Cependant, une des hypothèses les plus probables est que les dysfonctions neuronales et les mécanismes de dégénérescence seraient dûs à des anomalies du métabolisme énergétique mitochondrial (Beal, 1992, Beal, 2005). En effet, il est depuis longtemps connu que les mutations mitochondriales (altérations de l'ADN mitochondrial ou perte de fonction de la SDH (Bourgeron et al., 1995)) peuvent être à l'origine d'une dégénérescence

striatale. A partir de ces observations, Beal *et al.* ont émis l'hypothèse que, puisque le striatum était particulièrement sensible aux troubles énergétiques, il était très probable que des altérations du métabolisme énergétique jouent un rôle prépondérant dans la MH (Beal, 1992).

Cette hypothèse a été depuis renforcée par un grand nombre d'observations expérimentales (pour revue voir Brouillet *et al.*, 1999) :

- Des dysfonctions métaboliques du striatum ont pu être détectées *in vivo* par tomographie par émission de positons (TEP). En 1982, une étude pionnière utilisant comme radiotracteur le  $^{18}\text{F}$ -FDG a permis de mettre en évidence une diminution significative de la consommation striatale de glucose (CMRglc) chez des sujets présymptomatiques porteurs de la MH ne présentant pas d'atrophie striatale évidente (Kuhl *et al.*, 1982). Selon une étude plus récente utilisant des radiotraceurs marqués au  $^{18}\text{F}$  et au  $^{15}\text{O}$ , la diminution de CMRglc serait associée à une stabilité de la consommation striatale en oxygène (CMRO<sub>2</sub>) (augmentation significative du rapport CMRO<sub>2</sub>/CMRglc), ce qui plaiderait en faveur d'une atteinte astrocytaire précoce dans la MH (Powers *et al.*, 2007).
- Des études de spectroscopie RMN du  $^1\text{H}$  ont permis de dériver les concentrations en lactate cérébral chez les patients MH. Une augmentation substantielle de la concentration en lactate a ainsi été mise en évidence dans le striatum mais également dans le cortex occipital, une région généralement peu touchée par la neurodégénérescence. De plus, l'augmentation de lactate semble être corrélée avec le nombre de triplets CAG (Jenkins *et al.*, 1993, Jenkins *et al.*, 1998).
- Au niveau des muscles squelettiques, Lodi *et al.* ont montré que la production d'ATP était diminué de approx. 35% chez les patients MH présymptomatiques et de approx. 44% chez les patients MH symptomatiques, mettant ainsi en évidence une altération importante du métabolisme oxydatif mitochondrial dans des tissus périphériques (Lodi *et al.*, 2000).
- Un grand nombre d'études *post mortem* ont également renforcé l'hypothèse d'un déficit énergétique associé à la MH. Une diminution de l'ordre de 39 à 59% de l'oxydation du succinate a ainsi été mise en évidence dans le striatum de patients MH, suggérant une anomalie du complexe II (SDH) de la chaîne respiratoire (Brennan *et al.*, 1985, Mann *et al.*, 1990). Une autre étude biochimique a montré une diminution de l'acti-



tivité des complexes II et III dans le noyau caudé de patients MH (Gu et al., 1996). De même, la respiration mitochondriale et la production d'ATP apparaissent significativement altérées dans des cellules striatales d'embryons de souris Htt-knock-in (Milakovic and Johnson, 2005). Il est intéressant de noter qu'aucune de ces études ne rapportent de modifications de l'activité du complexe I (NADH déshydrogénase). Le déficit mitochondrial associé à la maladie de Huntington impliquerait donc principalement les complexes II et III, et dans une moindre mesure le complexe IV.

- Enfin, une étude récente a montré qu'il existe une baisse des niveaux d'expression des sous-unités du complexe II chez les patients HD et dans le modèle cellulaire. Une surexpression des sous-unités du complexe II restaure complètement l'activité du complexe II, bloquant les dysfonctionnements mitochondriaux et la mort cellulaire (Benchoua et al., 2006).

Il existe de nombreux mécanismes par lesquels la mutation génétique conduisant à la formation de mHtt pourrait entraîner une dysfonction mitochondriale. En premier lieu, la mHtt pourrait interagir directement avec les mitochondries. Ainsi, des études du métabolisme des lymphoblastes de patients MH ainsi que des neurones de souris transgéniques YAC ont mis en évidence une diminution de la capacité des mitochondries à maintenir l'homéostasie calcique (Panov et al., 2002, Monoï et al., 2000). En effet, des fragments polyglutaminiques s'insérant dans les membranes mitochondriales formeraient des canaux ioniques perméables aux  $H^+$  et diminueraient ainsi le potentiel de membrane mitochondrial (Sawa et al., 1999). De plus, la longueur de l'expansion polyglutaminique serait corrélée à une fragilité du maintien du potentiel de membrane en réponse à un stress oxydatif. Une autre étude a également conforté cette hypothèse (Choo et al., 2004). Dans cette dernière, le fractionnement des mitochondries provenant d'un modèle de souris MH a montré que la mHtt se liait avec la membrane mitochondriale externe. Ces mêmes mitochondries étaient de plus sensibles à la perméabilisation mitochondriale et à la libération de cytochrome C induite par le  $Ca^{2+}$ , effet qui a pu être reproduit en incubant des mitochondries normales avec de la mHtt.

Un autre mécanisme par lequel mHtt pourrait affecter la fonction mitochondriale est une altération de la transcription (Luthi-Carter et al., 2000). En effet, la Htt interagit avec un grand nombre de facteurs de transcription tels que p53 et SP1 (pour revue voir Sugars and Rubinsztein, 2003). En particulier, p53 est un suppresseur de tumeur connu pour

réguler des gènes impliqués dans les fonctions mitochondriales et le stress oxydatif, et pouvant activer la voie apoptotique mitochondriale (Chipuk et al., 2004). Une récente étude a montré que Htt, se liant à p53, augmente son niveau d'activité transcriptionnelle, conduisant finalement à une dépolarisation de la membrane mitochondriale (Bae et al., 2005). Enfin, bien que leurs rôles n'aient pas encore été mis en évidence dans la MH chez l'homme, deux protéines liées au fonctionnement mitochondrial sont associées à des phénotypes MH-like dans des modèles de souris transgéniques. En premier lieu, la protéine PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator activator receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ), régulatrice de la biogenèse mitochondriale, pourrait jouer un rôle prépondérant dans la pathologie (Lin et al., 2004). Il a en effet été montré récemment que la mHtt réduit l'expression de PGC-1 $\alpha$  et que, lorsque l'expression de PGC-1 $\alpha$  est bloquée dans un modèle de souris HD Knock Out (KO) pour la protéine, il existe une augmentation de la vitesse d'apparition des symptômes et de la neurodégénérescence (Cui et al., 2006). En second lieu, la protéase sérine HTRA2, localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial, pourrait également jouer un rôle dans la pathologie. En effet, une mutation de HTRA2 est à l'origine d'un phénotype Mnd2 (dégénérescence des motoneurones de type 2), phénotype qui présente de nombreuses similitudes avec le phénotype MH, en particulier présence de mouvements involontaires, postures anormales et dégénérescence massive des neurones striataux (Rathke-Hartlieb et al., 2002).

**Modèles 3NP** Toutes ces constatations expérimentales suggèrent que des anomalies mitochondriales existent dans la maladie de Huntington. Cependant, le rôle que jouent ces anomalies dans les mécanismes de neurodégénérescence striatale reste inconnu à ce jour. Selon l'hypothèse la plus probable, le déficit mitochondrial serait le facteur déclenchant la cascade de mort neuronale. Cette hypothèse a notamment été renforcée par de nombreuses études sur des modèles animaux, rongeurs et primates non humains, de la maladie de Huntington. En effet, dans les modèles utilisant l'acide 3-nitropropionique (3NP), toxine mitochondriale inhibant spécifiquement le complexe II (succinate déshydrogénase SDH) de la chaîne respiratoire, le phénotype clinique et pathologique induit ressemble fortement au phénotype de la MH (Brouillet et al., 1995). En effet, une administration chronique de 3NP provoque chez les primates non humains une dégénération progressive et sélective du striatum (Brouillet et al., 1999), des déficits cognitifs de type syndrome frontostriatal

(Palfi et al., 1996) et l'apparition de mouvements dystoniques et choréiformes spontanés (Brouillet et al., 1995). Dans les modèles rongeurs, une intoxication chronique au 3NP entraîne également une dégénérescence préférentielle des neurones épineux GABAergiques de taille moyenne (Guyot et al., 1997), reproduisant une observation faite dans le striatum de patients MH (Ferrante et al., 1987). Notons que, dans ces modèles animaux, une dégénérescence striatale manifeste apparaît pour une dose d'intoxication quotidienne au 3NP correspondant à une inhibition partielle de la SDH de l'ordre de  $\approx 50\%$  au minimum (Brouillet et al., 1998). Des anomalies de concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique sont également engendrées par l'inhibition de la SDH (Bizat et al., 2003b, Bizat et al., 2003a, Gafni and Ellerby, 2002).

**Cascade excitotoxique** Au niveau biochimique, l'altération de l'activité de la SDH peut ainsi considérablement aggraver la toxicité d'autres molécules jouant un rôle dans la pathogénèse de la maladie de Huntington. En particulier, l'inhibition de ce complexe protéique semble jouer un rôle majeur dans les mécanismes de mort neuronale impliquant les cascades excitotoxiques associées aux récepteurs NMDA des neurones glutamatergiques (Brouillet et al., 1999). Plus précisément, l'inhibition de la chaîne respiratoire entraînerait une diminution du stock d'ATP disponible et donc une dépolarisation partielle permanente du potentiel de membrane, les pompes ATPasiques  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  étant incapables de maintenir ce potentiel à une valeur physiologique. En conséquence, lors de la transmission synaptique, de faibles concentrations de glutamate extracellulaire suffiraient à induire une entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le compartiment intracellulaire. Or le  $\text{Ca}^{2+}$  intervenant dans de nombreuses voies de maintien de l'intégrité cellulaire, une augmentation massive de sa concentration serait à l'origine d'un dérèglement de l'activité de nombreuses enzymes. Ainsi, des modifications lentes de nombreux processus ATP-dépendants tels que la transmission synaptique, le maintien des potentiels de membrane, la signalisation cellulaire ou la synthèse de polypeptides seraient à l'origine d'une cascade dite excitotoxique (Tabrizi et al., 1999) conduisant à terme à la mort cellulaire par nécrose (Brouillet et al., 1999, Beal, 2000). Cependant, cette hypothèse mécanistique est de plus en plus controversée. En effet, une étude récente a montré que, même si le 3NP favorise effectivement l'effet excitotoxique associé aux récepteurs NMDA des neurones glutamatergiques, cette augmentation de sensibilité ne serait pas due à une augmentation de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$

---

dans le compartiment intracellulaire ni à une ouverture des récepteurs NMDA. L'hypothèse alternative proposée est que l'atteinte mitochondriale perturberait la capacité de la mitochondrie à gérer les élévations cytoplasmiques de  $\text{Ca}^{2+}$  qui, elles, activeraient la cascade excitotoxique (Jacquard et al., 2006).

## 1.3 Conclusion

Dans le cerveau, le métabolisme énergétique représente un ensemble complexe de réactions endergoniques, exergoniques et de réactions d'équilibre, plus ou moins couplées, qui, plus encore que dans d'autres organes, présentent une grande variabilité dans le temps et dans l'espace. Ainsi, même en conditions physiologiques normales, le cerveau apparaît comme un organe complexe. En conditions pathologiques, les équilibres métaboliques sont perturbés, rendant la compréhension des mécanismes biochimiques sous-jacents d'autant plus complexe. A ce jour, les mécanismes biochimiques responsables de la neurodégénérescence restent encore largement inconnus, en particulier dans la MH. Selon une hypothèse majeure, la mort cellulaire serait une conséquence d'anomalies du métabolisme énergétique, plus précisément d'anomalies des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cependant, cette hypothèse n'a à ce jour été vérifiée qu'indirectement chez l'homme et dans des modèles animaux de la MH. Ainsi, la possibilité d'évaluer directement *in vivo* le métabolisme énergétique cérébral présente un intérêt majeur. En effet, la mesure des flux métaboliques associés au métabolisme énergétique cellulaire (cycle de Krebs, glycolyse) mais surtout au métabolisme mitochondrial (phosphorylation oxydative) pourrait permettre de mieux comprendre le couplage entre déficit énergétique et neurodégénérescence et ainsi d'élucider les relations de causalité sous-jacentes.

## Chapitre 2

# Méthodes de neuroimagerie du métabolisme énergétique *in vivo*

La neuroimagerie a connu d'importants développements méthodologiques ces 30 dernières années, avec de nouvelles méthodes d'imagerie anatomique (scanner, IRM...) ou fonctionnelle (TEP, MEG...). Certaines méthodes, spécifiquement dédiées à l'imagerie du métabolisme, ont été développées avec pour buts principaux : *(i)* la mise en évidence et la validation de nouveaux biomarqueurs pour le diagnostic précoce et l'évaluation des stratégies thérapeutiques et *(ii)* l'élucidation des mécanismes biochimiques sous-jacents à la pathologie cérébrale. Dans cette partie, nous nous proposons de passer en revue les méthodes de neuroimagerie susceptibles de renseigner spécifiquement sur le métabolisme énergétique cérébral. Nous écarterons donc volontairement les techniques de neuroimagerie dites fonctionnelles qui ne permettent d'accéder qu'à des paramètres peu spécifiques du métabolisme (BOLD, imagerie de perfusion, EEG, MEG...). Plus particulièrement, les grandes techniques de neuroimagerie métabolique sur lesquelles nous nous focaliserons sont la tomographie par émission de positons (TEP) et la spectroscopie par résonance magnétique (SRM). Nous décrirons brièvement les principes et les champs d'applications principaux de ces deux méthodes en nous focalisant uniquement sur leurs applications respectives pour la neuroimagerie métabolique. Enfin, nous discuterons leurs limitations et leurs intérêts respectifs.

## 2.1 La tomographie par émission de positons

### 2.1.1 Description générale

Développée à la fin des années 1970, la tomographie par émission de positons (TEP) est une méthode d'imagerie médicale nucléaire permettant la mesure quantitative en 3 dimensions de divers processus métaboliques *in vivo*. Un examen TEP débute par l'administration (injection i.v. ou inhalation) d'une molécule marquée par un isotope radioactif émetteur  $\beta^+$  ( $^{13}\text{F}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{15}\text{O}$  principalement) dont on connaît le comportement et les propriétés biologiques. Une fois le radiotracer injecté dans l'organisme, chaque positon  $e^+$  émis par l'isotope se dématérialise avec un électron  $e^-$  du tissu après un parcours très court dans la matière (de l'ordre du millimètre)(**Equation 2.1**).



Ce phénomène, appelé *annihilation électron/positon*, conduit à l'émission simultanée de deux photons  $\gamma$  d'énergie 511 keV émis à  $180^\circ$  l'un de l'autre (photons d'annihilation). Ces photons énergétiques et émis «en coïncidence» sont détectés par la couronne de cristaux scintillateurs de la caméra TEP, ce qui permet de localiser le lieu de l'émission et donc la concentration du radiotracer en chaque point de l'organe étudié. Après reconstruction, l'accumulation du radiotracer est représentée sous forme d'images TEP dont l'étude cinétique permet de déduire des valeurs quantitatives de paramètres métaboliques d'intérêt (**Figure 2.1**).

Ainsi, la TEP est une méthode d'imagerie fonctionnelle permettant de déceler et de quantifier des altérations métaboliques. L'utilisation de radiotracer confère à cette technique une grande sensibilité de détection associée à une résolution spatiale limitée (de l'ordre de 5mm). La TEP a été longtemps utilisée en recherche cognitive pour la caractérisation des fonctions cérébrales en conditions non pathologiques (vision, langage, mémoire, calcul...). En recherche clinique, cette technique est utilisée pour l'étude des maladies neurodégénératives. De récents travaux ont par exemple tenté de montrer l'intérêt de la TEP pour un diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer (Coleman, 2005 pour revue). Il a en effet été observé une réduction du métabolisme au niveau du gyrus cingulaire pos-

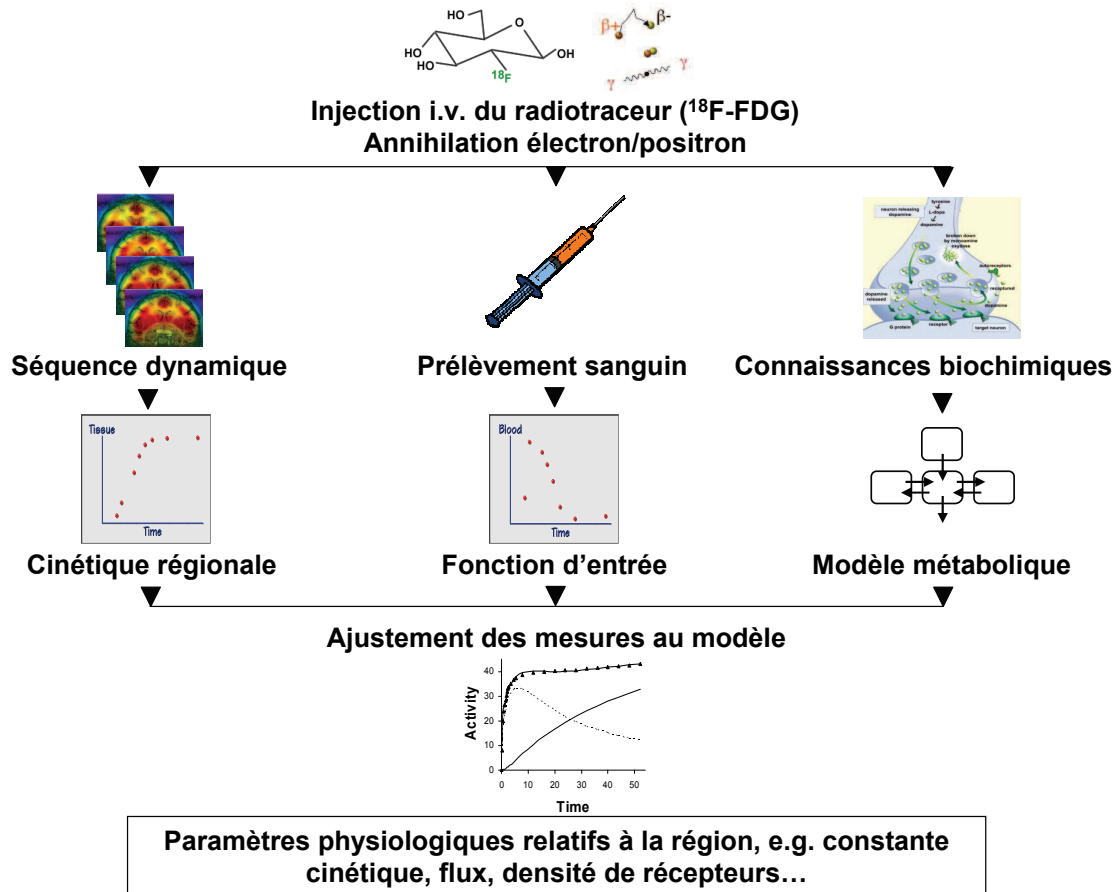


FIG. 2.1 – **Principe général de l'imagerie TEP** Après injection d'un radiotracteur émetteur  $\beta^+$ , les évènements d'annihilation électron/positron sont détectés par la caméra TEP et permettent d'obtenir, après reconstruction, une séquence dynamique d'images. Les cinétiques d'activité des régions d'intérêt peuvent alors être évaluées. En cours d'acquisition, des prélèvements sanguins sont effectués afin de déterminer la fonction d'entrée artérielle. Enfin, étant données les connaissances biochimiques du tissu d'intérêt, un modèle métabolique est choisi. Connaissant la fonction d'entrée, l'ajustement des cinétiques régionales au modèle métabolique permet de déterminer les paramètres métaboliques régionaux d'intérêt. D'après [www.guillemet.org](http://www.guillemet.org).



térieur que l'on ne retrouve pas dans le vieillissement normal. Enfin, en routine clinique, l'imagerie TEP apparaît comme un outil diagnostique complémentaire de l'imagerie anatomique (IRM ou Scanner X) en particulier dans la caractérisation des lésions associées aux maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson avec la  $^{18}\text{F}$ -DOPA) ou au cancer avec le  $^{18}\text{F}$ -FDG).

### 2.1.2 Mesures métaboliques cérébrales accessibles

*Comme énoncé en introduction de ce chapitre, nous décrivons uniquement ici les mesures spécifiques du métabolisme énergétique cérébral accessibles en TEP. Nous occultons volontairement les mesures physiologiques non spécifiques du métabolisme (mesure de perfusion cérébrale, imagerie des récepteurs...).*

#### Mesure de la consommation de glucose

**Radiotracteur et principe de mesure** Le  $^{18}\text{F}$ -FDG (2- $^{18}\text{F}$ - fluoro-2-désoxy-D-glucose) est une molécule analogue du glucose dans laquelle le groupement hydroxyl (OH) situé en position 2 est remplacé par un atome de fluor radioactif  $^{18}\text{F}$  (**Figure 2.2 (a)**). Ce radiotracteur présente l'avantage d'avoir une demi-vie relativement longue ( $T_{1/2} = 109\text{minutes}$ ) qui rend son utilisation possible dans les services de médecine nucléaire ne possédant pas un cyclotron sur site. De plus, l'utilisation du  $^{18}\text{F}$ -FDG permet d'accéder à une mesure métabolique fondamentale, à savoir la consommation régionale de glucose (CMRglc)(Phelps et al., 1979). Cette molécule étant le principal substrat énergétique cérébral, l'imagerie TEP  $^{18}\text{F}$ -FDG permet de localiser et de quantifier les anomalies de consommation énergétique en conditions pathologiques, les images obtenues représentant des cartographies de l'apport en glucose dans les différentes zones du cerveau.

**Modèle cinétique** D'une façon générale, au cours d'un examen TEP FDG, le  $^{18}\text{F}$ -FDG est injecté en bolus i.v. puis s'accumule dans les tissus sous sa forme phosphorylée. Les activités tissulaire (images TEP) et plasmatique (fonction d'entrée artérielle) de cette molécule sont mesurées en fonction du temps. La consommation régionale de glucose est alors déterminée à partir d'un modèle cinétique adapté.

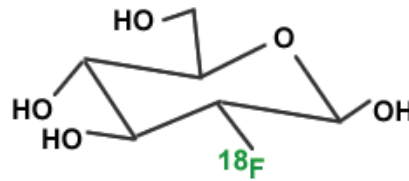


FIG. 2.2 – **Molécule de 2-<sup>18</sup>F- fluoro-2-désoxy-D-glucose** Cette molécule est un analogue de la molécule de D-glucose dans lequel le groupement OH situé en position 2 est remplacé par un atome de <sup>18</sup>F, émetteur  $\beta+$

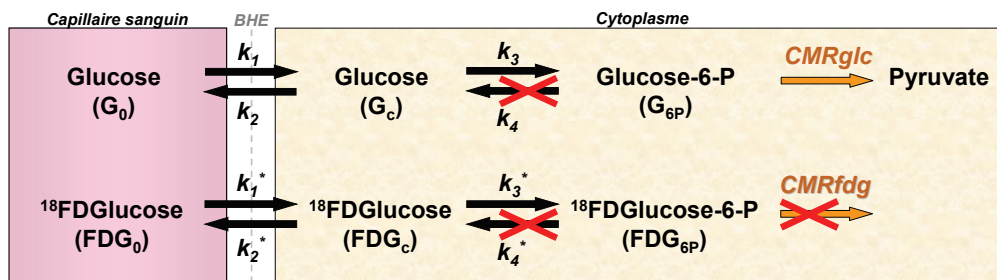


FIG. 2.3 – **Modèle cinétique à 3 compartiments** Au cours de l'examen TEP, le <sup>18</sup>F-FDG s'accumule sous sa forme phosphorylée <sup>18</sup>F-FDG-6-P dans le cytoplasme des cellules. Contrairement à la molécule de glucose, il n'est pas métabolisé en aval.

Le modèle le plus utilisé est un modèle cinétique à 3 compartiments, initialement développé par Sokoloff *et al.* (Sokoloff et al., 1977) pour l'étude autoradiographique et adapté à l'étude des cinétiques TEP FDG chez l'homme par Phelps *et al.* (Phelps et al., 1979). Les trois entrées mesurables de ce modèle sont :

- la courbe d'activité-temps du <sup>18</sup>F-FDG tissulaire, mesurée à partir de la série dynamique d'images TEP,
- la courbe d'activité-temps du <sup>18</sup>F-FDG plasmatique, également appelée fonction d'entrée artérielle, mesurée à partir d'échantillons de plasma artériel collectés au cours de l'examen,
- la glycémie plasmatique  $G_0$  mesurée également à partir des échantillons de plasma.

Notons qu'afin d'appliquer ce modèle, il est également nécessaire de connaître la fraction vasculaire du VOI cérébral.

De l'ensemble de ces paramètres sont déduites les constantes cinétiques  $k_1^*$ ,  $k_2^*$ ,  $k_3^*$  et  $k_4^*$  d'échange entre les trois pools de  $^{18}\text{F}$ -FDG plasmatique,  $^{18}\text{F}$ -FDG cytoplasmique et  $^{18}\text{F}$ -FDG-6-P cytoplasmique (**Figure 2.3**). En pratique, l'hypothèse, pertinente au point de vue métabolique, de phosphorylation irréversible ( $k_4^* = 0$ ) est utilisée afin de minimiser les biais sur l'estimation de  $CMR_{glc}$  (biais <5%) (Schmidt et al., 1991). La consommation régionale de FDG  $CMR_{fdg}$  est alors estimée par :

$$CMR_{fdg} = G_0 \cdot \frac{k_1^* \cdot k_3^*}{k_2^* + k_3^*} \quad (2.2)$$

Afin d'évaluer la consommation régionale de glucose  $CMR_{glc}$ , il est alors nécessaire de prendre en considération les différences entre les propriétés biologiques de ces deux molécules. En effet, celles-ci diffèrent à plusieurs niveaux : transport à travers la BHE, affinité aux transporteurs GLUT, phosphorylation cytoplasmique... Afin de prendre en compte ces différences et d'estimer  $CMR_{glc}$ , une constante empirique, la *Lumped Constant* ( $LC$ ), est utilisée :

$$CMR_{glc} = \frac{CMR_{fdg}}{LC} \quad (2.3)$$

La LC a été déterminée empiriquement égale à 0.42 chez l'homme indifféremment dans la matière grise et blanche (Noda et al., 2002).

## Mesure de la consommation d'oxygène

Il est également possible de mesurer en TEP la consommation régionale d'oxygène  $CMRO_2$  ainsi que la fraction d'extraction de l'oxygène (*Oxygen Extraction Fraction* OEF) (Mintun et al., 1984). Cependant, cette technique requiert la mesure du débit sanguin cérébral régional (DSCr) par injection i.v. d'eau marquée  $\text{H}_2^{15}\text{O}$ , la mesure du volume sanguin cérébral (*Cerebral Blood Volume* CBV) par inhalation de monoxyde de carbone marqué  $\text{C}^{15}\text{O}$  et finalement l'inhalation de dioxygène marqué  $^{15}\text{O}_2$  pour la détermination finale de  $CMRO_2$  (Raichle et al., 1983, Martin et al., 1987).

## Mesure de la synthèse protéique

Certains acides aminés peuvent être utilisés en tant que radiotraceurs pour mesurer le niveau de synthèse protéique (Vaalburg et al., 1992), parmi lesquels la tyrosine (Bolster et al., 1986), la leucine, la méthionine (Fujiwara et al., 1989) ou même la phénylalanine (Ishiwata et al., 1991). La mesure du niveau de synthèse protéique présente un intérêt majeur pour l'étude du cancer en particulier. En effet, il a été montré que la synthèse protéique était plus élevée dans les tumeurs que dans les tissus sains (Ishiwata et al., 1988) et que son augmentation pouvait donc être un critère diagnostique de malignité. Par rapport au  $^{18}\text{F}$ -FDG, l'utilisation d'acides aminés est cependant moins aisée et *a priori* réservée à certains centres équipés de cyclotron sur site puisqu'ils doivent être marqués au carbone 11 ( $T_{1/2} = 20.4\text{minutes}$ ).

### 2.1.3 Limitations

**Dose injectée** La limitation la plus évidente à l'utilisation de la TEP est la nécessité d'injecter un radiotraceur dans l'organisme. Outre le fait que l'injection i.v. soit en elle-même un acte invasif, le traceur injecté est par définition radioactif, ce qui limite l'utilisation répétée de cette méthode d'imagerie. Il existe en effet une législation stricte qui définit les doses maximales annuelles, mensuelles et par examen que peut recevoir un patient (voir site de la Société Française de Radioprotection <http://www.sfrp.asso.fr/>).

**Décroissance radioactive** La plupart des isotopes émetteurs utilisés en TEP ( $^{15}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$  et  $^{11}\text{C}$ ) ont une demi-vie très courte ( $T_{1/2} = 2.04\text{minutes}$ ,  $T_{1/2} = 9.97\text{minutes}$ ,  $T_{1/2} = 20.4\text{minutes}$ ). Ils ne peuvent donc être utilisés que dans des services de médecine nucléaire possédant un cyclotron sur site. En revanche, la demi-vie du  $^{18}\text{F}$  étant relativement longue, il est possible d'effectuer la synthèse radiochimique hors site (liaison chimique avec un ligand) puis de transporter le radiotraceur depuis le cyclotron de production jusqu'au service de médecine nucléaire.

**Stabilité** La conception d'un radiotraceur utilisable en TEP est soumise à de nombreuses contraintes. En effet, il doit entre autres satisfaire aux conditions suivantes :

- Stabilité de la substance dans le sang
- Délivrance au tissu cible (passage du flux sanguin au tissu)
- Absence de modification du phénomène physiologique à observer
- Fixation et/ou accumulation stable et spécifique

**Système TEP et images** Un tomographe TEP est un équipement coûteux ( $\approx 1.5\text{M €}$ ) dont l'installation est conditionnée par la proximité de sites de production de radioisotopes (cyclotron). Ainsi, peu de systèmes sont actuellement disponibles en France (environ une cinquantaine). Notons de plus que la reconstruction d'une image TEP *post examen* est un processus long et donc coûteux (plusieurs heures), ce qui limite l'interprétation médicale rapide des images. De plus, les algorithmes de reconstruction en TEP sont des outils relativement fragiles et la résolution spatiale atteinte est très limitée (de l'ordre de 5mm). Enfin, les modèles cinétiques utilisés pour déterminer les paramètres physiologiques d'intérêt sont pour la plupart des modèles cinétiques pluri-compartmentaux dont la résolution nécessite de nombreuses connaissances biochimiques *a priori*.

**Lien indirect** L'utilisation de la TEP repose sur le lien entre activité métabolique des cellules dans une région donnée et accumulation du radiotracer dans cette même région. Il est important de noter que ce lien est indirect puisqu'il repose sur l'hypothèse qu'accumulation du radiotracer et activité cérébrale sont entièrement couplées. Par exemple, la mesure du DSCr par injection d' $^{15}\text{O}$  permet de visualiser la réponse hémodynamique. Sous l'hypothèse que l'augmentation du débit sanguin est directement couplée à une augmentation d'activité cellulaire, l'imagerie TEP permet en effet de visualiser l'activité cérébrale, mais de façon indirecte. De la même façon, la mesure de CMRglc permet de quantifier l'activité glycolytique cérébrale, mais n'est en aucun cas un indicateur direct du métabolisme oxydatif. Ainsi, l'imagerie cérébrale TEP reflète donc l'apport d'énergie plutôt que l'activité cérébrale proprement dite.

## 2.2 La spectroscopie par résonance magnétique *in vivo*

*Dans cette section, nous ne détaillerons pas les principes physiques de la spectroscopie RMN. Pour les lecteurs peu familiers avec cette technique, nous conseillons le remarquable livre "In vivo NMR spectroscopy" de R. De Graaf (de Graaf, 1998). Nous nous intéresserons plus particulièrement ici aux applications possibles de cette technique pour l'étude du métabolisme énergétique cérébral.*

Le développement de la spectroscopie par résonance magnétique *in vivo* a été rendu possible par l'essor de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) au cours des trois dernières décennies, ces deux techniques étant mises en oeuvre sur le même système d'imagerie. Cependant, la spectroscopie RMN est encore à ce jour une méthode peu utilisée en clinique, principalement à cause des difficultés que présentent son implémentation et son interprétation, mais également à cause de sa faible sensibilité intrinsèque et donc de la faible résolution spatiale accessible. Cependant, contrairement à l'IRM qui est basée sur la détection du noyau  $^1H$  exclusivement, la spectroscopie RMN *in vivo* permet d'étudier divers noyaux d'intérêt, dit noyaux X, parmi lesquels le carbone  $^{13}C$ , le phosphore  $^{31}P$  ou l'oxygène  $^{17}O$ , et ainsi d'obtenir des informations métaboliques et fonctionnelles hautement spécifiques.

Ainsi, cette technique présente un grand intérêt, autant d'un point de vue fondamental, pour la compréhension et l'analyse des flux métaboliques et de leur couplage, que d'un point de vue clinique, pour la découverte de biomarqueurs associés à l'évolution de pathologies ou pour la mise à jour des mécanismes déficients associés à la neurodégénérescence par exemple. Trois principales familles de paramètres peuvent être étudiées par cette méthode : (i) les concentrations métaboliques, absolues ou relatives, (ii) les flux métaboliques et (iii) les paramètres dit d'équilibre, tels que le pH ou les coefficients de diffusion.

### 2.2.1 Mesure des concentrations métaboliques

L'application la plus évidente de la spectroscopie RMN *in vivo* est l'étude des concentrations métaboliques. En effet, chaque métabolite, de part sa structure moléculaire et de

part son environnement chimique, présente une ou plusieurs résonances caractéristiques dont l'amplitude est proportionnelle à sa concentration. Ainsi, par la quantification des spectres RMN obtenus *in vivo*, les concentrations de nombreux métabolites peuvent être évaluées. Deux types d'études peuvent ainsi être réalisées : (i) des études de concentrations absolues, visant à déterminer les concentrations réelles des métabolites choisis dans le tissu d'intérêt et (ii) des études de concentrations relatives dont l'objectif est d'évaluer les modifications des rapports des concentrations entre un état physiologique normal et un état non basal (effort musculaire, pathologie, activation...).

Les études visant à déterminer des concentrations métaboliques absolues présentent un grand intérêt autant pour la recherche fondamentale (détermination des concentrations physiologiques typiques des métabolites cérébraux) mais également pour la recherche clinique (mesure des modifications de concentrations associées aux états pathologiques par exemple). Cependant, la détermination absolue des concentrations métaboliques présente une difficulté majeure, à savoir la nécessité d'une référence interne de concentration pour quantifier le spectre RMN. Plusieurs possibilités de référence ont ainsi été évaluées. Dans le cas de la spectroscopie RMN du  $^1H$ , un spectre de l'eau acquis avant suppression peut servir de référence absolue pour la quantification. Une calibration sur fantôme de concentrations connues peut également être réalisée. De nouvelles méthodes telles que la méthode ERETIC (Electric REference To access In vivo Concentrations) sont actuellement en cours de développement et permettraient la quantification absolue des spectres RMN de tous noyaux (Barantin et al., 1997, Schweizer et al., 2008). Dans tous les cas, la détermination des concentrations métaboliques absolues nécessite une ou plusieurs étapes préparatoires, ce qui complexifie encore un peu l'utilisation de la spectroscopie RMN. D'un autre côté, les études de concentrations relatives ne nécessitent pas de référence interne et sont par conséquent bien plus répandues car plus faciles à mettre en oeuvre. De nombreuses études ont ainsi cherché à déterminer quels rapports de concentrations métaboliques seraient les meilleurs marqueurs d'évolution de pathologies, en particulier dans le cas des maladies neurodégénératives. Cependant, la plupart des métabolites les plus concentrés, et donc visibles par spectroscopie du  $^1H$  (N-acétyl aspartate NAA, créatine Cr, choline Cho) sont peu spécifiques des pathologies. La mesure de leurs concentrations par spectroscopie RMN n'apporte ainsi qu'une aide diagnostique limitée par comparaison à l'imagerie anatomique.

Il est alors légitime de se poser la question de l'intérêt de mesurer les concentrations métaboliques, absolues ou relatives, en terme de compréhension de la biochimie cérébrale. De façon globale, un ensemble de concentrations métaboliques peut être vu comme un profil biochimique caractéristique du tissu d'intérêt. Il est donc dans un premier temps naturel de penser que toute modification physiologique et/ou biochimique pourrait entraîner des modifications de concentrations d'un ou plusieurs métabolites. Cependant, il faut noter que plus de la moitié de l'énergie utilisée par la cellule est convertie en travail homéostatique. Autrement dit, le maintien de l'homéostasie cellulaire est un processus coûteux en énergie car vital pour la cellule. Ainsi, toute variation de concentrations majeure au niveau cellulaire entraîne inexorablement la mort cellulaire. Or, au vu de la faible sensibilité de la spectroscopie RMN, les variations de concentrations détectables représentent souvent des modifications trop importantes pour la viabilité cellulaire. Ainsi, les variations de concentrations mesurées par RMN *in vivo* représentent plus vraisemblablement des modifications histologiques, c'est-à-dire des variations relatives des différentes populations cellulaires et/ou des modifications de densité cellulaire. Par exemple, une diminution de la concentration en NAA mesurée dans un voxel cérébral par spectroscopie RMN du  $^1H$  peut être interprétée comme une diminution de la densité neuronale, le NAA étant un métabolite spécifique de ce type cellulaire, mais ne renseigne pas sur le métabolisme cellulaire à proprement dit.

De plus, la mesure des concentrations métaboliques renseigne seulement sur un état biochimique à l'équilibre. En aucun cas l'étude des concentrations ne permet de connaître les modifications de flux métaboliques. Prenons l'exemple de deux métabolites A et B en équilibre biochimique *in vivo*. Une stabilité du ratio A/B au cours du temps n'implique pas forcément une stabilité des flux métaboliques  $A \rightarrow B$  et  $B \rightarrow A$ . Ainsi, des variations de concentrations (absolues ou relatives) peuvent être considérées comme des marqueurs d'évolution histologique mais ne renseignent pas sur les variations de flux métaboliques.

### 2.2.2 Mesure des flux métaboliques

L'étude des flux métaboliques présente évidemment un intérêt majeur pour la compréhension des fonctions métaboliques. En effet, la connaissance des flux permet de dresser un bilan fonctionnel du tissu d'intérêt, bien plus précis et pertinent que celui issu de la



connaissance des concentrations. En spectroscopie RMN *in vivo*, il est possible d'accéder à certains flux métaboliques principalement par des techniques de détection des noyaux X.

### Spectroscopie du $^{13}\text{C}$

L'approche la plus communément utilisée pour mesurer les flux métaboliques cérébraux par RMN est basée sur l'injection de substrats marqués au  $^{13}\text{C}$ , majoritairement du glucose mais également de l'acétate ou des corps cétoniques. L'abondance naturelle du  $^{13}\text{C}$  étant de 1.1%, l'incorporation du marquage  $^{13}\text{C}$  dans les métabolites cérébraux peut être mesurée au cours d'une infusion intra-veineuse (i.v) de substrats fortement enrichis en  $^{13}\text{C}$  (Rothman et al., 1985). Bien que cette approche puisse sembler similaire aux approches utilisées en autoradiographie au  $^{14}\text{C}$  ou en PET FDG, la spectroscopie RMN par enrichissement isotopique présente de nombreux avantages. En premier lieu, cette technique permet de détecter de façon spécifique les métabolites marqués au cours du temps, mais également la position atomique de marquage, contrairement à la TEP qui permet la mesure de la radioactivité dans son ensemble, indépendamment du radiotraceur utilisé. De plus, les substrats marqués au  $^{13}\text{C}$  sont métabolisés de la même manière que les substrats endogènes, ce qui permet d'évaluer réellement les flux métaboliques *in vivo*. Là encore, la TEP permet seulement de mesurer des accumulations de radiotraceurs, peu ou pas métabolisés au niveau cellulaire.

**Flux mesurables par spectroscopie du  $^{13}\text{C}$**  Ainsi, la spectroscopie RMN du  $^{13}\text{C}$  permet de détecter au cours du temps le marquage  $^{13}\text{C}$  de nombreux métabolites, et ce pour différentes positions atomiques. La connaissance de ces différentes courbes d'enrichissement permet alors, par l'utilisation d'un modèle métabolique adapté, de dériver de nombreux flux métaboliques. En effet, lors d'une injection de glucose marqué au  $^{13}\text{C}$ , les isotopes  $^{13}\text{C}$  vont être transportés le long de la glycolyse puis des cycles de Krebs neuro-naux et astrocytaires, mais également échangés entre les populations cellulaires via le cycle glutamate/glutamine (**Figure 2.4**). Lors d'une infusion i.v. de glucose marqué au  $^{13}\text{C}$ , il est possible par spectroscopie RMN de différencier jusqu'à 18 cinétiques d'enrichissement correspondant à 18 positions atomiques différentes dans 8 métabolites : les positions C2,

C3 et C4 du glutamate, les positions C2, C3 et C4 de la glutamine, les positions C2, C3 et C6 du N-acétyl aspartate, les positions C1 et C6 du glucose, la position C3 du lactate, les positions C2 et C3 de l'aspartate, les positions C2, C3 et C4 du GABA et la position C3 de l'alanine (Behar et al., 1986, Gruetter et al., 1994, Gruetter et al., 2001, Henry et al., 2003b)). Il est également possible d'étudier l'enrichissement du glycogène (Choi et al., 1999). Ces techniques d'enrichissement isotopique par injection de glucose ou d'acétate marqué ont permis, par l'application de modèle mono ou bicompartimental, de dériver de nombreux flux métaboliques cérébraux : la vitesse globale du cycle de Krebs  $V_{TCA}$  (mesure que nous décrivons en profondeur dans le paragraphe suivant) (Mason et al., 1992, Mason et al., 1995), les vitesses des cycle de Krebs astrocytaires  $V_{TCA,A}$  et neuronaux  $V_{TCA,N}$  ainsi que la vitesse du cycle glutamate/glutamine ou vitesse de neurotransmission  $V_{NT}$  (Henry et al., 2003b, Henry et al., 2003a, Gruetter et al., 2001, Lebon et al., 2002, Beckmann et al., 1991, Sibson et al., 1997, Blüml et al., 2001, Blüml et al., 2002).

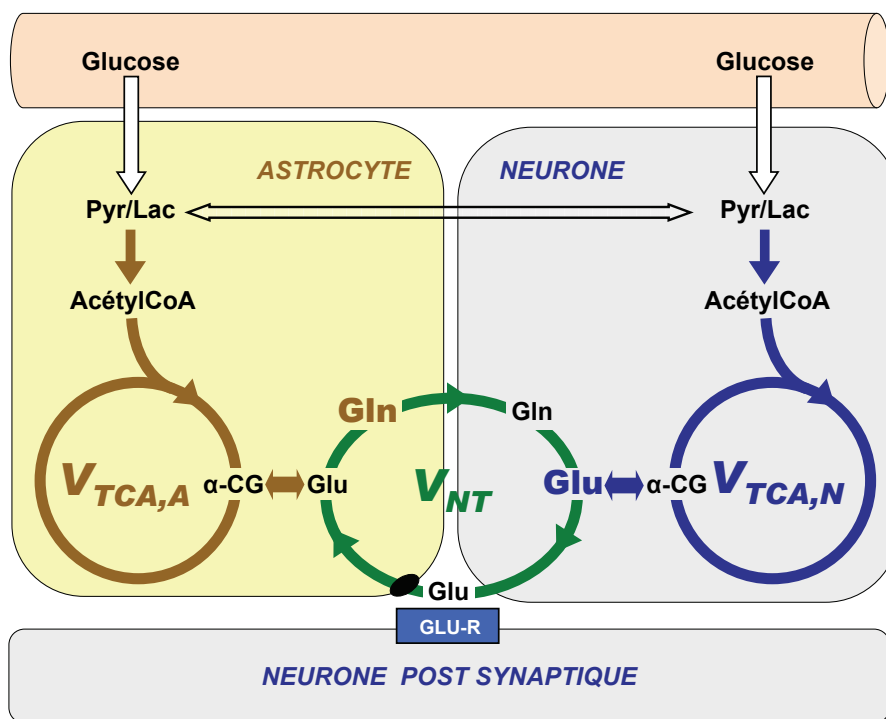


FIG. 2.4 – Cycles métaboliques détectables par spectroscopie du  $^{13}\text{C}$  Les techniques d'enrichissement isotopique par injection de glucose ou d'acétate marqué au  $^{13}\text{C}$  permettent d'évaluer de nombreux flux métaboliques cérébraux, en particulier les vitesses des cycle de Krebs astrocytaires  $V_{TCA,A}$  et neuronaux  $V_{TCA,N}$  ainsi que la vitesse du cycle glutamate/glutamine ou vitesse de neurotransmission  $V_{NT}$ .

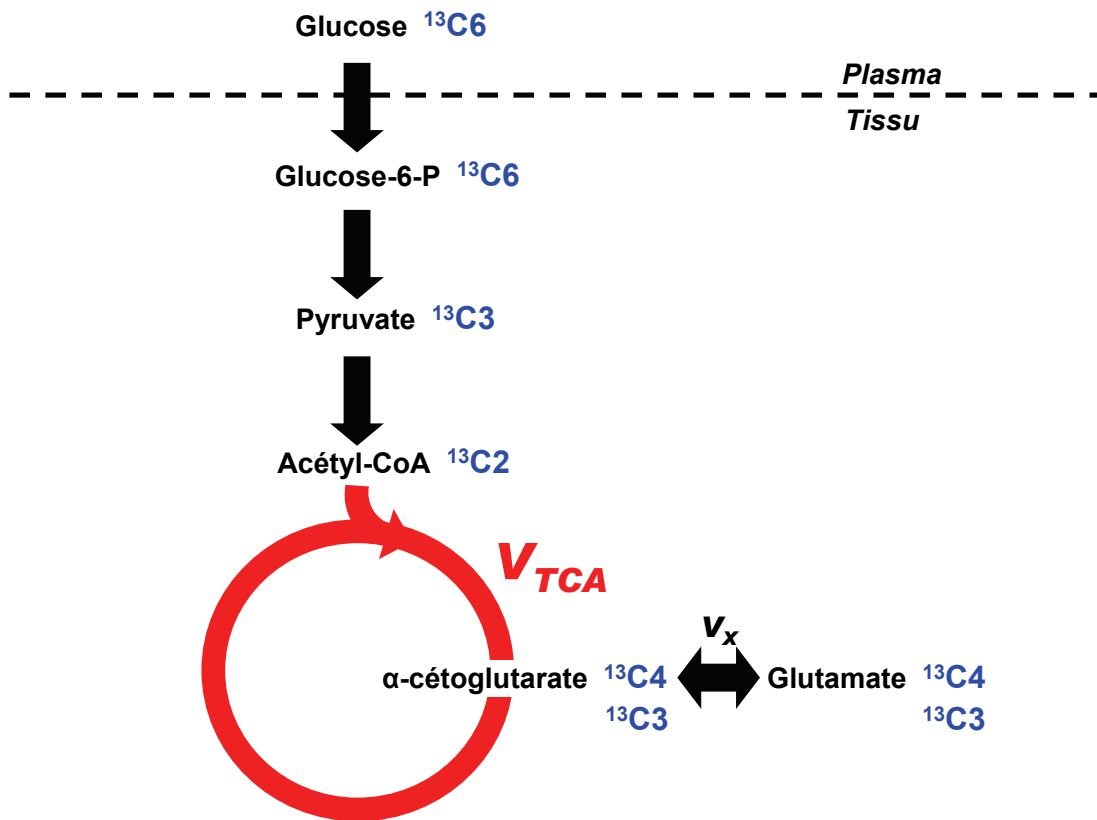


FIG. 2.5 – **Mesure de la vitesse du cycle de Krebs  $V_{TCA}$**  L'isotope  $^{13}\text{C}$  apporté par le carbone 6 du glucose va marquer au premier tour du cycle la position C4 du glutamate, puis au tour suivant la position C3, le glutamate étant en équilibre avec une molécule intermédiaire du cycle de Krebs, l' $\alpha$ -cétoglutarate.

**Mesure de  $V_{TCA}$**  Parce qu'elle représente une mesure unique du métabolisme oxydatif, la mesure de la vitesse du cycle de Krebs  $V_{TCA}$  présente un intérêt majeur. Afin de réaliser cette mesure, une perfusion i.v. continue de glucose marqué au  $^{13}\text{C}$  est réalisée. L'incorporation de cet isotope dans le pool de glutamate est ensuite mesurée de façon dynamique par spectroscopie RMN. Le glutamate, principal neurotransmetteur exciteur du cerveau, est en effet une molécule très concentrée ( $c \approx 10\text{mM}$ ), et donc détectable par RMN après enrichissement. De plus, le glutamate est en équilibre avec un des intermédiaires du cycle de Krebs, l' $\alpha$ -cétoglutarate. Or le glucose marqué au  $^{13}\text{C}$  injecté est dégradé le long de la glycolyse puis du cycle de Krebs. Ainsi, l'isotope  $^{13}\text{C}$  apporté par le carbone 6 du glucose va marquer au premier tour du cycle la position C4 du glutamate, puis au tour suivant la position C3 (**Figure 2.5**). La modélisation des cinétiques d'incorporation

de l'isotope  $^{13}\text{C}$  en position C3 et C4 du glutamate permet de déduire la valeur de  $V_{TCA}$  (Mason et al., 1992, Mason et al., 1995).

**Perspectives** L'avènement des hauts champs magnétiques, la précision accrue des nouveaux modèles métaboliques et l'utilisation de nouveaux précurseurs marqués devraient permettre d'étendre le nombre de flux accessibles par spectroscopie RMN du  $^{13}\text{C}$ , ou tout du moins d'augmenter la sensibilité de détection de cette technique. De plus, ces progrès pourraient permettre d'envisager l'étude des variations de flux métaboliques associées à une activation focale (Chhina et al., 2001, Hyder et al., 1996, Chen et al., 2001).

### Spectroscopie du $^{31}\text{P}$

La seconde technique de spectroscopie RMN la plus couramment utilisée pour la détermination de flux métaboliques est la spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$ . En effet, la majorité des composés détectables par spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$  sont des molécules phosphorées à haute énergie libre participant aux réactions de production, de transfert ou de consommation énergétique (**Figure 2.6**). Un spectre RMN  $^{31}\text{P}$  représente en quelque sorte un profil biochimique énergétique du tissu d'intérêt. Les 6 métabolites phosphorés les plus concentrés dans le cerveau, et donc détectables par RMN, sont la phosphocréatine PCr, le phosphate inorganique Pi, les phosphomonoesters PME, les phosphodiester PDE, l'adénosine triphosphate ATP et, dans une moindre mesure, le NADH. Nous avons détaillé dans le premier chapitre de ce manuscrit l'importance des molécules à haute énergie libre que sont l'ATP, le Pi et la PCr dans le métabolisme énergétique cérébral. Il est donc évident que la détection de ces molécules présente un intérêt fondamental pour l'étude des processus énergétiques.

Des techniques permettant de mesurer les flux métaboliques ont été développées en spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$  au cours des dernières décennies. En particulier, la méthode dite de transfert de saturation a permis d'accéder à la mesure de deux flux métaboliques majeurs (Alger and Shulman, 1984) : (i) le flux de synthèse cytosolique d'ATP à partir de la PCr  $V_{PCr}$  et (ii) le flux de synthèse globale d'ATP à partir du Pi  $V_{ATP}$ .

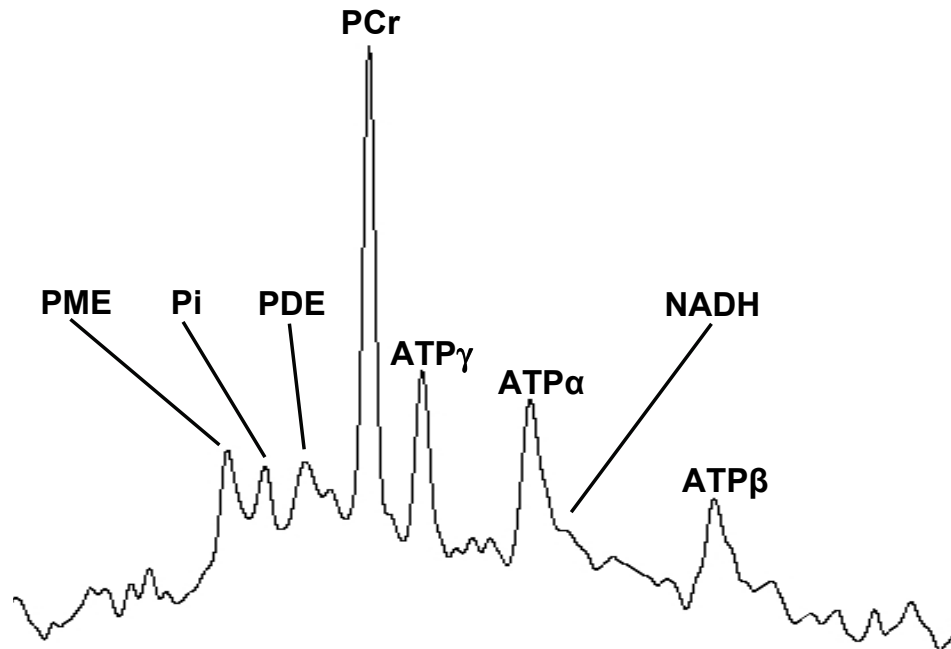
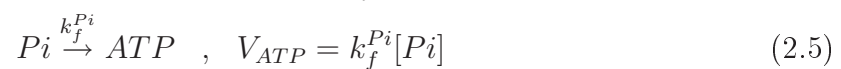
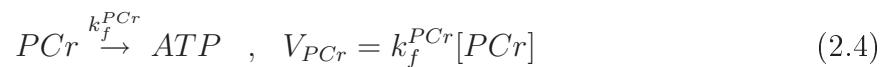


FIG. 2.6 – Spectre RMN  $^{31}\text{P}$  cérébral acquis à 3 teslas Les six métabolites détectables sur ce spectre sont les phosphomonesters (PME), les phosphodiesters (PDE), le phosphate inorganique (Pi), la phosphocréatine (PCr), l'ATP ( $\alpha, \beta$  et  $\gamma$ ) et le NADH.



Dans cette section, nous détaillerons le principe général de la mesure d'une cinétique chimique par transfert de saturation, puis nous nous intéresserons spécifiquement à une mesure présentant un intérêt majeur pour l'étude du métabolisme énergétique cérébral : la mesure de la vitesse de synthèse globale d'ATP  $V_{ATP}$ . Nous discuterons enfin l'intérêt respectif et la sensibilité relative des mesures de  $V_{PCr}$  et de  $V_{ATP}$ .

**Mesure de cinétique chimique par transfert de saturation** Considérons une réaction chimique entre deux composés A et B.



où  $k_{AB}$  et  $k_{BA}$  (exprimées en  $s^{-1}$ ) sont les constantes cinétiques de cet équilibre. Les flux correspondants, exprimés en  $\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ , sont, de A vers B,  $k_{AB} \times [A]$  et, de B vers A,  $k_{BA} \times [B]$ . Cet échange chimique peut également s'écrire en terme d'échange d'aimantation longitudinale en utilisant les équations de Bloch modifiées incluant l'échange chimique :

$$\frac{dM_{zA}}{dt} = \frac{M_{zA}^{eq} - M_{zA}(t)}{T_{1A}^{int}} - k_{AB}M_{zA}(t) + k_{BA}M_{zB}(t) \quad (2.7)$$

$$\frac{dM_{zB}}{dt} = \frac{M_{zB}^{eq} - M_{zB}(t)}{T_{1B}^{int}} + k_{AB}M_{zA}(t) - k_{BA}M_{zB}(t) \quad (2.8)$$

Les temps de relaxation  $T_{1A}^{int}$  et  $T_{1B}^{int}$  sont les temps de relaxation intrinsèques des composés A et B, c'est-à-dire en l'absence d'échange chimique. Nous nommerons par la suite  $T_{1A}^{mix}$  et  $T_{1B}^{mix}$  les temps de relaxation incluant l'échange chimique, c'est-à-dire mesuré en absence de saturation.

Il est possible de mesurer les constantes cinétiques  $k_{AB}$  ou  $k_{BA}$  en spectroscopie RMN par la méthode dite de transfert de saturation. Dans le cas de la mesure de  $k_{AB}$  par exemple, cette méthode consiste à saturer sélectivement l'aimantation du composé B pendant une durée  $tsat$ . Cette saturation a pour effet d'annuler l'aimantation du composé B pendant cette durée :  $M_{zB}(t) = 0$  pour  $0 < t < tsat$ . Ainsi, l'équation de Bloch modifiée pour le composé A peut être résolue analytiquement :

$$\frac{M_{zA}(tsat)}{M_{zA}^{eq}} = \frac{1}{1 + k_{AB}T_{1A}^{int}} + \left(1 - \frac{1}{1 + k_{AB}T_{1A}^{int}}\right) e^{-\left(k_{AB} + \frac{1}{T_{1A}^{int}}\right)tsat} \quad (2.9)$$

Cette équation décrit une décroissance monoexponentielle qui ne dépend plus de B et qui comporte deux inconnues : le temps de relaxation intrinsèque  $T_{1A}^{int}$  et la constante cinétique  $k_{AB}$ . Si  $T_{1A}^{int}$  est connu, il suffit pour déterminer  $k_{AB}$  de réaliser une expérience de transfert de saturation à  $tsat$  long, l'équation précédente pouvant alors s'écrire :

$$\frac{M_{zA}(\infty)}{M_{zA}^{eq}} = \frac{1}{1 + k_{AB}T_{1A}^{int}} \quad (2.10)$$

Lorsque le temps de relaxation intrinsèque du composé A n'est pas connu (ce qui est le cas dans la plupart des études *in vivo*), une expérience dite de *transfert de saturation progressif* doit être réalisée. Cette expérience consiste à saturer l'aimantation du composé B pendant des intervalles *tsat* de durée croissante. L'ensemble des résultats permet alors, par ajustement de la décroissance monoexponentielle, de déterminer  $T_{1A}^{int}$  et  $k_{AB}$ .

Cependant, il est important de noter que toutes les réactions chimiques ne peuvent pas être étudiées par transfert de saturation. En effet, pour pouvoir caractériser une cinétique par cette méthode, il faut que la constante cinétique de la réaction  $k_{AB}$  soit du même ordre de grandeur que l'inverse du  $T_{1A}^{int}$ . En effet, si  $k_{AB} \ll 1/T_{1A}^{int}$ , alors, lors de l'expérience de transfert de saturation progressif, la perte d'aimantation de A due à l'échange chimique sera négligeable par rapport à la relaxation longitudinale de A : la saturation de B n'aura pas d'effet détectable sur A, l'**Equation 2.9** devenant :

$$\frac{M_{zA}(tsat)}{M_{zA}^{eq}} \approx 1 \quad (2.11)$$

Pour  $k_{AB} \gg 1/T_{1A}^{int}$ , l'échange chimique entre A et B devient suffisamment rapide pour entraîner la coalescence des raies de A et B. Les résonances de A et B étant coalescentes, il est alors impossible de les saturer sélectivement.

**Mesure de la synthèse d'ATP** En conditions physiologiques normales, la réaction chimique entre ATP et Pi reflète l'équilibre entre réactions endergoniques, consommant l'énergie, et production d'ATP (cf. Chapitre 1) :



Les trois composés phosphorés participant à cette réaction sont visibles en spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$  : l'ATP présente trois résonances  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (chacune d'entre elles étant en fait un multiplet) correspondant aux trois atomes de phosphores des groupements phosphates ; l'ADP présente deux résonances  $\alpha$  et  $\beta$ , et le Pi une seule résonance. Lors de la réaction de synthèse d'ATP à partir de l'ADP et du Pi, le Pi se lie en position terminale aux deux groupements phosphates de l'ADP. Ainsi, la liaison du Pi à la molécule d'ADP est à l'origine de la résonance  $\gamma$  de l'ATP. Notons enfin que l'ADP est trop faiblement concentré dans le cerveau pour être détectable par spectroscopie RMN à 3T, il n'est donc pas quantifiable sur les spectres  $^{31}\text{P}$ .

Ainsi, il est possible de réécrire la réaction d'échange chimique entre l'ATP et le Pi en terme d'échange d'aimantation :



Notons tout d'abord que la constante cinétique de synthèse d'ATP  $k_f$  est du même ordre de grandeur que l'inverse du temps de relaxation longitudinale intrinsèque du Pi  $T_{Pi}^{int}$ . La méthode de transfert de saturation est ainsi particulièrement sensible à la mesure de la synthèse d'ATP (Kingsley-Hickman et al., 1987). La solution de l'équation de Bloch modifiée pour cet échange chimique s'écrit alors :

$$\frac{M_{zPi}(tsat)}{M_{zPi}^{eq}} = \frac{1}{1 + k_f T_{1Pi}^{int}} + \left(1 - \frac{1}{1 + k_f T_{1Pi}^{int}}\right) e^{-\left(k_f + \frac{1}{T_{1Pi}^{int}}\right)tsat} \quad (2.14)$$

En effectuant une saturation sélective progressive de la résonance de l'ATP $\gamma$ , il est donc possible de dériver les paramètres  $k_f$  et  $T_{Pi}^{int}$  et donc d'évaluer le flux  $Pi \rightarrow ATP$ .

Il faut maintenant se demander si le flux que l'on mesure par cette technique peut être considéré comme un flux net de synthèse d'ATP. En effet, saturer l'aimantation du pool d'ATP revient à annuler la contribution du flux  $k_r \times [ATP]$  à l'aimantation du pool de Pi, le flux  $k_r \times [ATP]$  englobant toutes les réactions de dégradation de l'ATP. Or il est connu



que certaines réactions de dégradation d'ATP ne sont pas des réactions de consommation nette d'énergie, en d'autres termes non utile pour les travaux cellulaires, mais seulement des réactions réversibles d'équilibre au cours desquelles les molécules d'ATP sont consommées et aussitôt régénérées. Cette contribution inefficace en terme de bilan énergétique augmente donc le flux  $k_r \times [\text{ATP}]$  et, par conséquence, le flux mesuré  $k_f \times [\text{Pi}]$ . Or, il est évident la mesure de  $k_f \times [\text{Pi}]$  présente un intérêt majeur uniquement si elle reflète directement la synthèse nette d'ATP, c'est-à-dire si la contribution des processus inefficaces est négligeable. Des études effectuées sur le muscle squelettique ont montré que de tels processus inefficaces existent et qu'ils contribuent de façon majoritaire au flux  $k_f \times [\text{Pi}]$  mesuré (Kingsley-Hickman et al., 1987, Lebon et al., 2001, Jucker et al., 2000). En particulier, les enzymes glycolytiques glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GADPH) et phosphoglycérate kinase (PGK) (**Figure 1.3**) sont à l'origine d'un flux inefficace mesurable par transfert de saturation et majoritaire dans le myocarde de rat (Kingsley-Hickman et al., 1987). Le flux mesuré est ainsi plus élevé que celui attendu en l'absence de contribution inefficace. Les auteurs ont de plus montré que en cas d'inhibition des deux enzymes glycolytiques GADPH et PGK, le flux mesuré par transfert de saturation était de l'ordre de grandeur de celui attendu en cas de rendement énergétique maximal des mitochondries (18 fois la vitesse du cycle de Krebs, ou 36 fois la vitesse de glycolyse).

Cependant, une étude menée dans le cerveau humain plaide en faveur d'une contribution négligeable des réactions glycolytiques catalysées par GADPH et PGK au flux mesuré par transfert de saturation semble négligeable (Lei et al., 2003a). Cette observation pourrait être expliquée par la compartimentation cellulaire du Pi. En effet, le Pi semble être beaucoup plus concentré dans les neurones que dans les cellules gliales (Sonnewald et al., 1994, Lei et al., 2003b). Ainsi, le flux mesuré par transfert de saturation reflèterait vraisemblablement majoritairement le métabolisme neuronal. De plus, de nombreuses études laissent penser que la glycolyse se déroulerait principalement dans les cellules gliales, tout du moins lors de l'activation (Pellerin and Magistretti, 1994, Pellerin and Magistretti, 2003, Pellerin et al., 2007). Ainsi, la méthode de transfert de saturation permettrait de mesurer majoritairement la synthèse nette d'ATP produite par le métabolisme oxydatif neuronal. Cependant, au vu des nombreuses hypothèses énoncées ci-dessus, il apparaît que la mesure de  $V_{ATP}$  par transfert de saturation nécessite à ce jour des études de validation complémentaires.

***VPCr vs. VATP*** Nous venons de voir que la mesure de flux métabolique par transfert de saturation consiste à (1) saturer sélectivement l'aimantation de l'ATP pendant une durée  $t_{sat}$  puis (2) à mesurer la variation d'amplitude du Pi pour  $V_{ATP}$  ou de la PCr pour  $V_{PCr}$  induite par cette saturation. La PCr étant 2 à 2.5 fois plus concentrée que le Pi mais également environ 2 fois mieux résolue spectralement ( $T_2^{PCr} \approx 2 \times T_2^{Pi}$ ), la quantification des variations d'amplitude de la résonance de la PCr est plus aisée que la quantification des variations d'amplitude de la résonance du Pi. Ceci explique pourquoi, alors que la mesure du flux  $V_{PCr}$  a été reportée dans de nombreuses études (Shoubridge et al., 1982, Morris et al., 1985, Ogawa et al., 1986, Bachelard et al., 1987, Degani et al., 1987, Holtzman et al., 1989, Mora et al., 1991, Mora et al., 1992, Sauter and Rudin, 1993, Corbett and Lupton, 1994, Holtzman et al., 1996, Smith et al., 1997, Braunová et al., 2000, Du et al., 2007), la mesure du flux global de synthèse d'ATP  $V_{ATP}$  n'a été à ce jour réalisée que dans deux laboratoires (Shoubridge et al., 1982, Lei et al., 2003a, Du et al., 2007). Cependant, la mesure de  $V_{ATP}$  présente un intérêt métabolique considérablement supérieur à la mesure de  $V_{PCr}$ . En effet,  $V_{PCr}$  quantifie un flux de régénération du stock d'ATP à partir de la PCr cytosolique uniquement. Autrement dit, ce flux est un flux de transfert d'une molécule à haute énergie libre, la PCr, vers une autre molécule à haute énergie libre, l'ATP. Le bilan énergétique de la conversion de PCr en ATP est donc quasi-nul ( $\Delta G_0 \approx 0$ ). Ainsi,  $V_{PCr}$  quantifie seulement la capacité de la cellule à maintenir son stock d'ATP, mais ne donne pas d'information sur la production d'ATP proprement dite. Au contraire, le flux quantifié par  $V_{ATP}$  englobe la contribution de toutes les voies cataboliques permettant la production d'ATP à partir du Pi. Ce flux  $Pi \longrightarrow ATP$  est donc un flux net de production d'énergie dont le bilan énergétique est positif (si la contamination glycolytique est effectivement négligeable). Par conséquent, la mesure de la vitesse globale de synthèse d'ATP  $V_{ATP}$  présente un intérêt majeur pour l'évaluation du métabolisme énergétique cérébral.

### **Autres méthodes spectroscopiques de mesure de flux**

Ces dernières années, de nouvelles méthodes de spectroscopie RMN permettant d'accéder à des mesures innovantes de flux métaboliques cérébraux ont été proposées. Parmi ces méthodes confidentielles et/ou coûteuses, on peut citer :

- L'utilisation de noyaux X *exotiques* que l'avènement des hauts champs magnétiques rend potentiellement intéressants. Ainsi, une première mesure de la consommation cérébrale

d'oxygène  $CMRO_2$  par spectroscopie RMN de l'oxygène 17 ( $^{17}O$ ) a été réalisée en 2005 à 7T (Zhang et al., 2004, Zhu et al., 2005). Cependant, l'utilisation de l' $^{17}O$  reste encore au stade expérimental, cet isotope étant très coûteux.

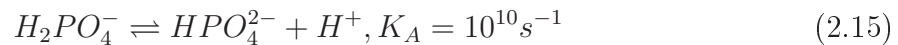
- L'hyperpolarisation de noyaux X, principalement du  $^{13}C$ , qui permet de multiplier le rapport signal sur bruit accessible par un facteur  $>10000$  (Ardenkjaer-Larsen et al., 2003). L'utilisation de  $^{13}C$ -pyruvate hyperpolarisé a notamment permis de mesurer *in vivo* les flux de conversion  $^{13}C$ -pyruvate $\rightarrow$  $^{13}C$ -lactate,  $^{13}C$ -pyruvate $\rightarrow$  $^{13}C$ -alanine et  $^{13}C$ -pyruvate $\rightarrow$  $^{13}C$ -bicarbonate avec une résolution temporelle de 3s (Kohler et al., 2007). Par injection de bicarbonate marqué  $H^{13}CO_3^-$ , Gallagher *et al.* ont récemment montré qu'il est également possible d'effectuer une cartographie du pH *in vivo* (Gallagher et al., 2008). Cependant, il faut noter que le temps de dépolarisation de ces composés est de l'ordre de  $\approx 1$ min *in vivo*, *i.e.* du même ordre de grandeur que le temps nécessaire à leur passage de la barrière hémato-encéphalique. Par conséquent, ils ne sont à ce jour pas utilisables comme tels pour les études cérébrales. Le développement de nouvelles molécules dont la polarisation relaxerait plus lentement (*long lived hyperpolarized states*) apparaît donc comme un enjeu majeur (Vinogradov and Grant, 2008).
- La combinaison du marquage isotopique au  $^{13}C$  et du transfert de saturation (Xu et al., 2007). Cette approche originale consiste, dans un premier temps, à enrichir en  $^{13}C$  un couple substrat/produit *in vivo* afin de rendre détectable le produit enrichi. Dans un second temps, on applique une technique de transfert de saturation en irradiant sélectivement la résonance du produit. Ce faisant, il est possible d'évaluer la vitesse de la réaction substrat/produit, et ce même si le produit est indétectable par manque de sensibilité sur le spectre  $^{13}C$ . Ce principe a été mis en oeuvre pour la mesure de la réaction lactate $\rightarrow$ pyruvate catalysée par la lactate déshydrogénase (Xu et al., 2007), ou encore pour la mesure de l'échange  $CO_2/HCO_3^-$  (Yang et al., 2008).

Il est intéressant de noter qu'aucune de ces approches ne peut être a priori utilisée en spectroscopie RMN du  $^1H$  au vu de l'abondance naturelle du proton (99.985%) et de la complexité des spectres  $^1H$  qui empêchent la modification d'aimantation sélective d'un métabolite. Des méthodes d'édition et de transfert de polarisation hétéronucléaire restent cependant possibles et se doivent d'être mentionnées. Dans tous les cas, il est important de souligner que les mesures de flux par spectroscopie RMN sont des mesures complexes, tant au niveau de l'implémentation que de l'interprétation, très peu sensibles et potentiellement

invasives (injection de précurseur marqué au  $^{13}\text{C}$  par exemple). L'utilisation de ces mesures en routine clinique apparaît ainsi encore à ce jour comme un défi méthodologique.

### 2.2.3 Mesure des paramètres d'équilibre

**pH physiologique par spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$**  En conditions physiologiques normales, le phosphate inorganique Pi est en équilibre entre deux formes chimiques  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  et  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Cet équilibre acido-basique est un échange chimique extrêmement rapide ( $K_A = 10^{10}\text{s}^{-1}$ ) (**Equation 2.15**). Sur un spectre RMN  $^{31}\text{P}$  acquis *in vivo*, le Pi ne présente pas deux résonances distinctes (chacune correspondant à une forme chimique) mais une seule résonance dont la fréquence dépend des concentrations respectives des deux composés en équilibre  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  et  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Or le pKa de ce couple acidobasique est de  $\text{pKa} \approx 6.77$  et donc très proche du pH physiologique. Ainsi, cet équilibre chimique présente une grande sensibilité aux variations de pH dans la gamme physiologique. Il est donc possible, en estimant les variations de déplacement chimique de la résonance du Pi, d'estimer les variations du pH physiologique avec une grande précision.



Afin de garantir la reproductibilité des mesures de pH par mesure de déplacement chimique, il est nécessaire de choisir une référence interne de fréquence. La référence la plus communément choisie est la résonance de la PCr qui présente deux avantages majeurs. Tout d'abord, la fréquence de résonance de la PCr est indépendante des variations de pH dans la gamme physiologique et peut donc être considérée comme référence. De plus, la PCr étant environ deux fois plus concentrée que le Pi et ne présentant pas de recouvrements avec d'autres résonances, le pic de résonance de la PCr est de loin le plus résolu du spectre  $^{31}\text{P}$  cérébral, ce qui augmente la précision de la détermination de sa fréquence centrale.

Ainsi, afin de déterminer le pH cérébral, il suffit d'évaluer la différence de déplacement chimique  $\delta$  entre les résonances du Pi et de la PCr et d'appliquer la formule d'Henderson-Hasselbach modifiée suivante :

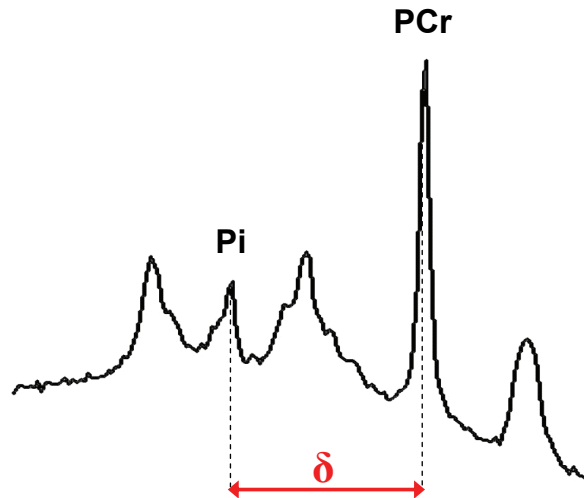


FIG. 2.7 – **Détermination du pH** La mesure de la différence de déplacement chimique  $\delta$  entre les résonances du Pi et de la PCr permet d'évaluer le pH physiologique par l'équation d'Henderson-Hasselbach modifiée.

$$pH = pKa + \log \frac{\delta - \delta_{HA}}{\delta_A - \delta} \quad (2.16)$$

où  $\delta$  est le déplacement chimique observé (**Figure 2.7**),  $\delta_{HA}$  et  $\delta_A$  sont les déplacements chimiques des formes protonnée ( $H_2PO_4^-$ ) et non protonnée ( $HPO_4^{2-}$ ), et pKa est le logarithme de la constante d'équilibre  $K_A$  de l'équilibre acido-basique.

Le pH ainsi obtenu est un pH physiologique global, incluant des contributions intracellulaire et extracellulaire. En effet, la résonance du Pi est composée d'une résonance majeure correspondant au Pi intracellulaire et d'une résonance mineure correspondant au Pi extracellulaire (Lei et al., 2003b). Dans ce manuscrit, nous occulterons volontairement l'existence de ces deux composantes, la résolution spectrale obtenue lors de nos études ne nous permettant pas de différencier les deux composantes.

Ainsi, la spectroscopie RMN du  $^{31}P$  permet d'estimer précisément le pH physiologique global par la mesure de la différence de déplacement chimique entre un composé référence (PCr) et un composé dont la résonance dépend fortement du pH dans la gamme physiologique (Pi). Notons que ces mesures de déplacement chimique permettent également d'accéder à la concentration tissulaire en  $Mg^{2+}$ .

**pH extracellulaire par spectroscopie RMN du  $^1\text{H}$**  La mesure du pH extracellulaire en spectroscopie RMN du proton est également basée sur une mesure de déplacement chimique d'une ou de plusieurs résonances dépendantes du pH. La différence fondamentale avec la méthode précédente est que les résonances d'intérêt proviennent de molécules *exogènes* administrées par injection. L'utilisation de ces *sondes pHmétriques* a permis de réaliser des cartographies du pHe par imagerie spectroscopique, en particulier sur des rats porteurs de tumeurs cérébrales, mettant en évidence une diminution de pHe dans ces tumeurs (García-Martín et al., 2001). Cependant, il faut noter que la réalisation de telles molécules est complexe car conditionnée par de nombreux facteurs : toxicité, perturbation physiologique, fréquence de résonance hors de la gamme des résonances des composés physiologiques, compartimentation dans l'espace extracellulaire... (Provent, 2006). L'utilisation de ce type de sondes reste donc pour l'instant peu envisageable pour des études humaines.

**Coefficients de diffusion** D'autres techniques de spectroscopie RMN, telle que la spectroscopie  $^1\text{H}$  de diffusion, permettent d'accéder aux coefficients de diffusion (ADC) de nombreux métabolites d'intérêt, renseignant sur la compartimentation inter et intracellulaire de ces composés (Pfeuffer et al., 2000, Posse et al., 1993, Valette et al., 2007, Valette et al., 2008).

## 2.2.4 Limitations

La principale limitation à l'utilisation de la spectroscopie RMN *in vivo* est sa faible sensibilité intrinsèque. En effet, l'obtention de spectres RMN quantifiables et donc interprétables est soumise à trois conditions au minimum :

- Tout d'abord, il est nécessaire que le noyau étudié ait une abondance naturelle suffisante. Cette condition est remplie dans le cas des noyaux  $^1\text{H}$  (99.985%) et  $^{31}\text{P}$  (100%), mais pas dans le cas du  $^{13}\text{C}$  (1.108%). Des techniques d'enrichissement isotopique peuvent alors être utilisées afin de palier cette condition.
- De plus, la sensibilité de détection au noyau d'intérêt doit être suffisamment élevée. Cette valeur est proportionnelle à  $\gamma^3 I(I + 1)$ , où  $\gamma$  est le rapport gyromagnétique du noyau étudié. Ainsi, elle est de 0.0663 pour le  $^{31}\text{P}$  et de 0.0159 pour le  $^{13}\text{C}$ , contre 1 pour le

$^1H$ .

- Enfin, il est évidemment nécessaire que le métabolite à quantifier soit suffisamment concentré dans le tissu d'intérêt. Le profil biochimique visible par spectroscopie RMN est ainsi largement dépendant du tissu étudié.

Ainsi, la grande majorité des études de spectroscopie RMN dans le système nerveux central sont réalisées par spectroscopie RMN du  $^1H$ . La spectroscopie RMN du  $^{31}P$  est quand à elle largement utilisée pour l'étude des tissus musculaires, les concentrations des métabolites phosphorés y étant très élevées. L'utilisation de techniques de spectroscopie des noyaux X pour l'étude du système nerveux central reste complexe, le manque de sensibilité devant être pallié par un nombre important d'expériences et/ou un enrichissement isotopique. De plus, il faut souligner que la quantification d'un spectre RMN présente de nombreuses difficultés. En effet, de nombreux facteurs compliquent l'interprétation des spectres et la détermination des différentes résonances qui le composent. Citons par exemple les recouvrements (*Overlap*) entre résonances, les effets de J modulation, les effets de toit, les variations de phase d'ordre 1, les distorsions de résonances, les variations de ligne de base... Par conséquent, la quantification des spectres RMN est à elle seule un domaine de recherche propre qui mobilise de nombreux laboratoires.

Finalement, même si la spectroscopie RMN *in vivo* est limitée par une faible sensibilité intrinsèque, cette technique apparaît comme une technique d'intérêt pour l'étude de nombreux paramètres métaboliques, notamment dans le système nerveux central. Plus particulièrement, la spectroscopie des noyaux X apparaît comme la solution de choix pour l'étude des réactions biochimiques *in vivo*, la mesure des flux métaboliques présentant un intérêt majeur pour la compréhension fonctionnelle du cerveau.

## Partie I : Conclusion

La maladie de Huntington illustre les liens étroits entre neurodégénérescence et déficit énergétique. Dans ce contexte, la possibilité d'évaluer le métabolisme énergétique cérébral *in vivo* présente un intérêt majeur. En particulier, parmi les paramètres caractéristiques du métabolisme énergétique, les flux métaboliques renseignent non pas sur l'équilibre cellulaire dans son ensemble mais sur la dynamique métabolique, sur l'état de fonctionnement cellulaire. Parmi les méthodes de neuroimagerie permettant de réaliser des mesures de flux métaboliques *in vivo*, la spectroscopie RMN se présente comme une des méthodes les plus pertinentes. En effet, cette technique permet d'accéder à des valeurs de flux majeurs, telle la vitesse de synthèse d'ATP globale. Cependant, l'implémentation des techniques spectroscopiques relève encore du défi méthodologique et reste confrontée à une sensibilité de détection limitée. Un travail d'implémentation et de validation s'impose avant d'envisager l'application à l'homme de ces méthodes, en particulier de la méthode de mesure de  $V_{ATP}$ .





## Deuxième partie

# Validation multimodale de la mesure de synthèse d'ATP par RMN du $^{31}\text{P}$



## Chapitre 3

### Plan expérimental

Au regard du contexte exposé en première partie de ce manuscrit, il apparaît que la spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$  présente un potentiel unique pour l'étude du métabolisme énergétique cérébral. En particulier, par l'utilisation de la méthode de transfert de saturation, cette modalité permet la quantification du flux unidirectionnel  $V_{ATP}$ , flux qui peut être considéré comme un *gold standard* du métabolisme énergétique. Ce flux est en effet indépendant des substrats énergétiques (glucose, acide gras, glycogène...) et reflète la synthèse globale d'ATP au cours des diverses voies cataboliques, parmi lesquelles la glycolyse, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. De plus, cette technique présente l'avantage de ne nécessiter aucune injection de précurseur marqué et d'être par conséquent strictement non invasive. Cependant, bien que le potentiel de la spectroscopie du  $^{31}\text{P}$  ait été connu depuis trois décennies, seulement deux mesures cérébrales *in vivo* de  $V_{ATP}$  avaient été rapportées lorsque ce travail de thèse a été initié : une dans le cerveau de rat en 1982 (Shoubridge et al., 1982) et une plus récente dans le cerveau humain en 2003 (Lei et al., 2003a). De plus, il est important de noter que ces études avaient été réalisées à haut champ ( $B_0 > 4\text{T}$ ) sans aucune localisation spectroscopique, la localisation étant simplement déterminée par la sensibilité de l'antenne de surface. Enfin, il a également été montré que la mesure de  $V_{ATP}$  par transfert de saturation pouvait être contaminée par la synthèse réversible d'ATP catalysée par certaines enzymes glycolytiques. Cette contamination s'est révélée dominante dans les tissus périphériques perfusés (Kingsley-Hickman et al., 1987, Brindle and Radda, 1987), dans le muscle squelettique de rongeur (Jucker et al., 2000) et dans le muscle squelettique humain (Lebon et al., 2001). Ainsi, la mesure

de  $V_{ATP}$  par la méthode de transfert de saturation représente encore un défi méthodologique et des études complémentaires de validation restent à mener afin de vérifier la fiabilité de cette technique pour la mesure *in vivo* de la synthèse cérébrale d'énergie.

Dans ce contexte, le premier objectif de ce doctorat a été de valider cette technique. Pour ce faire, nous avons utilisé une méthode de neuroimagerie multimodale permettant la validation directe de la mesure de  $V_{ATP}$  par comparaison avec d'autres mesures du métabolisme énergétique cérébral. Dans ce chapitre, la conception de l'approche multimodale sera décrite en détail. Dans un premier temps, les trois flux métaboliques étudiés dans cette étude seront présentés et leurs couplages théoriques mis en avant. La reproductibilité des expériences de neuroimagerie sera ensuite discutée, tant au niveau du matériel utilisé qu'au niveau de la physiologie des primates. Enfin, les sensibilités intrinsèque et relative des différentes modalités seront exposées. Le plan expérimental sera alors décrit.

### 3.1 Flux mesurés et couplages métaboliques

Une approche de neuroimagerie multimodalités a été mise en place au cours de ce travail de thèse. Les principaux objectifs de cette approche étaient *(i)* d'obtenir une évaluation globale du métabolisme énergétique cérébral par l'utilisation de trois techniques de neuroimagerie complémentaires : la TEP  $^{18}\text{F}$ -FDG, la spectroscopie RMN du  $^{13}\text{C}$  et la spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$ , et *(ii)* de valider ainsi la méthode de transfert saturation comme méthode robuste de mesure de la synthèse cérébrale d'énergie.

Le plan expérimental choisi dans cette étude avait ainsi pour but de mesurer les trois flux métaboliques  $CMR_{glc}$ ,  $V_{TCA}$  et  $V_{ATP}$  respectivement par  $^{18}\text{F}$ -FDG TEP, spectroscopie RMN du  $^{13}\text{C}$  et spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$ . Pour rappel, en conditions physiologiques normales, la transformation du glucose au cours de la glycolyse puis du cycle de Krebs devrait être couplé stoechiométriquement à la synthèse d'ATP cérébral (**Figure 3.1**) (cf. Chapitre 1). Par conséquent, la mesure des trois flux choisis devrait permettre d'effectuer une validation de la mesure de  $V_{ATP}$  par spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$  et de dresser un bilan global des principales voies cataboliques du métabolisme énergétique cellulaire. Afin d'obtenir des mesures comparables et donc corrélables entre elles, la reproductibilité des expériences a été contrôlée et les flux mesurés dans une zone du cerveau définie chez les

mêmes animaux en mêmes conditions physiologiques.

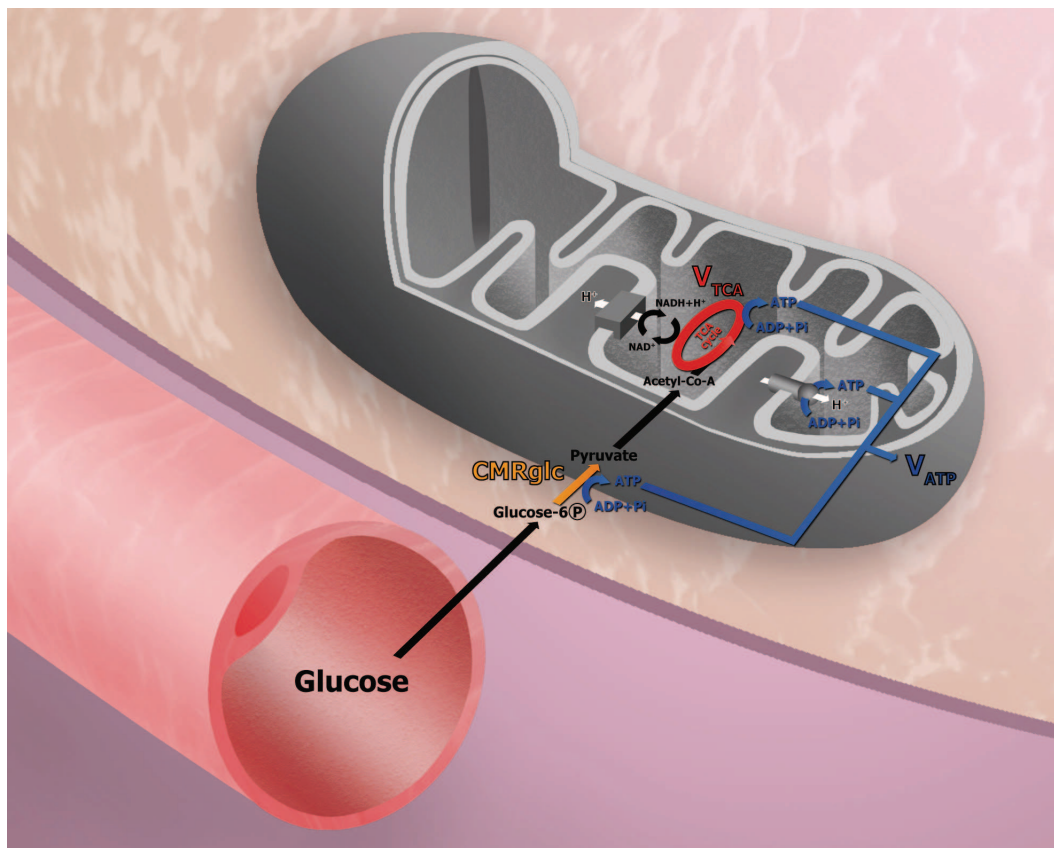


FIG. 3.1 – **Mitochondrie et flux métaboliques détectables.** Les trois flux métaboliques mesurés lors de cet étude ( $CMR_{glc}$ ,  $V_{TCA}$  et  $V_{ATP}$ ) sont ici représentés. En conditions physiologiques normales, la transformation du glucose au cours de la glycolyse puis du cycle de Krebs devrait être couplé stoechiométriquement à la synthèse d'ATP cérébral.

Il est important de préciser que l'approche décrite dans ce manuscrit tire largement profit des développements et études menées ces dernières années dans le laboratoire. En effet, une étude de validation croisée des mesures de  $CMR_{glc}$  et de  $V_{TCA}$  chez le primate sain a été menée dans le laboratoire par Boumezbeur *et al.* en 2005. Cette étude a permis de vérifier les couplages théoriques entre ces deux flux et ainsi de proposer pour la première fois une validation directe de la mesure de  $V_{TCA}$  par spectroscopie RMN du  $^{13}C$  (Boumezbeur *et al.*, 2005). De plus, de récents développements en spectroscopie RMN du  $^{31}P$ , menés par Valette *et al.*, ont permis d'obtenir des spectres  $^{31}P$  localisés dans le cerveau de primate (Valette *et al.*, 2006b).

## 3.2 Systèmes d'imagerie utilisés

Tout d'abord, il faut souligner que cette étude a été rendue possible par l'environnement de travail du SHFJ. En effet, sur ce site, nous disposons d'un système d'imagerie RMN, d'un système d'imagerie TEP et d'une animalerie primate.

### 3.2.1 Système RMN 3 teslas

Le système RMN du SHFJ était un spectromètre 3 T corps entier MedSpec (Bruker Biospin, Ettlingen, Allemagne) de diamètre interne 97 cm (**Figure 3.2 (a)**). En réalité, le champ magnétique statique, orienté selon l'axe  $z$  du tunnel, était de 2.94 T, ce qui correspond à une fréquence de Larmor de 125.127MHz pour le proton, 50.625MHz pour le phosphore 31 et 31.467MHz pour le carbone 13. Cet imageur était équipé d'un tunnel de gradient de diamètre interne 55 cm. L'intensité maximale des gradients était de  $44\text{mT}\cdot\text{m}^{-1}$ , leur temps de montée de  $310\mu\text{s}$ . Un blindage actif et des courants de préamplification permettaient de limiter les courants de Foucault. La correction des inhomogénéités de champ  $B_0$  ("shim") était effectuée au premier ordre  $(x, y, z)$  par les bobines de gradients, et au second ordre  $(z^2, xy, yz, zx, x^2 - y^2)$  par un canon de shim. La commande du système s'effectuait depuis une console Linux équipée du logiciel Bruker Paravision 3.0.2. (**Figure 3.2 (b)**).

La sonde radiofréquence utilisée dans cette étude est une sonde de surface Bruker double accord  $^1\text{H}/^{31}\text{P}$  de diamètre 4.5cm. En terme de rapport signal sur bruit, l'utilisation de ce type de sonde est en effet préférable, au vu du faible volume d'intérêt cérébral et de la faible profondeur de ce volume par rapport à la surface de la tête. Pour l'émission, la sonde est raccordée par un câble coaxial d'impédance  $50\Omega$  à un amplificateur de puissance (Dressler HF technik, Stolberg-Vicht, Allemagne). Pour la réception, elle est reliée à un étage de préamplification.

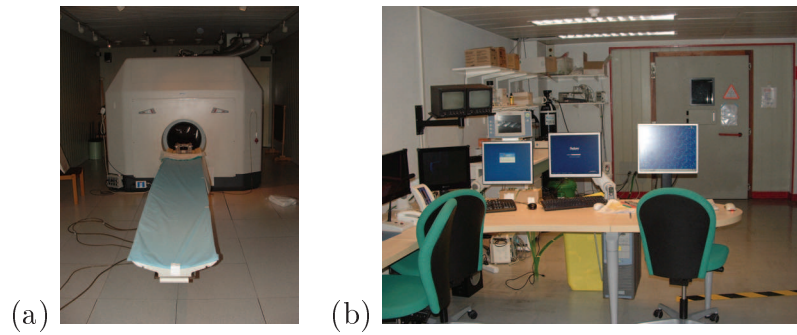


FIG. 3.2 – **Système RMN** (a) Système RMN 3 teslas du SHFJ (b) Salle de pilotage de l'imageur 3T

### 3.2.2 Système TEP

L'imagerie TEP a été effectuée sur un tomographe ECAT EXACT HR+ (Siemens-CTI, Knoxville, TN, USA)(**Figure 3.3**). Les caractéristiques techniques de ce système sont les suivantes :

- diamètre des anneaux = 82cm
- nombre d'anneaux = 24
- cristaux détecteurs de type BGO ( $2.9 \times 5.9 \times 30 \text{ cm}^3$ )
- nombre de détecteurs par anneau = 784
- résolution spatiale intrinsèque = 4mm



FIG. 3.3 – **Système TEP HR+** du SHFJ



### 3.3 Manipulation des primates

Cette étude a été menée sur trois macaques mâles sains (*macaca fascicularis*, poids moyen 5 kg). L'ensemble des procédures a été conduit en accord strict avec les recommandations de la Communauté Européenne (86/609) et du Comité National Français (87/848) pour l'utilisation et le soin des animaux de laboratoire. Notre objectif étant de comparer quantitativement trois flux métaboliques mesurés à des moments différents à l'aide de trois méthodes distinctes, nous insistons sur le fait qu'il est indispensable de pouvoir contrôler la reproductibilité des expériences, en particulier au niveau de la mise en place, de l'anesthésie et du suivi physiologique des primates.

#### 3.3.1 Positionnement des primates

Il est connu que l'homogénéité du champ statique  $B_0$  joue un rôle critique dans les études de spectroscopie RMN. En effet, les inhomogénéités de  $B_0$  sont à l'origine d'une résolution spectrale dégradée et par conséquent d'une diminution du rapport signal sur bruit. Par conséquent, pour toutes les sessions d'imagerie TEP et RMN, les primates sont maintenus en position du Sphinx i.e. en décubitus ventral, la tête relevée faisant face à l'ouverture arrière du système d'imagerie, et ce à l'aide d'un unique cadre stéréotaxique dédié (**Figure 3.4**). Ce dernier est muni de deux barres d'oreilles et d'un mors à dents permettant de maintenir le primate fixement en trois points. L'utilisation de ce cadre permet de contrôler facilement la reproductibilité de la mise en place et de l'orientation des animaux dans les systèmes d'imagerie. De plus, il a été montré expérimentalement que cette orientation est plus intéressante que la position de décubitus dorsal classique en terme d'homogénéité du champ  $B_0$ . En effet, elle permet de minimiser initialement les perturbations du champ statique dues au cavité d'air (sinus, fosse nasale, canal auditif) et aux tissus externes (peau, graisse, muscles, os)(Valette et al., 2006a), facilitant les procédures de shim réalisées *a posteriori*. Il a ainsi été montré que la dispersion de  $B_0$  à travers le cerveau était diminuée d'un facteur 2 à 3 en position du Sphinx par rapport au décubitus dorsal.



FIG. 3.4 – **Positionnement des primates** Les primates sont maintenus en position du Sphinx à l'aide d'un cadre stéréotaxique dédié

### 3.3.2 Anesthésie

Toujours dans un souci de reproductibilité, la procédure d'anesthésie des primates est identique pour toutes les sessions d'imagerie TEP et RMN. L'induction de l'anesthésie est réalisée par une injection intramusculaire d'un mélange de kétamine ( $15 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) et de xylazine ( $1.5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Une fois l'animal positionné dans le système d'imagerie, l'anesthésie est maintenue par une infusion i.v. continue de propofol (2,6-diisopropylphénol,  $200 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ). Le choix de cet hypnotique présente plusieurs avantages :

- son effet sur le métabolisme cérébral est limité (Vandesteene et al., 1988), ce qui est évidemment primordial dans notre étude ;
- les phases d'induction du sommeil et de réveil sont rapides. Les risques de problèmes respiratoires et/ou cardiaques inhérents à l'anesthésie sont ainsi minimisés ;
- l'utilisation i.v. permet une régulation précise et quasiment en temps réel de la profondeur d'anesthésie.

Durant toutes les sessions d'imagerie, l'animal est également intubé afin de faciliter la ventilation.

### 3.3.3 Suivi physiologique

Le suivi des paramètres physiologiques durant les sessions d'imagerie est primordial car il nous renseigne sur le bien-être de l'animal au cours de l'expérience et nous permet de contrôler et d'adapter en temps réel la profondeur d'anesthésie. Durant les acquisitions

RMN, un système de monitoring Maglife C (Bruker Medical SA, Schiller, Wissembourg, France) compatible avec l'environnement magnétique (jusqu'à 40mT) est utilisé pour le suivi. Au cours des sessions d'imagerie TEP, un système portable (Nonin Medical Inc., Minnesota, USA) est utilisé. Pour toutes les sessions TEP et RMN, les paramètres physiologiques sont donc suivis et maintenus stables dans les gammes physiologiques. La température corporelle est mesurée à l'aide d'une sonde rectale et maintenue autour de 36°C à l'aide d'une couverture chauffante placée sous l'animal. La pression non invasive (PNI), mesurée à l'aide d'un brassard positionné autour du bras, était comprise entre 50 et 60 mmHg. Un ajustement dynamique du taux de perfusion du propofol est effectué afin de maintenir le rythme cardiaque de l'animal entre 90 et 110 pulsations/min, ce qui correspond à un état de sommeil léger. La fréquence respiratoire est mesurée entre 18 et 23 cycles/min et la pression partielle de saturation en  $CO_2$  expiré entre 35 et 40mm Hg.

## 3.4 Volume d'intérêt et sensibilité

### 3.4.1 Choix du volume d'intérêt

Afin de pouvoir effectuer une comparaison sensée des trois flux métaboliques d'intérêt, il est nécessaire de choisir un même volume d'intérêt (VOI) cérébral et de le positionner à l'identique pour toutes les sessions d'imagerie. Dans cette étude, les flux métaboliques ont été mesurés dans un VOI cubique de  $2 \times 2 \times 2 \text{ cm}^3$  (8mL) situé dans la partie centrale haute du cerveau. Le choix de la position du VOI est conditionné par la sensibilité de la sonde RMN  $^{31}\text{P}$ . En effet, le diamètre de celle-ci étant de 4.5 cm, sa sensibilité maximale de détection en réception se situe à une profondeur de 2.25cm. Ainsi, avant chaque session d'imagerie RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^{31}\text{P}$ , une image 3D haute résolution du cerveau (séquence gradient écho, matrice  $128 \times 128 \times 128$ , résolution  $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$ ) a été acquise afin de positionner correctement le VOI. Comme le montre la **Figure 3.5**, le positionnement du VOI peut être effectué de façon précise et reproductible grâce à des repères anatomiques simples. Ainsi, pour chaque primate, toutes les acquisitions RMN ont pu être effectuées dans des VOIs de même volume positionnés à l'identique.

Il est également important de noter que, contrairement à la spectroscopie RMN monovoxel

pratiquée ici, l'imagerie TEP fournit une image de l'ensemble du cerveau. Par conséquent, il a été nécessaire de localiser le VOI de 8mL *a posteriori* sur les images TEP acquises, afin d'extraire le signal provenant uniquement de ce volume. Pour ce faire, une méthode robuste et automatique de recalage rigide des images TEP et des images IRM 3D, développée par Mangin *et al.*, a été utilisée (Mangin et al., 1994). Cette méthode permet localiser précisément le VOI de détection utilisé en IRM et d'extraire, pour chacune des images de l'examen TEP FDG, l'activité tissulaire du  $^{18}\text{F}$ -FDG dans cette région en fonction du temps (cf Chapitre 4).

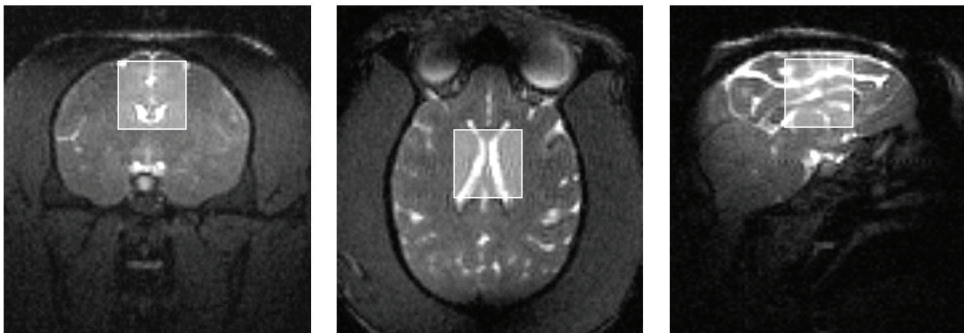


FIG. 3.5 – **Images RMN 3D acquises sur un primate** La position du VOI dans lequel  $CMR_{glc}$ ,  $VTCA$  et  $VATP$  ont été mesurés est présentée en coupe (a) coronale, (b) axiale et (c) sagittale.

### 3.4.2 Sensibilité des différentes méthodes et nombre de sessions

Le but de cette étude a été de mesurer les trois flux métaboliques suivants dans le même voxel d'intérêt (VOI) sur un groupe de trois primates :

- $CMR_{glc}$  par TEP après une injection intra veineuse (i.v.) de  $^{18}\text{F}$ -FDG (temps d'acquisition 1h). Un total de 6 sessions a été conduit (2 par animal).
- $VTCA$  par spectroscopie RMN indirecte du  $^{13}\text{C}$  pendant une infusion i.v. continue de  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$  glucose (temps d'acquisition 2h). Un total de 8 sessions a été conduit (2 à 3 par animal).

–  $V_{ATP}$  par la méthode de transfert de saturation en spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$  (temps d'acquisition 1h40). Un total de 15 sessions a été conduit (4 à 6 par animal).

Il est important de noter que chaque modalité d'imagerie possède une sensibilité qui lui est propre. Ainsi, la mesure de  $V_{TCA}$  par spectroscopie RMN du  $^{13}\text{C}$  est beaucoup moins précise que la mesure de  $CMR_{glc}$  par  $^{18}\text{F}$ -FDG TEP, étant donné la faible sensibilité intrinsèque de la spectroscopie RMN. La mesure de  $V_{ATP}$  est quand à elle encore moins précise que celle de  $V_{TCA}$ , principalement à cause de l'important rapport signal sur bruit requis pour détecter les variations de signal associées à la vitesse de synthèse d'ATP. Notre étude visant à comparer ces trois flux métaboliques, il était indispensable de compenser les différences de sensibilité des trois techniques de neuroimagerie en adaptant le nombre de sessions à mener sur chaque primate. Par conséquent, le plan expérimental a été conçu de telle sorte que la précision finale obtenue sur chaque mesure soit de l'ordre de 20 à 30 %, ce qui explique que le nombre de sessions expérimentales soit variable d'une modalité à l'autre. Le tableau suivant résume le plan expérimental retenu :

Flux mesuré	Modalité d'imagerie	Temps d'acquisition (min)	Sensibilité	Nombre total de sessions
$CMR_{glc}$	$^{18}\text{F}$ -FDG TEP	60	++	6
$V_{TCA}$	$^{13}\text{C}$ MRS	120	+	8
$V_{ATP}$	$^{31}\text{P}$ MRS	100	-	15

TAB. 3.1 – **Plan expérimental** Le nombre total de sessions a été adapté afin de compenser les différences de sensibilité des trois techniques de neuroimagerie. Cette adaptation a permis d'obtenir une précision finale de l'ordre de 15 à 20% sur chaque mesure de flux métabolique.

## Chapitre 4

# Mesure des flux métaboliques cérébraux

Dans ce chapitre, les mesures de  $CMR_{glc}$  par  $^{18}F$ -FDG TEP, de  $V_{TCA}$  par spectroscopie RMN indirecte  $^1H$ - $\{^{13}C\}$  et de  $V_{ATP}$  par spectroscopie RMN du  $^{31}P$  seront décrites successivement. Les mesures de  $CMR_{glc}$  et de  $V_{TCA}$  ayant été détaillées dans des études antérieures, la description faite dans ce chapitre sera relativement succincte. Par contre, la mesure de  $V_{ATP}$  ayant été rapportée dans un nombre limité d'études, cette méthode sera exposée en détails. Nous nous attarderons également sur la méthode originale développée pour la quantification des spectres  $^{31}P$ .

## 4.1 Mesure du flux glycolytique CMR<sub>glc</sub> par <sup>18</sup>F-FDG TEP

### 4.1.1 Matériel et Méthodes

**Anesthésie et suivi physiologique des primates** Le positionnement des primates dans le tunnel et le protocole d’anesthésie réalisés dans cette étude sont ceux décrits au chapitre précédent. L’injection i.v. de <sup>18</sup>F-FDG et la collecte des échantillons de sang artériel au cours de l’examen ont de plus nécessité la pose d’un cathéter veineux dans la veine saphène et d’un cathéter artériel dans l’artère fémorale. Afin de contrôler la stabilité physiologique des primates au cours de l’examen, divers paramètres plasmatiques ont été mesurés avant, 20 minutes après injection de <sup>18</sup>F-FDG et à la fin de l’examen. Ces mesures présentées dans le **Tableau 4.1** présentent peu de variabilité d’un examen à l’autre, confirmant la reproductibilité des expériences effectuées. Pour chaque primate, deux examens TEP FDG ont été conduits.

	T (°C)	$G_0$ (g.L <sup>-1</sup> )	pH	$pCO_2$ (mmHg)	$pO_2$ (mmHg)	$sO_2$ (%)
<i>Pré Injection</i>	35.2 ± 0.6	0.7 ± 0.20	7.4 ± 0.1	39.0 ± 2.8	114 ± 3	98.5 ± 0.7
<i>t = 20min</i>		/	7.4 ± 0.0	/	101 ± 4	98.5 ± 0.0
<i>Post Injection</i>		0.7 ± 0.05	7.4 ± 0.1	40.5 ± 0.7	108 ± 2	98.5 ± 0.0

TAB. 4.1 – **Paramètres physiologiques** Pour chaque session, la température T, la glycémie  $G_0$  et les paramètres issus de l’analyse des prélèvements sanguins (pH sanguin, pression partielle en  $CO_2$  ( $pCO_2$ ) et en  $O_2$  ( $pO_2$ ), saturation en  $O_2$  ( $sO_2$ )) sont mesurées avant, 20 minutes après injection de <sup>18</sup>F-FDG et à la fin de l’examen afin de s’assurer de la stabilité physiologique des animaux.

**Acquisition des images** Une fois le primate positionné dans le tomographe, une image de transmission est réalisée avec une source de <sup>68</sup>Ga-<sup>68</sup>Ge afin d’effectuer les corrections d’atténuation. L’injection i.v. d’un bolus de <sup>18</sup>F-FDG marque le début de l’acquisition. Durant les 60 minutes suivant l’injection, 24 images en émission (63 coupes, matrice matrice 128×128, 4.5mm de résolution intrinsèque) sont acquises. L’activité du résidu de radiotraceur restant dans la seringue d’injection est évaluée afin de déterminer l’activité réelle injectée ( $\approx 2.5$ mCi).

**Fonction d'entrée artérielle** Des échantillons de sang artériel sont collectés toutes les 15 secondes pendant les deux premières minutes d'acquisition, puis à 2.5, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40 et 50 minutes. L'activité de ces échantillons est mesurée à l'aide d'un compteur gamma à calibration croisée (Cobra Quantum D5003, Perkin- Elmer, France), ce qui permet d'évaluer la fonction d'entrée artérielle. Il faut cependant noter que seulement quatre fonctions d'entrée ont pu être évaluées au cours des six sessions TEP étant donné les difficultés expérimentales que présente une telle mesure. Deux fonctions d'entrée ont ainsi pu être mesurées pour un des trois primates, une seule pour les deux autres. Pour les sessions au cours desquelles la fonction d'entrée n'a pu être évaluée, nous avons utilisé la fonction d'entrée mesurée chez le même primate au cours d'une autre session expérimentale.

## 4.1.2 Résultats

**Extraction du VOI et courbe activité-temps** Le VOI d'intérêt cérébral de 8mL a été extrait des séries dynamiques d'images TEP comme décrit au Chapitre 3.4.1 . La **Figure 4.1 (a)** présente en vue coronale, axiale et sagittale les images obtenues après recalage TEP-IRM ainsi que le positionnement du VOI cérébral. Pour chaque examen, la courbe d'activité/temps du <sup>18</sup>F-FDG tissulaire est évaluée dans ce VOI (**Figure 4.1 (b)**).

**Quantification du flux métabolique** Le modèle cinétique utilisé dans notre étude est le modèle cinétique à 3 compartiments décrit dans le Chapitre 1 (Phelps et al., 1979). La fraction vasculaire du VOI a ici été fixée empiriquement à 5% (Boumezbeur, 2005). Connaissant de plus les fonctions d'entrée caractéristiques, les courbes d'activité/temps du <sup>18</sup>F-FDG tissulaire et la glycémie plasmatique, les constantes cinétiques  $k_1^*$ ,  $k_2^*$  et  $k_3^*$  ont été calculées en utilisant l'hypothèse de phosphorylation irréversible. La consommation régionale de glucose *CMR<sub>glc</sub>* a été déterminée pour chaque examen à l'aide d'un module spécialisé du logiciel Pmod (*FDG 2 Tissue Compartment Model*, Pmod Technologies, Zurich, Suisse)(Burger and Buck, 1997). Pour ce faire, la valeur de la LC a été fixée à 0.42 (Boumezbeur et al., 2005). La consommation régionale de glucose *CMR<sub>glc</sub>* moyenne (moyennée sur 8 sessions d'imagerie conduites sur trois primates) a ainsi été évaluée à :



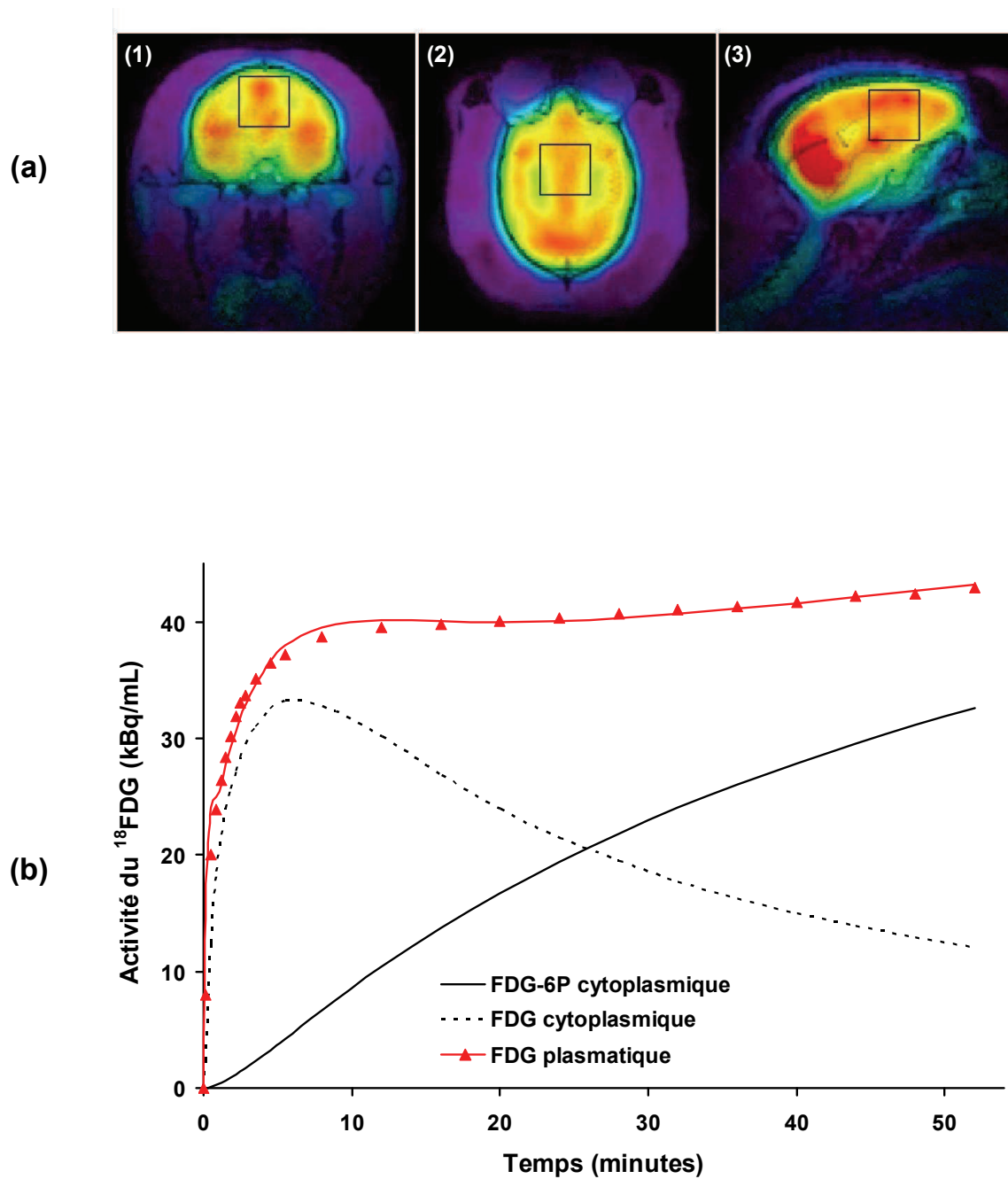


FIG. 4.1 – (a) Recalage d'images echo de gradient 3D et d'images TEP acquises chez un même primate. Le positionnement du VOI dans lequel les flux métaboliques ont été mesurés est présenté en vue (1) coronale, (2) axiale et (3) sagittale. (b) Courbe activité/temps extraite du VOI et meilleur ajustement obtenus au cours d'une session TEP.

$$CMR_{glc} = 0.27 \pm 0.07 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1} \quad (4.1)$$

Les valeurs individuelles sont présentées dans le **Tableau 4.2**.

N° Mac	$CMR_{glc}$ ( $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )
1	0.30
	0.35
2	0.29
	0.17
3	0.28
	0.22
Moyenne	<b>0.27</b>
écart type	<b>0.07</b>

TAB. 4.2 – **Valeurs individuelles de  $CMR_{glc}$**  Les valeurs de  $CMR_{glc}$  ont été déterminées pour chaque session puis moyennées sur les trois primates.

## 4.2 Mesure de la vitesse du cycle de Krebs $V_{TCA}$ par RMN du $^{13}\text{C}$

### 4.2.1 Matériel et Méthodes

**Technique de détection indirecte** Dans cette étude, une technique de détection indirecte du marquage  $^{13}\text{C}$  a été utilisée. Cette technique consiste à détecter, non pas les isotopes  $^{13}\text{C}$  directement, mais les protons couplés à ces noyaux. En effet, la présence d'un noyau  $^{13}\text{C}$  dans une molécule provoque un éclatement des raies associées aux résonances des protons couplés à ce noyau sous l'effet du couplage hétéronucléaire  $J_{CH}$ . Ainsi, l'incorporation de l'isotope  $^{13}\text{C}$  en position C4 puis C3 du glutamate éclate les résonances des protons portés par les carbones C4 et C3. Au fur et à mesure de l'incorporation du  $^{13}\text{C}$  dans le pool de glutamate, le signal des protons liés au  $^{12}\text{C}$  diminue (raie mère) alors que celui des protons liés au  $^{13}\text{C}$  augmente (raies satellites), le rapport des aires (raies satellites)/(raie mère) caractérisant l'enrichissement du glutamate en isotope  $^{13}\text{C}$ . La technique originale utilisée dans cette étude, développée au laboratoire par Boumezbeur *et al.*, tire profit à la fois de l'information apportée par la diminution du signal des protons liés aux  $^{12}\text{C}$  et de celle apportée par l'augmentation du signal des protons liés aux  $^{13}\text{C}$  (Boumezbeur *et al.*, 2004). Brièvement, cette technique consiste à acquérir avant perfusion de glucose marqué au  $^{13}\text{C}$  un spectre  $^1\text{H}$  localisé (PRESS ou STEAM) à TE court considéré comme ligne de base de l'expérience, puis, pendant la perfusion, des spectres  $^1\text{H}$  localisés à intervalle régulier. Les spectres acquis pendant perfusion sont ensuite soustraits au spectre de ligne de base. Les spectres de différence résultant contiennent principalement les résonances du glutamate marqué au  $^{13}\text{C}$ .

*Pour plus de détails concernant cette méthode, se référer à la publication de Boumezbeur et al. (Boumezbeur et al., 2004).*

**Choix de la séquence localisée** Les spectres  $^1\text{H}$  sont collectés à l'aide d'une séquence  $^1\text{H}$  STEAM possédant les paramètres suivants : TE/TM/TR=21/110/2500 ms, 256 répétitions, largeur spectrale 2000Hz, TA=10 minutes. La séquence STEAM a été préférée à la séquence PRESS car elle permet une localisation plus précise, surtout dans le cas d'une

émission avec une antenne de surface. Surtout, le temps de mélange TM du STEAM (pendant lequel la J-modulation du glutamate est négligeable) est mis à profit pour améliorer la suppression de l'eau. La mesure de l'enrichissement du glutamate reposant sur la soustraction du spectre acquis avant perfusion de glucose  $^{13}\text{C}$ , une stabilité quasi-parfaite des acquisitions est requise, ce qui impose une excellente suppression de l'eau.

Cette séquence a de plus été modifiée par l'ajout d'un train d'impulsions de localisation par suppression du volume extérieur OVS (*Outer Volume Suppression*) de type BISTRO (*B1-Insensitive TRain to Obliterate signal*) consistant en 15 modules de puissance croissante (de Graaf et al., 1996). Chacun de ces modules est formé de deux impulsions sécantes hyperboliques double bande permettant la saturation sélective des coupes adjacentes au VOI dans les direction X, Y et Z (Boumezbeur et al., 2005). Un module de suppression de l'eau de type VAPOR a également été ajouté (Tkac et al., 1999). Un exemple de spectre STEAM acquis au cours d'une session est présenté en **Figure 4.2**.

**Protocole d'acquisition** Au début de chaque session de mesure de  $V_{TCA}$ , une image 3D haute résolution est acquise afin de positionner le VOI d'intérêt. La procédure de shim au premier et au second ordre est réalisée à l'aide de l'algorithme FASTMAP (Gruetter, 1993) jusqu'à obtenir une largeur de raie de  $\approx 5$  Hz sur l'eau. Un spectre  $^1\text{H}$  STEAM est ensuite acquis dans le VOI, ce spectre étant par la suite considéré comme la ligne de base avant perfusion. Puis les spectres  $^1\text{H}$  STEAM sont acquis toutes les 10 minutes au cours d'une perfusion continue de glucose uniformément marqué  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$  (à  $t=5/15/25/35/45/55/65/75/85/95/105/115$  min post-injection). Par rapport à du glucose monomarqué en position C1 ou C6, l'utilisation de glucose uniformément marqué permet de doubler l'enrichissement du glutamate. En effet, chaque molécule de glucose étant dégradée en deux molécules de pyruvate, le glucose monomarqué entraîne un marquage à 50% du pyruvate, et donc du glutamate. A noter que du glucose bimarqué en position C1 et C6 aurait marqué de façon identique le glutamate C3 et C4 que l'uniformément marqué, utilisé ici en raison de son moindre coût.

Le protocole de perfusion se décomposait en deux étapes : (i) tout d'abord, un bolus concentré de glucose  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$  était injecté pendant 3 minutes ( $\approx 0.3\text{ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , 20% en volume) afin de tripler la glycémie plasmatique ; puis (ii) une infusion i.v. continue

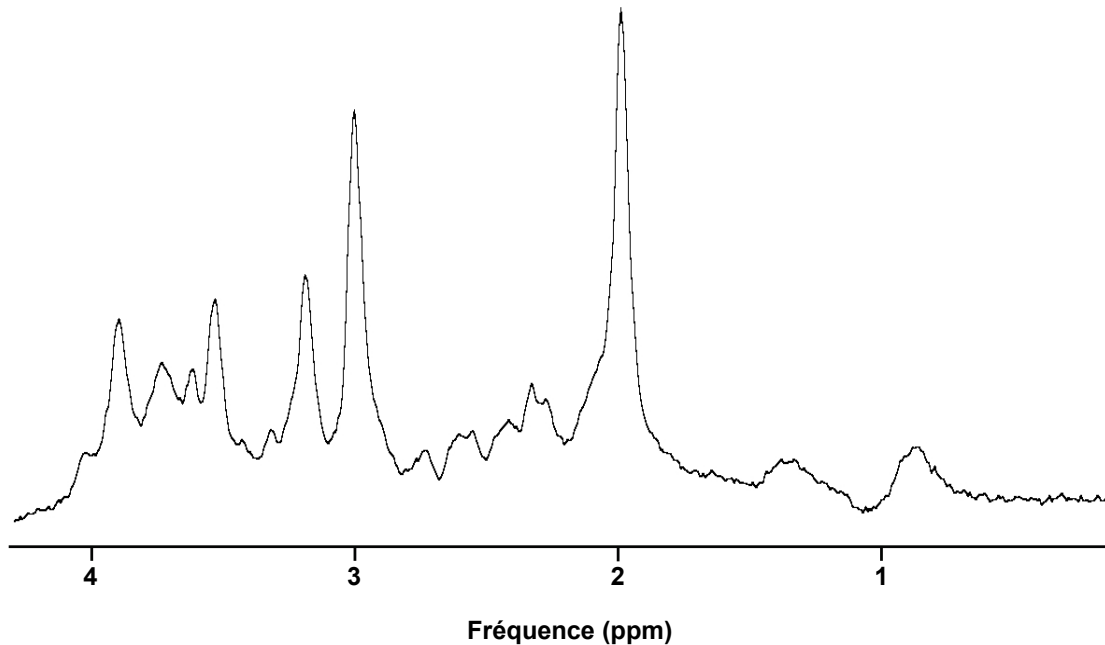


FIG. 4.2 – Spectre STEAM brut acquis sur un primate 5 min post-injection de glucose [U- $^{13}\text{C}_6$ ] (lissage lorentzien 2Hz). Paramètres de séquence : TE/TM/TR=21/110/2500 ms, 256 répétitions, largeur spectrale 2000Hz, TA=10 minutes.

était maintenue pendant 2 heures à un taux plus lent ( $\approx 0.01 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , 20% en volume). Ce protocole d'infusion permet de stabiliser l'enrichissement fractionnel en  $^{13}\text{C}$  du glucose plasmatique autour de 55 à 60% après 5 minutes et ce jusqu'à la fin de l'infusion (Boumezbear et al., 2005). La glycémie plasmatique a été mesurée à l'aide d'un glycomètre One Touch (Lifescan Inc., Milpitas, CA, USA) toutes les 10 minutes, ce qui permettait d'adapter en temps réel le taux d'infusion de glucose afin de maintenir une glycémie stable.

**Choix de la méthode de quantification** Le logiciel Java-based MR User Interface (jMRUI)(Vanhamme et al., 1997) propose plusieurs méthodes de quantification qui se différencient principalement par le nombre de connaissances que l'utilisateur doit fournir *a priori*. Ainsi, HLSVD et LPSVD sont des algorithmes linéaires de quantification nécessitant très peu de connaissances *a priori* ("black boxes"), donc très rapides et opé-

rateurs indépendants. Cependant, ces méthodes ne sont pas assez robustes pour traiter des spectres à faible SNR, mal shimés ou comportant des recouvrements entre résonances. En effet, le nombre élevé de degrés de liberté de ces méthodes leur permet d'aboutir à un résultat correct au niveau mathématique, mais souvent dénué de sens physique. De plus, ces algorithmes ne permettent pas d'effectuer un traitement reproductible de séries de données, aucune de ces méthodes n'autorisant la spécification de contraintes de quantification applicables sur un ensemble de spectres. Au contraire, AMARES (*Advanced Method for Accurate, Robust and Efficient Spectral fitting*, Vanhamme et al., 1997) et QUEST (*QUantitation based on QUantum ESTimation algorithm*, Ratiney et al., 2004) sont deux méthodes de quantification nécessitant de fortes connaissances *a priori*. En particulier, la méthode QUEST est une méthode linéaire de quantification de spectres qui nécessite une base de métabolites préalablement générée (NMRscope sous jMRUI ou NMRsim sous ParaVision). Connaissant les hamiltoniens de chaque métabolite ainsi que la séquence utilisée à l'acquisition, l'utilisateur crée une base contenant les spectres de résonances des métabolites qu'il cherche à quantifier. Puis l'ajustement par QUEST s'effectue par combinaison linéaire des signaux d'induction libre (FID) des métabolites de la base, avec plus ou moins de contraintes supplémentaires à la quantification. Cette méthode nécessite donc de fortes connaissances *a priori* et est surtout utile à la quantification de spectres à faible SNR et/ou comprenant des résonances complexes (massifs, J-modulation, effet de toit...). Les spectres de soustraction possédant à la fois un faible SNR et des massifs de résonance complexes, cette méthode de quantification a été choisie dans notre étude.

**Base QUEST utilisée** Une base originale de spectres  $^1\text{H}$  de différence du glutamate enrichi en position C3 et C4 a été développée et utilisée dans l'algorithme QUEST. Ces spectres de la base, appelés *spectres d'enrichissement*, ont été construits de la manière suivante (pour détails voir Boumezbeur, 2005) :

- une résonance décrivant l'enrichissement du glutamate C4, constituée (i) d'une raie mère correspondant aux protons liés au  $\text{C}^{12}$  située à 2.35ppm et (ii) de deux raies satellites en antiphase éloignées de 65Hz de la raie mère. L'intégrale de la raie mère est égale en valeur absolue à l'intégrale des raies satellites (**Figure 4.3 (b)**).
- une résonance décrivant l'enrichissement du glutamate C3, constituée (i) d'une raie

mère correspondant aux protons liés au  $C^{12}$  située à 2.11ppm et (ii) de deux raies satellites en antiphase éloignées de 65Hz de la raie mère. L'intégrale de la raie mère est égale en valeur absolue à l'intégrale des raies satellites (**Figure 4.3 (c)**).

Les valeurs des fréquences de résonances et des constantes de couplage utilisées pour la simulation des spectres ont été extraites de la littérature (Govindaraju et al., 2000).

## 4.2.2 Résultats

Pour chaque session expérimentale, les spectres acquis pendant l'infusion continue de glucose ont été soustraits au spectre de ligne de base (acquis avant infusion). Les spectres de différence ainsi obtenus ont été moyennés pour chaque temps post injection (5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115 min). La quantification des 12 spectres de différence moyens finaux a été réalisée par la méthode décrite ci-dessus. Un exemple d'ajustement d'un spectre de différence moyen par la base QUEST décrite ci-dessus est présentée en **Figure 4.3**. Outre les contributions des résonances d'enrichissement du glutamate C3 et C4, une faible contribution du glucose  $[U-^{13}C_6]$  (\*), liée à son accumulation dans le tissu, est visible autour de 3.3ppm.

Connaissant les cinétiques d'enrichissement moyennes du glutamate C3 et C4, la vitesse du cycle de Krebs  $V_{TCA}$  a été déterminée à l'aide du logiciel Matlab (The MathWorks Inc., Natick, MA) par un modèle métabolique conventionnel décrivant l'incorporation de l'isotope  $^{13}C$  depuis le glucose plasmatique jusqu'au glutamate (Mason et al., 1992, Henry et al., 2002). La **Figure 4.4 (a)** montre un empilement (*stack plot*) des spectres de différence  $^1H-\{^{13}C\}$ , moyennés sur les 8 sessions  $^{13}C$ , acquis au cours d'une perfusion i.v. de glucose  $[U-^{13}C_6]$ . Les courbes d'enrichissement du glutamate C3 et C4 correspondantes sont présentées en **Figure 4.4 (b)**. Les lignes continues représentent les meilleurs ajustements du modèle métabolique aux données expérimentales. Cette analyse a permis de dériver la valeur de  $V_{TCA}$  suivante :

$$V_{TCA} = 0.63 \pm 0.12 \mu mol.g^{-1}.min^{-1} \quad (4.2)$$

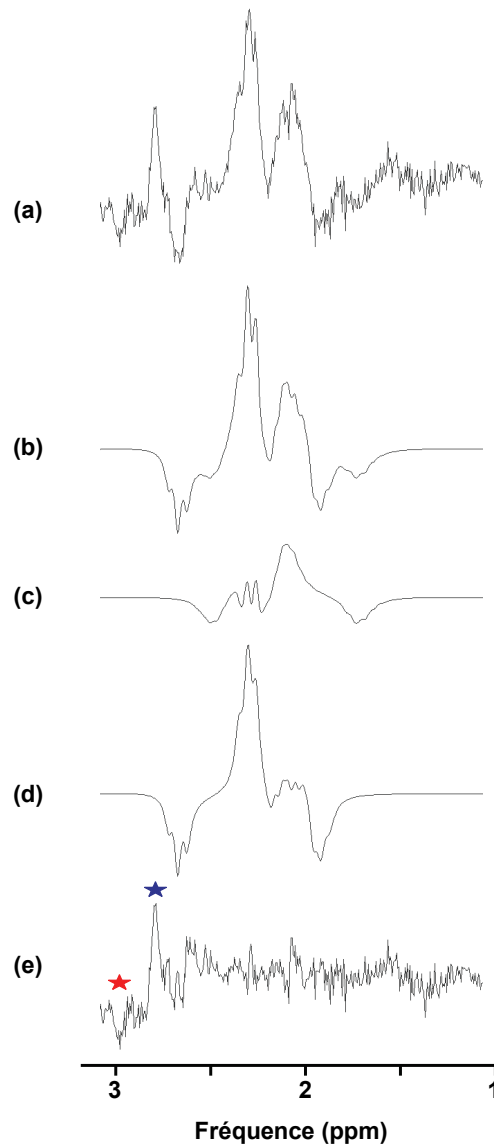


FIG. 4.3 – **Quantification d'un spectre  $^1\text{H}$  de différence** Spectre de différence moyen (a) acquis en fin de perfusion de glucose  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$  ( $t=115\text{min}$ , pas de lissage) et décomposition par jMRUI : (b) Contribution de la résonance d'enrichissement du glutamate C4, (c) Contribution de la résonance d'enrichissement du glutamate C3, (d) Spectre estimé, et (e) Résidu. Une contribution du glucose  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$  (\*), liée à son accumulation dans le tissu, est visible autour de 3.3ppm. Une distorsion du résidu (\*), probablement liée à une erreur de soustraction due à des modifications de phase de la résonance de la créatine, est également visible autour de 3 ppm.



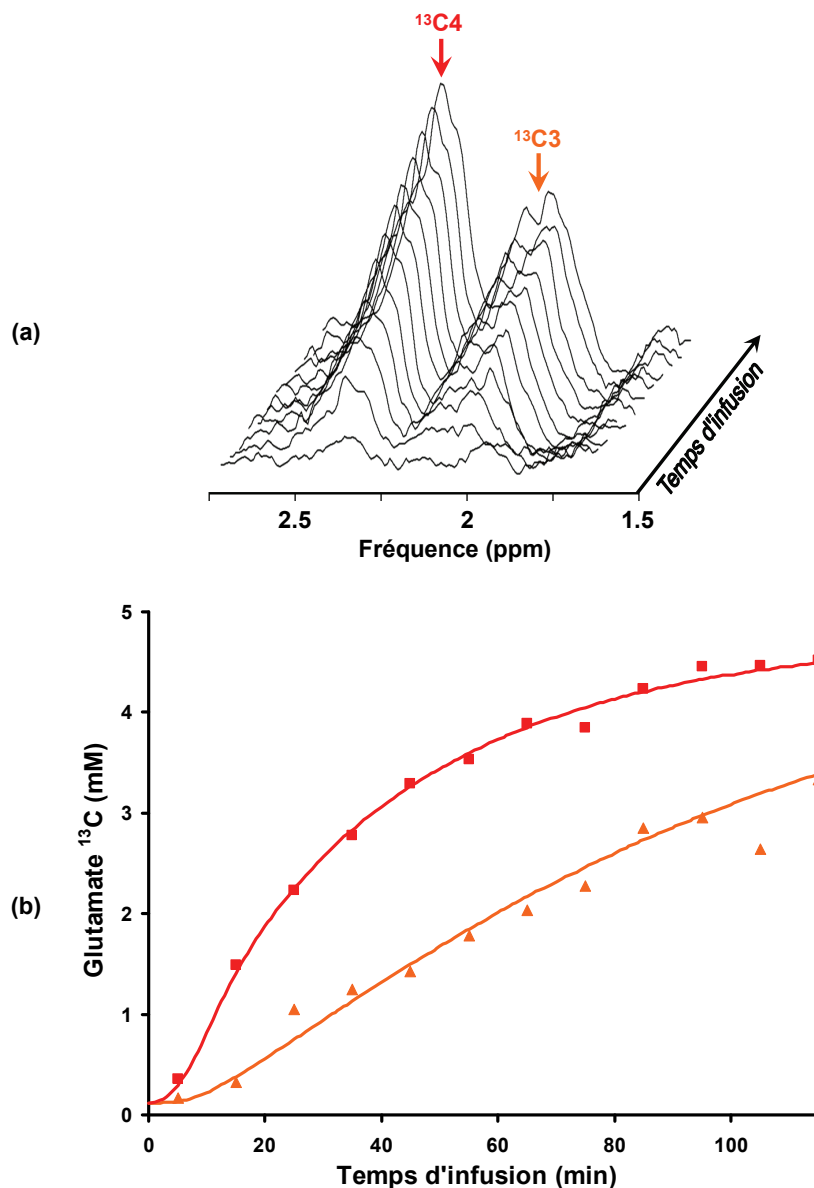


FIG. 4.4 – : (a) Empilement (*stack plot*) des 12 spectres de différence  $^1\text{H}\{-^{13}\text{C}\}$  (moyennés sur les 8 sessions) acquis au cours d'une perfusion i.v. de glucose  $[\text{U}\text{-}^{13}\text{C}_6]$ . Un lissage lorentzien de 5Hz a ici été appliqué. L'incorporation du marquage  $^{13}\text{C}$  dans le pool de glutamate est à l'origine d'une augmentation de l'amplitude des résonances du glutamate C3 et C4 au fur et à mesure que le temps post injection augmente. (b) Courbes d'enrichissement  $^{13}\text{C}$  correspondantes mesurées pour le glutamate C3 (triangle) et C4 (carré). Les lignes continues représentent les meilleurs ajustements du modèle métabolique aux données expérimentales.

## 4.3 Mesure de la vitesse de synthèse d'ATP $V_{ATP}$ par RMN du $^{31}\text{P}$

### 4.3.1 Matériel et Méthodes

**Localisation** Les mesures de synthèse cérébrale d'ATP par transfert de saturation rapportées dans la littérature ont été effectuées sans technique de localisation particulière, le signal étant simplement localisé par la sensibilité de l'antenne. Cependant, dans notre étude, l'épaisse couche de muscle située sur le haut du crâne des primates empêche l'utilisation d'une séquence non localisée, la contamination musculaire au signal  $^{31}\text{P}$  pouvant perturber les mesures de flux. De plus, la logique de l'étude étant de mesurer les trois flux métaboliques dans le même VOI, il était nécessaire d'effectuer une acquisition spectroscopique localisée du signal  $^{31}\text{P}$ . Il existe cependant de nombreux obstacles à la localisation de ce signal :

- Le T2 des noyaux phosphores étant très court (de l'ordre de la dizaine de millisecondes), il est nécessaire d'éviter l'utilisation de localisations par échos, pendant lesquels l'aimantation est basculée dans le plan transverse et relaxe donc rapidement. Ainsi, les séquences de spectroscopie localisées de type STEAM ou PRESS n'apparaissent pas optimales pour une telle mesure (même s'il faut noter que la relaxation T2 est beaucoup moins pénalisante lors d'une localisation STEAM que lors d'une PRESS).
- L'utilisation d'une antenne de surface oblige à appliquer des impulsions adiabatiques afin d'obtenir un angle de bascule homogène dans le VOI. Ainsi, les séquences de localisation de type ISIS nécessiteraient l'application d'un cycle d'impulsions  $180^\circ$  adiabatiques, pendant lesquelles il y aurait une perte de signal par relaxation T2.

**Séquence d'acquisition localisée par OVS** Une méthode de localisation du signal  $^{31}\text{P}$  par suppression du volume extérieur a été utilisée. Cette méthode, développée au laboratoire par Valette *et al.*, consiste à saturer l'aimantation du signal à l'extérieur du volume d'intérêt. Ainsi, aucun signal n'est perdu pendant la localisation, le signal à observer restant non perturbé jusqu'à l'acquisition (Valette *et al.*, 2006a, Valette, 2006). Le module de localisation consiste en une série d'OVS de type BISTRO à 15 puissances croissantes (de Graaf *et al.*, 1996). Pour chaque puissance, le schéma de base excitation-

déphasage est appliqué trois fois (selon les trois axes X, Y et Z). Les impulsions utilisées sont des sécantes hyperboliques double bande. L'intensité des gradients et les durées des impulsions ont été optimisées afin de saturer deux bandes de 3.8 cm d'épaisseur dans chaque direction de part et d'autre du VOI :  $G_x = G_z = 16mT.m^{-1}$ ,  $G_y = 27mT.m^{-1}$ . Ces valeurs de gradient limitent l'artefact de localisation dû au déplacement chimique à 2.3mm dans les directions X et Z, et à 1.5mm dans la direction Y de part et d'autre du VOI (en considérant que la largeur du spectre  $^{31}P$  est de 25ppm). La durée totale du train d'OVS est de 310 ms. L'impulsion d'excitation est une impulsion large bande (*broad pulse* BP, durée  $100\mu s$ ), située immédiatement après les OVS, qui permet l'excitation sélective de l'ensemble de l'aimantation non supprimée.

La séquence utilisée pour la mesure de synthèse d'ATP par transfert de saturation est présentée en **Figure 4.5**.

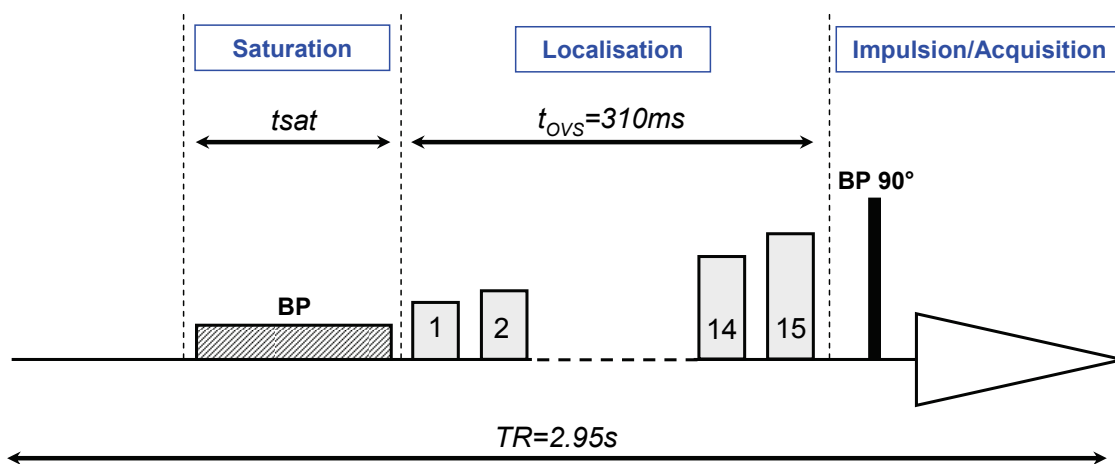


FIG. 4.5 – **Séquence d'acquisition localisée par OVS** Le module de localisation consiste en une série d'OVS de type BISTRO à 15 puissances croissantes (durée des OVS  $t_{OVS}=310ms$ ).

Afin de maximiser le rapport signal sur bruit, un temps de répétition TR court a été choisi ( $TR=2.95s$ ). Ainsi, la relaxation longitudinale des métabolites est incomplète d'une acquisition à l'autre. Cette relaxation est régie par le temps de relaxation dépendant de

l'échange chimique  $T_{1P_i}^{mix}$ . De plus, il faut noter que la technique de localisation par OVS impose que l'impulsion de saturation de l'ATP $\gamma$  soit située avant la localisation (**Figure 4.5**).

Au final, il est donc nécessaire de modifier l'**Equation 6.1** (donnée dans le Chapitre 2) afin de prendre en compte (i) la relaxation longitudinale de l'ATP et du Pi pendant le module de localisation par OVS et (ii) la relaxation longitudinale incomplète d'une acquisition à l'autre (voir Valette, 2006 pour les détails du calcul). Ainsi, l'atténuation finale du Pi  $\frac{M_{zP_i}(tsat)}{M_{zP_i}^{eq}}$  dépend des délais de séquences (paramètres connus), de  $k_f$ ,  $T_{1P_i}^{int}$ ,  $T_{1P_i}^{mix}$  et de  $\theta$ , angle de bascule de l'aimantation après l'impulsion de saturation, selon l'**Equation 4.3.1** :

$$\frac{M_{zP_i}(tsat)}{M_{zP_i}^{eq}} = \frac{\left\{ \begin{aligned} &1 - \exp\left(-\frac{t_{OVS}}{T_{1P_i}^{mix}}\right) + \exp\left(-\frac{t_{OVS}}{T_{1P_i}^{mix}} - \left(k_f + \frac{1}{T_{1P_i}^{int}}\right)tsat\right) - \exp\left(-\frac{TR - tsat}{T_{1P_i}^{mix}} - \left(k_f + \frac{1}{T_{1P_i}^{int}}\right)tsat\right) \\ &+ \frac{\left(k_f + \frac{1}{T_{1P_i}^{int}}\right)}{T_{1P_i}^{int}} \left[ \exp\left(-\frac{t_{OVS}}{T_{1P_i}^{mix}}\right) - \exp\left(-\frac{t_{OVS}}{T_{1P_i}^{mix}} - \left(k_f + \frac{1}{T_{1P_i}^{int}}\right)tsat\right) \right] \end{aligned} \right\}}{1 - \cos\theta \exp\left(-\frac{TR - tsat}{T_{1P_i}^{mix}} - \left(k_f + \frac{1}{T_{1P_i}^{int}}\right)tsat\right)} \times \frac{1 - \cos\theta \exp\left(-\frac{TR}{T_{1P_i}^{mix}}\right)}{1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_{1P_i}^{mix}}\right)}$$

Le temps de relaxation incluant l'échange chimique  $T_{1P_i}^{mix}$  a été déterminé dans une étude antérieure par une méthode d'inversion récupération :  $T_{1P_i}^{mix} = 2.05\text{s}$  (Valette, 2006). L'angle de bascule  $\theta$  a été fixé à  $\theta = 60^\circ$ . Il est important de noter que des simulations Monte Carlo ont montré que la méthode d'ajustement des paramètres  $k_f$  et  $T_{1P_i}^{int}$  s'avère relativement insensible aux variations de  $T_{1P_i}^{mix}$  et de  $\theta$ .

**RF bleedover** L'impulsion utilisée pour saturer l'aimantation de l'ATP  $\gamma$  n'étant jamais parfaitement sélective, elle peut atténuer les résonances des composés ayant des fréquences de résonance proches de celle de l'ATP  $\gamma$ . On parle du phénomène de *RF bleedover*. Pour contrecarrer cet effet, la solution la plus couramment utilisée est la saturation symétrique. Le spectre de référence n'est alors pas un spectre sans saturation mais un spectre acquis lors d'une saturation de durée  $tsat$  égale au spectre saturé mais de fréquence symétrique par rapport à la fréquence de A.

**Acquisitions** Le dispositif expérimental (système RMN, sonde de surface, positionnement des primates) et le choix du VOI sont ceux décrits au chapitre précédent. Au début de chaque session de mesure de  $V_{ATP}$ , une image 3D haute résolution était acquise afin de positionner le VOI d'intérêt. La procédure de shim au premier et au second ordre était réalisée à l'aide de l'algorithme FASTMAP (Gruetter, 1993) jusqu'à obtenir une largeur de raie de  $\approx 8$  Hz sur l'eau. Au vu de la faible sensibilité de la méthode de transfert de saturation, un seul temps de saturation  $tsat$  a été appliqué au cours de chaque session expérimentale. Les 15 sessions expérimentales pouvaient ainsi se diviser comme suit : 4 sessions pour  $tsat=0.5s$ , 3 pour  $tsat=1s$ , 5 pour  $tsat=1.5s$  et 3 pour  $tsat=2s$ . Au cours de chaque session, la fréquence de saturation a tout d'abord été choisie égale à la fréquence de l'ATP $\gamma$  (-7.35ppm par rapport au Pi) et les spectres ont été collectés pour 1 valeur de  $tsat$  (0.5 ; 1.0 ; 1.5 ou 2s). 512 répétitions ont été réalisées pour le temps de saturation choisi. Afin de corriger du RF Bleed Over, la même expérience a été réalisée en ajustant la fréquence de saturation à une fréquence symétrique par rapport au Pi (-7.35ppm par rapport au Pi). Les spectres ont été collectés pour la même valeur de  $tsat$ . Le temps d'acquisition total incluant les procédures de shim était de  $\approx 100$  minutes.

**Analyse par jMRUI** Afin de quantifier les spectres de saturation, une méthode de traitement robuste et reproductible était nécessaire. Les spectres à quantifier possédant des résonances simples (pouvant se décomposer en plusieurs lorentziennes), la méthode de quantification choisie ici est la méthode AMARES (Jensen et al., 2002). Basée sur un algorithme non linéaire de moindres carrés, cette méthode de quantification nécessite trois types de conditions que l'utilisateur doit fixer *a priori* : les valeurs de départ de l'itération (*starting values*), les contraintes sur les résonances (*prior knowledge*) et les contraintes de phase et de pondération de la fid (*overall phases*).

1. **Starting values** Dans cette partie, l'utilisateur définit chaque métabolite à quantifier par son nom, sa fréquence de résonance ainsi que sa largeur de raie à mi-hauteur. Ces valeurs sont les points de départ des itérations de l'algorithme et ne sont en aucun cas assimilés à des contraintes sur la quantification. Dans notre étude, les fréquences de résonance (Delta) ainsi que les largeurs de raies (LW) de chaque lorentzienne intervenant dans la base ont été calculées à partir du T2 et des constantes de couplage J données dans la littérature (Govindaraju et al., 2000, Hamilton et al.,

2003b). L'ensemble des résonances composant la base est présenté dans le **Tableau 4.3**.

2. **Prior knowledge** Cette étape est la plus délicate. En effet, dans cette partie, l'utilisateur peut définir pour chaque résonance quelles sont les contraintes qu'il impose et quels sont les paramètres qu'il laisse fluctuer. Pour chaque métabolite préalablement défini, cinq paramètres sont susceptibles d'être ou non contraints :
- l'amplitude de la résonance
  - la phase relative
  - la largeur de raie à mi- hauteur
  - la fréquence de résonance
  - la forme de raie (gaussienne ou lorentzienne). Dans notre étude, toutes les raies sont imposées lorentziennes.

La difficulté de la quantification est de trouver le bon équilibre entre contraintes *a priori* imposées par l'utilisateur et degrés de liberté laissés à l'algorithme. En effet, des contraintes trop souples aboutissent la plupart du temps à un résultat physiquement aberrant bien que mathématiquement correct (résidu très faible). Au contraire, de trop fortes contraintes empêchent l'algorithme de prendre en compte les faibles variations de signal (décalage en fréquence, variation d'amplitude ou de largeur de raie) qui contiennent la plupart du temps l'information que l'on souhaite visualiser. Ainsi, les différentes contraintes ont été optimisées afin d'obtenir la quantification la plus stable possible. En premier lieu, des contraintes fortes ont été appliquées sur les amplitudes  $Amp$  des métabolites à résonance multiple afin de respecter la structure des doublets et triplets correspondants :

$$Amp[DPG](1) = Amp[DPG](2) \quad (4.3)$$

$$Amp[ATP\gamma](1) = Amp[ATP\gamma](2) \quad (4.4)$$

$$Amp[ATP\alpha](1) = Amp[ATP\alpha](2) \quad (4.5)$$

$$Amp[ATP\beta](1) = Amp[ATP\beta](3) \quad (4.6)$$

$$= 1/2 \times Amp[ATP\beta](2) \quad (4.7)$$

Ensuite, afin de garantir la reproductibilité de la quantification du massif situé

autour du Pi, des ratios empiriques ont été imposés de façon rigide :

$$Amp[PSer] = 0.35 \times Amp[PE] \quad (4.8)$$

$$Amp[MP] = 1.2 \times Amp[GPC] \quad (4.9)$$

$$Amp[GPE] = 0.65 \times Amp[GPC] \quad (4.10)$$

Concernant les paramètres de phase relative, la phase de la résonance de la PCr est estimée par l'algorithme et sert de référence. En d'autres termes, la phase relative des autres métabolites a été imposée de façon rigide par rapport à la phase de la PCr (**Tableau 4.3**). Le choix de la PCr comme référence de phase vient du fait que la résonance de ce métabolite est la plus importante en amplitude et la plus fine en terme de largeur de raie. La détermination de sa phase en est donc facilitée.

Pour les mêmes raisons que pour les contraintes de phase, la PCr est également prise comme référence pour définir les largeurs de raies. L'algorithme estime ainsi la largeur de raie de la PCr, toutes les autres largeurs de raies étant déduites de cette valeur (**Tableau 4.3**). Cette approche permet d'imposer à tout le spectre un shim constant, déterminé par l'estimation de la largeur de la PCr.

Enfin, toutes les fréquences de résonances sont également fixées par rapport à la fréquence de résonance estimée de la PCr. Cependant, les contraintes appliquées ici sont des contraintes souples, c'est-à-dire autorisant de faibles variations des fréquences de résonance, ce qui est primordial pour prendre en compte les variations de pH en particulier.

3. **Overall phases** A cette étape sont définis des paramètres concernant le spectre dans son ensemble, à savoir les phases d'ordre zéro et un, ainsi que des paramètres de traitement de la FID. Ces derniers sont utiles dans le cas de la quantification de spectres à ligne de base importante. En effet, AMARES ne prend pas en compte l'existence d'une ligne de base dans son algorithme, c'est-à-dire que l'itération est telle que le résidu tende vers zéro. Ceci est problématique dans le cas d'un spectre présentant une contribution importante des macromolécules, non modélisable par une lorentzienne simple, qui distord la ligne de base. Pour palier le problème des composantes larges, deux alternatives sont proposées :

- La première est de tronquer les premiers points de la FID, qui contiennent le signal des macromolécules, avant de quantifier les métabolites, puis à réintégrer

le signal de ces premiers points au signal traité. C'est ce que permet la fonction *Truncated points*.

- La seconde consiste à pondérer les premiers points de la fid par une *quarter-sine wave* avant la quantification : c'est la fonction *Weighting*.

Bien que très pratiques, ces méthodes ont des inconvénients majeurs. En effet, le weighting peut entraîner des variations d'amplitude des signaux allant jusqu'à 20% et donc des biais de quantification. La troncature des premiers points peut quand à elle entraîner une perte d'informations de valeur.

Dans la base décrite dans cette étude, la phase d'ordre zéro est estimée par l'algorithme, la phase d'ordre 1 est fixée empiriquement à zéro. Le weighting n'est pas utilisé ici car il introduit des biais de quantification. Par contre, afin de quantifier les spectres acquis en transfert de saturation, la procédure de troncature est ici utilisée. En effet, l'allure de la ligne de base des spectres  $^{31}\text{P}$  acquis lors d'une saturation de l'ATP $\gamma$  est similaire à celle des spectres acquis lors d'une saturation symétrique (**Figure 4.6**). Par conséquent, les composantes larges de ces deux types de spectres sont atténuées de la même manière par la procédure de troncature. Aucun biais de quantification n'est donc introduit.

Préalablement à la quantification, un zero-filling de 2048 points a été appliqué à tous les spectres  $^{31}\text{P}$ .

### 4.3.2 Résultats

Les spectres  $^{31}\text{P}$  ont été normalisés et moyennés pour chaque temps de saturation. La **Figure 4.6** présente les spectres moyens obtenus pour un temps de saturation de  $tsat=2s$ .

Les 8 spectres moyens obtenus (4 saturés sur l'ATP  $\gamma$  et 4 saturés à la fréquence symétrique) ont été quantifiés par la base développée sous AMARES. Un exemple de spectre  $^{31}\text{P}$  ( $tsat=2s$ , saturé à la fréquence symétrique) quantifié par la base AMARES précédemment décrite est présenté en (**Figure 4.7**).

L'atténuation du Pi  $\frac{M_{zPi}(tsat)}{M_{zPi}^{eq}}$  a été calculée pour chaque temps de saturation comme le rapport de l'aire de la résonance du Pi lors de la saturation de l'ATP $\gamma$  sur l'aire de la



	Métabolite	Abbréviation	Multiplicité
(a)	Phosphoétanolamine	PE	S
	Phosphosérine	PSer	S
	Phosphocholine	PC	S
	2,3-diphosphoglycérate	DPG	D
	Phosphate inorganique	Pi	S
	Glycophosphoétanolamine	GPE	S
	Glycophosphocholine	GPC	S
	Phospholipides membranaires	MP	S
	Phosphocréatine	PCr	S
	Adénosine Triphosphate $\gamma$	ATP $\gamma$	D
	Adénosine Triphosphate $\alpha$	ATP $\alpha$	D
	Nicotinamide Adenine Dinucléotide	NAD	S
	Adénosine Triphosphate $\beta$	ATP $\beta$	T

	Métabolite	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (Hz)	LW (ppm)	LW (Hz)	LW-PCr(Hz)	$\phi$ (deg)
(b)	PE	6.8	344.42	0.35	17.82	8.17	10.2
	PSer	6.49	328.72	0.32	16.32	6.67	9.74
	PC	6.2	314.03	0.35	17.66	8.01	9.3
	DPG (1)	5.23	264.9	0.15	7.72	-1.93	7.85
	DPG (2)	5.71	289.21	0.15	7.72	-1.93	8.57
	Pi	4.8	243.12	0.37	18.76	9.11	7.2
	GPE	3.5	177.28	0.4	20.26	10.61	5.25
	GPC	2.9	146.89	0.4	20.26	10.61	4.35
	MP	2.25	113.96	1.62	82	72.35	3.38
	PCr	0	0	0.19	9.65	0	0
	ATP $\gamma$ (1)	-2.38	-120.8	0.36	18.04	8.39	-3.58
	ATP $\gamma$ (2)	-2.68	-135.8	0.36	18.04	8.39	-4.02
	ATP $\alpha$ (1)	-7.33	-371.26	0.37	18.65	9	-11
	ATP $\alpha$ (2)	-7.71	-390.51	0.37	18.65	9	-11.57
	NAD	-8.37	-423.94	0.42	21.22	11.57	-12.56
	ATP $\beta$ (1)	-16.03	-811.92	0.42	21.05	11.4	-24.05
	ATP $\beta$ (2)	-16.26	-823.57	0.39	19.85	10.2	-24.39
	ATP $\beta$ (3)	-16.49	-835.22	0.42	21.05	11.4	-24.74

TAB. 4.3 – (a) S=singulet, D=doublet, T=triplet. (b) Les fréquences de résonance ( $\delta$ ) ainsi que les largeurs de raies (LW) de chaque lorentzienne intervenant dans la base ont été calculées à partir du T2 et des constantes de couplage J données dans la littérature (Govindaraju et al., 2000). Pour chaque résonance, une phase relative  $\phi$  (par rapport à la Pcr) a également été calculée connaissant les déplacements chimiques de chaque métabolite et supposant une phase d'ordre 1 de 1.5deg/ppm correspondant au délai entre l'impulsion d'excitation et le premier point d'échantillonnage.

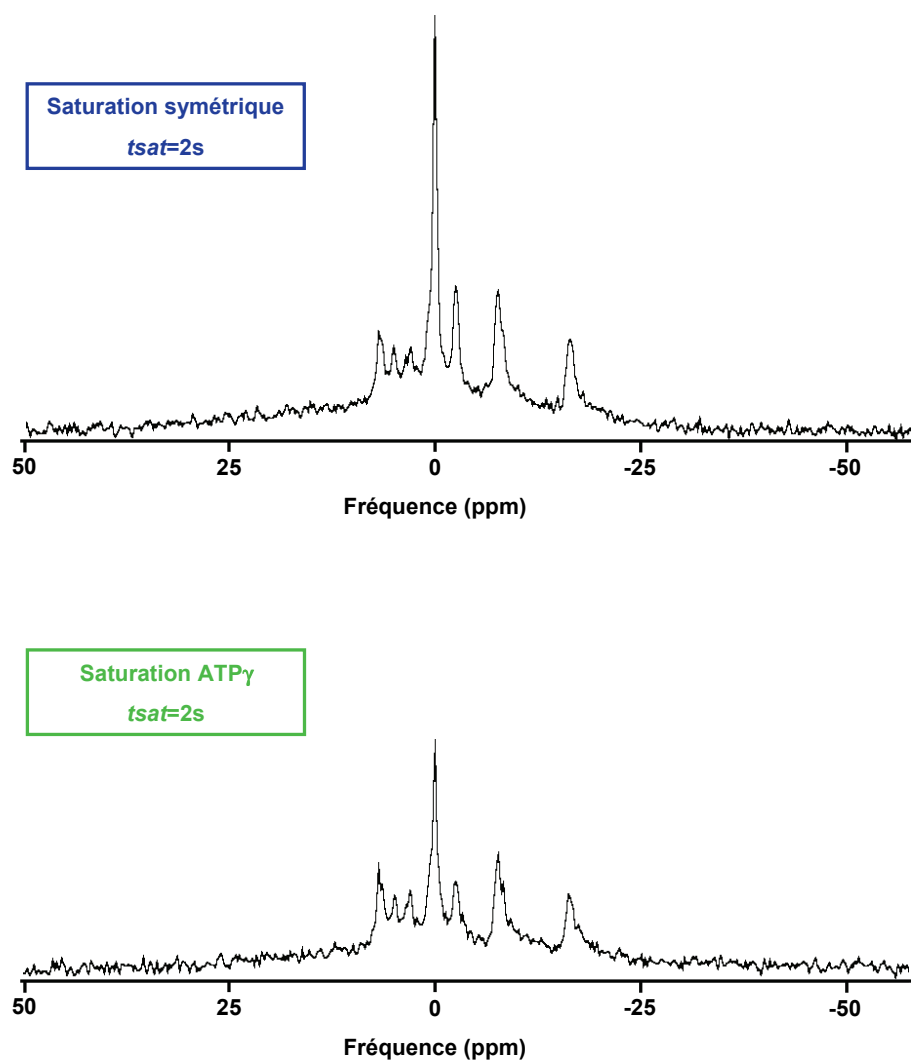


FIG. 4.6 – Spectres  $^{31}\text{P}$  Spectres moyens obtenus pour le temps de saturation  $t_{sat}=2s$  (lissage lorentzien 10Hz)

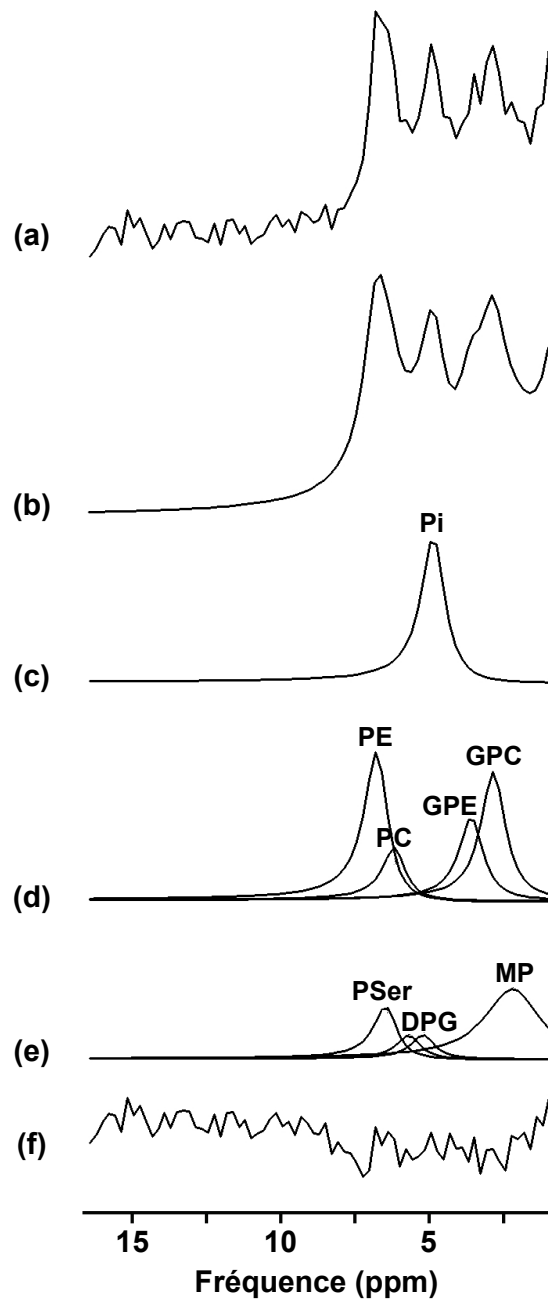


FIG. 4.7 – **Quantification par AMARES d'un spectre  $^{31}\text{P}$  cérébral** Spectre brut (a) acquis par la méthode de transfert de saturation ( $t_{sat}=2\text{s}$ , saturation symétrique) acquis chez un primate. Décomposition utilisant la base dédiée sous AMARES : (b) Spectre estimé, (c) Résonance du Pi, (d) Résonances de PE, PC, GPE et GPC, (e) Résonances de la PSer, du DPG et des MP. Pour plus de clarté, seule la région du Pi a été représentée.

résonance du Pi lors de la saturation symétrique. La courbe d'atténuation du Pi  $\frac{M_{zPi}(tsat)}{M_{zPi}^{eq}}$  fonction du temps de saturation  $tsat$  a ensuite été ajustée selon l'équation de Bloch modifiée précédemment décrite (**Figure 4.8**) (Valette, 2006). L'ajustement, effectué sous le logiciel Matlab (The MathWorks Inc., Natick, MA), a permis de dériver simultanément les paramètres d'intérêt  $k_f$  et  $T_{1Pi}^{int}$ . Afin d'éviter les divergences lors de l'ajustement, des contraintes souples ont été imposées pour la détermination de  $k_f$  et  $T_{1Pi}^{int}$  :  $0 < k_f < 1$  et  $0 < T_{1Pi}^{int} < 5$ . La précision de mesure de ces deux paramètres a été évaluée par simulation Monte Carlo (N=1000 itérations). Ces ajustements ont permis de déterminer les valeurs suivantes :

$$k_f = 0.10 \pm 0.03s^{-1} \quad (4.11)$$

$$T_{1Pi}^{int} = 2.1 \pm 0.4s^{-1} \quad (4.12)$$

La densité cérébrale ayant été fixée à 1g/mL et la concentration en [Pi] à [Pi]=1.3mM d'après la littérature (Jensen et al., 2002, Hamilton et al., 2003b, Boska, 1994, Doyle et al., 1997, Hetherington et al., 2001, Potwarka et al., 1999), la vitesse de synthèse d'ATP  $V_{ATP}$  a ensuite évaluée par l'équation  $V_{ATP} = k_f[Pi]$  :

$$V_{ATP} = 7.8 \pm 2.3\mu mol.g^{-1}.min^{-1} \quad (4.13)$$

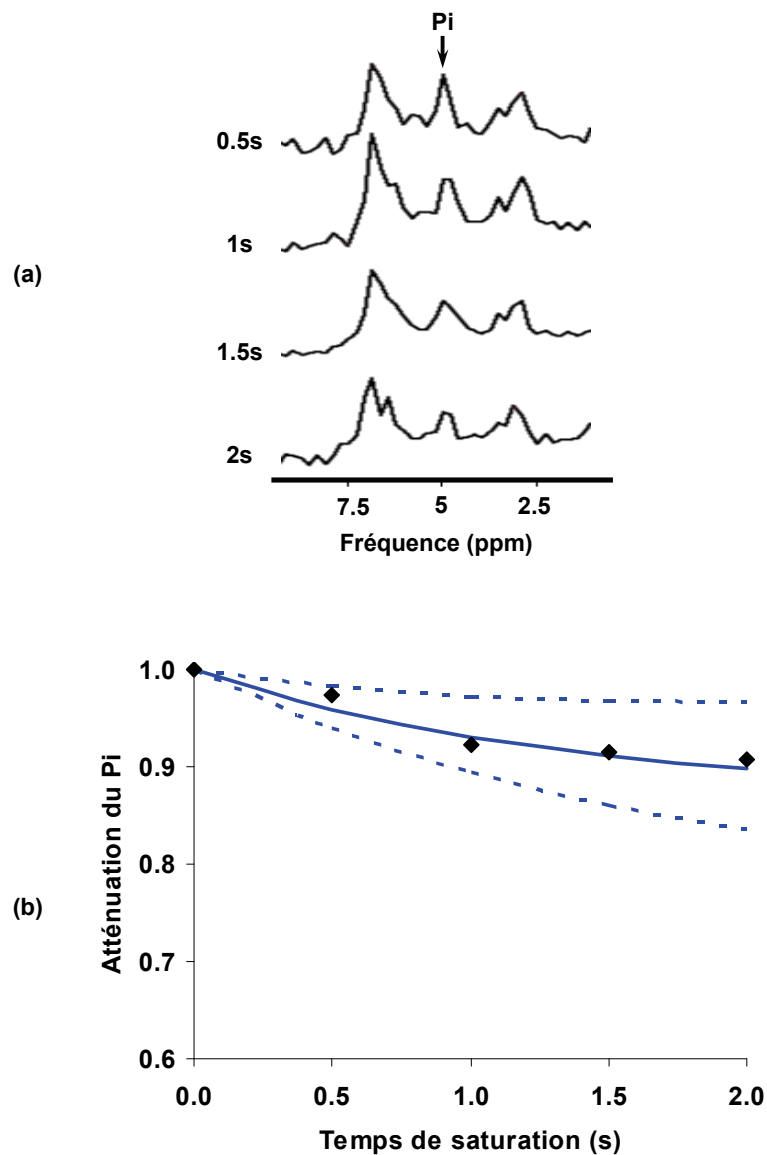


FIG. 4.8 – (a) Spectres  $^{31}\text{P}$  acquis en présence de saturation de l'ATP $\gamma$  pour les 4 temps de saturation (0.5, 1.0, 1.5 et 2s). Seule la région du Pi est ici représentée, montrant une diminution de l'amplitude du Pi lorsque le temps de saturation augmente. (b) Atténuation du Pi  $\frac{M_{z\text{Pi}}(tsat)}{M_{z\text{Pi}}^{eq}}$  fonction du temps de saturation  $tsat$ . Les losanges représentent les points expérimentaux, la ligne continue le meilleur ajustement aux données expérimentales et les lignes pointillés les limites inférieures et supérieures de l'ajustement déterminées par simulation Monte Carlo.

# Chapitre 5

## Validation de la méthode de transfert de saturation et évaluation du rendement énergétique cérébral

### 5.1 Cohérence des flux mesurés

#### 5.1.1 Cohérence avec la littérature

Analysés indépendamment, les flux  $CMR_{glc}$  et  $V_{TCA}$  mesurés dans cette étude apparaissent hautement cohérents avec les mesures métaboliques rapportées dans la littérature dans le cerveau de mammifères anesthésiés ( $0.2$  à  $0.4 \mu mol.g^{-1}.min^{-1}$  pour  $CMR_{glc}$ ,  $0.5$  à  $0.8 \mu mol.g^{-1}.min^{-1}$  pour  $V_{TCA}$ ) (Boumezbeur et al., 2004, Boumezbeur et al., 2005, Noda et al., 2002, Shulman et al., 2004, Henry et al., 2002). Plus particulièrement, les valeurs rapportées sont en accord avec les valeurs mesurées par Boumezbeur *et al.* dans le cerveau de primate ( $CMR_{glc} = 0.23 \pm 0.03 \mu mol.g^{-1}.min^{-1}$ ;  $V_{TCA} = 0.53 \pm 0.13 \mu mol.g^{-1}.min^{-1}$ ). Les faibles différences entre ces deux ensembles de valeurs pourraient être expliquées par des différences de positionnement des VOI, et par conséquent par une contribution différente des matières grise et blanche aux flux détectés (Mason et al., 1999). La mesure de  $V_{ATP}$  rapportée dans ce manuscrit est la première mesure localisée réalisée dans le cerveau de primate. Comparée à la mesure de  $V_{ATP}$  réalisée dans le cerveau humain (Lei et al., 2003a), la valeur mesurée dans cette étude est sensiblement plus faible ( $7.8 \pm 2.3 \mu mol.g^{-1}.min^{-1}$  vs.  $12.1 \pm 2.8 \mu mol.g^{-1}.min^{-1}$ ), ce qui paraît cohérent avec le ra-

lentissement métabolique observé dans le cas d'animaux anesthésiés comparé à un humain éveillé (Shen et al., 1999, Gruetter et al., 2001).

### 5.1.2 Compartimentation du métabolisme énergétique

A ce stade, il pourrait être intéressant d'examiner les possibles contributions des populations gliales et neuronales aux flux détectés. Selon de nombreuses études antérieures (Pellerin and Magistretti, 1994, Pellerin and Magistretti, 2003, Véga et al., 2003), la capture du glucose plasmatique et la glycolyse sembleraient se dérouler préférentiellement dans les cellules gliales, en particulier en conditions d'activation. Ce phénomène serait à l'origine d'une importante production de lactate utilisé en aval par les neurones comme substrat énergétique majoritaire (pour revue voir Pellerin and Magistretti, 2003, Pellerin and Magistretti, 2004). Par conséquent, il serait tentant d'attribuer le flux de consommation de glucose  $CMR_{glc}$  à la population gliale majoritairement. D'un autre côté, considérant le fait que la capture d'oxygène semble être principalement neuronale (Attwell and Laughlin, 2001, Gruetter et al., 2001, Lebon et al., 2002), que le glutamate est plus concentré dans les neurones que dans la glie et que la technique de mesure de  $V_{TCA}$  est basée sur la détection du marquage des molécules de glutamate, le flux détecté  $V_{TCA}$  pourrait être attribué principalement à la population neuronale. Cependant, au vu de la complexité du couplage neurone/glie, il est en réalité très difficile d'évaluer les contributions relatives des différentes populations cellulaires cérébrales aux flux détectés. Les hypothèses réalisées au cours de cette analyse doivent par conséquent être manipulées avec précaution. Enfin, l'attribution du flux  $V_{ATP}$  à une population cellulaire est encore plus complexe. Comme explicité dans le Chapitre 1, il semblerait que la méthode de transfert de saturation permette de mesurer majoritairement la synthèse nette d'ATP produite par le métabolisme oxydatif neuronal. Cependant, là encore, cette hypothèse est fragile et doit être considérée comme telle.

### 5.1.3 Couplage glycolyse/cycle de Krebs

Dans cette étude, le rapport des flux [ $V_{TCA}/CMR_{glc}$ ] est égal à 2.3. D'un point de vue biochimique, ce rapport reflète le couplage métabolique entre glycolyse et cycle de Krebs.

Sous l'hypothèse que le glucose est l'unique substrat énergétique du cycle de Krebs, le rapport  $[V_{TCA}/CMR_{glc}]$  devrait être égal à 2, puisqu'au cours de la glycolyse, la dégradation d'une molécule de glucose permet la création de deux molécules de pyruvate. Cependant, il faut noter que la détection de  $V_{TCA}$  par infusion de glucose  $[U-^{13}C_6]$  inclut la contribution de tous les substrats énergétiques permettant la synthèse d'acétyl-CoA. Par conséquent, un rapport  $[V_{TCA}/CMR_{glc}]$  supérieur à 2 plaide en faveur d'une contribution d'autres voies métaboliques au cycle de Krebs. En particulier, la voie métabolique qui pourrait avoir une contribution non négligeable est la voie des acides gras, au cours de laquelle la dégradation d'acides gras, couplée à l'hydrolyse d'ATP, pourrait fournir des molécules d'acétyl-CoA entrant directement dans le cycle de Krebs. Ainsi, il serait tentant de compléter le modèle métabolique en introduisant un nouveau flux  $CMR_{FA}$ , défini par l'équation (**Figure 5.1**) :

$$\begin{aligned} CMR_{FA} &= V_{TCA} - 2CMR_{glc} \\ &= 0.09 \mu mol.g^{-1}.min^{-1} \end{aligned} \quad (5.1)$$

La mise en évidence d'une consommation cérébrale d'acide gras en conditions physiologiques normales plaide en faveur d'un tel flux (Lebon et al., 2002, Ebert et al., 2003). Il convient toutefois de modérer cette contribution en raison de l'incertitude de nos mesures. Le flux  $CMR_{FA}$  estimé ici contribuerait pour  $\approx 15\%$  au cycle de Krebs. Or les flux métaboliques mesurés directement ( $CMR_{glc}$  et  $V_{TCA}$ ) présentent des écarts-types d'environ 20%.

## 5.2 Validation de la mesure de $V_{ATP}$

La connaissance des valeurs mesurées de  $CMR_{glc}$  et  $V_{TCA}$  permet d'évaluer la valeur de la vitesse de synthèse d'ATP théorique  $V_{ATP}^{TH}$  correspondante. Pour ce faire, il suffit d'évaluer (i) la production directe de molécules d'ATP le long de la glycolyse et du cycle de Krebs, (ii) la production indirecte d'ATP i.e. la production d'équivalents réducteurs le long de la glycolyse et du cycle de Krebs, et finalement (iii) la faible consommation de molécules d'ATP par la voie des acides gras. Il est connu que la dégradation d'une molé-



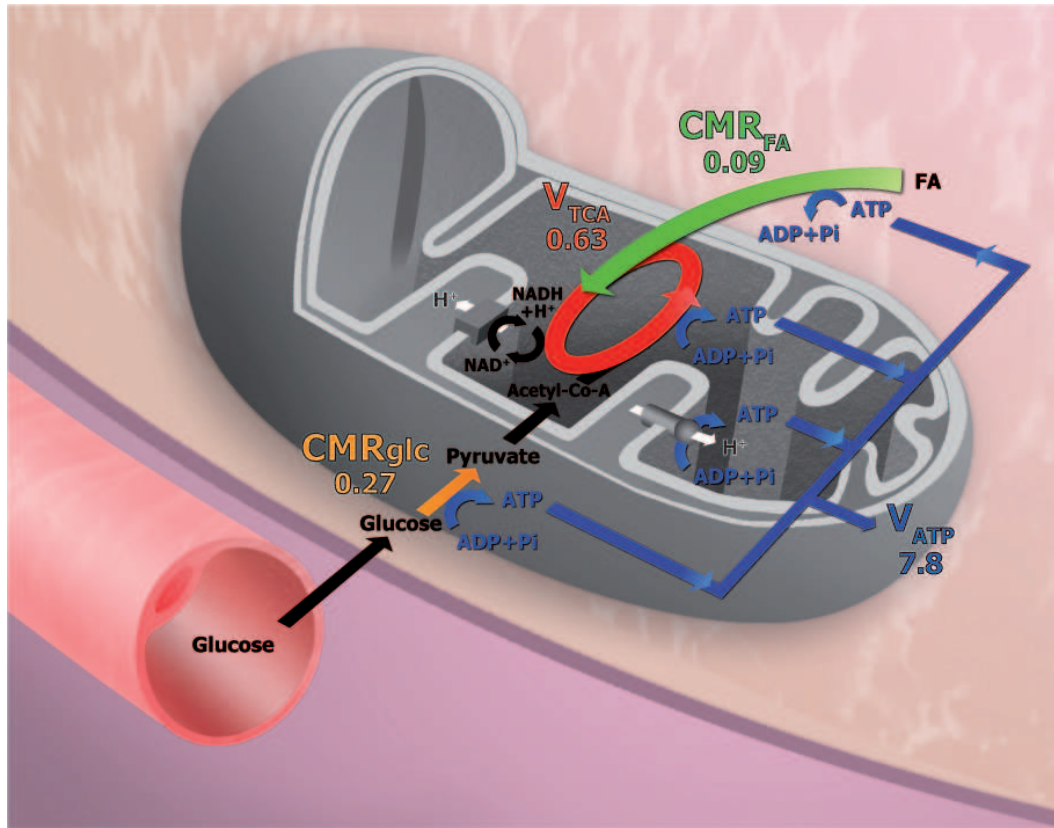


FIG. 5.1 – Mitochondrie et flux métaboliques détectés. Les trois flux métaboliques mesurés lors de cet étude ( $CMR_{glc}$ ,  $V_{TCA}$  et  $V_{ATP}$ ) sont ici représentés. En conditions physiologiques normales, la transformation du glucose au cours de la glycolyse puis du cycle de Krebs devrait être couplé stoechiométriquement à la synthèse d'ATP cérébral.

culé de glucose au cours de la glycolyse permet de produire deux molécules de pyruvate, deux molécules d'ATP, et deux molécules de  $NADH, H^+$  *a posteriori* transformées en  $FADH_2$  lors du passage de la membrane mitochondriale. Par la suite, chaque molécule de pyruvate est convertie en acétyl-CoA dans la matrice mitochondriale, libérant deux molécules de  $NADH, H^+$ . Sous l'hypothèse que toutes les molécules de pyruvate produites par la glycolyse soient converties en acétyl-CoA entrant dans le cycle de Krebs, la vitesse de cette réaction de conversion peut être prise égale à  $CMR_{glc}$ . Enfin, au cours du cycle de Krebs, la dégradation de chaque molécule d'acétyl-CoA permet la production d'une molécule d'ATP, de trois molécules de  $NADH, H^+$  et d'une molécule de  $FADH_2$ . Finalement, la vitesse de synthèse d'ATP théorique  $V_{ATP}^{TH}$  correspondante peut être exprimée par l'Equation 5.3 :

$$V_{ATP}^{TH} = (2(P/O)_{NADH,H^+} + 2(P/O)_{FADH_2} + 2)CMR_{glc} + (3(P/O)_{NADH,H^+} + (P/O)_{FADH_2} + 1)V_{TCA} - CMR_{FA} \quad (5.2)$$

où  $(P/O)_{NADH,H^+}$  et  $(P/O)_{FADH_2}$  représentent le nombre de molécules d'ATP par atome d'oxygène produites lors de la dégradation d'une molécule de  $NADH, H^+$  et  $FADH_2$  par la chaîne respiratoire, respectivement. Afin d'évaluer  $V_{ATP}^{TH}$ , il est nécessaire de connaître les valeurs de  $(P/O)_{NADH,H^+}$  et  $(P/O)_{FADH_2}$ . Cependant, la détermination de ces valeurs a fait l'objet de nombreuses discussions (voir Hinkle, 2005 pour revue) :

- (a) Les premières études de ces rapports  $(P/O)$  ont été effectuées dans les années 40 et rapportent les valeurs de  $(P/O)_{NADH,H^+} = 3$  et  $(P/O)_{FADH_2} = 2$ . Ces valeurs sont encore données dans beaucoup de livres de biochimie.
- (b) Des études plus récentes ont rapporté des valeurs de  $(P/O)_{NADH,H^+} = 2.5$  et  $(P/O)_{FADH_2} = 1.5$ .
- (c) Une nouvelle étude de la structure de l'ATP synthase suggère que les valeurs des rapports  $(P/O)$  seraient des valeurs fractionnaires  $(P/O)_{NADH,H^+} = 2.3$  et  $(P/O)_{FADH_2} = 1.4$  (Stock et al., 1999).

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre de ce manuscrit, il faut noter que les valeurs extraites de l'étude menée par Stock *et al.*, basées sur la modélisation du phénomène de translocation, sont actuellement considérées comme les valeurs les plus fiables (Stock et al., 1999, Hinkle, 2005).

	$(P/O)_{NADH,H^+}$	$(P/O)_{FADH_2}$	$V_{ATP}$
(a)	3	2	$10.7 \pm 2.3$
(b)	2.5	1.5	$8.9 \pm 1.9$
(c)	2.3	1.4	$8.3 \pm 1.8$

TAB. 5.1 – Vitesses de synthèse d'ATP dérivées des mesures expérimentales de  $CMR_{glc}$  et  $V_{TCA}$  ( $0.27 \pm 0.07$  et  $0.63 \pm 0.12$ ) et des trois couples de rapports  $(P/O)$  les plus fréquemment rencontrés dans la littérature. La valeur de  $V_{ATP}$  dérivée des rapports  $(P/O)$  les plus récents (2.3 et 1.4) est très proche de notre mesure expérimentale de  $V_{ATP}$  ( $7.8 \pm 2.3$ ).

Le **Tableau 5.1** présente les valeurs des vitesses de synthèse d'ATP dérivées de la connaissance de  $CMR_{glc}$  et  $V_{TCA}$  et calculées en utilisant l'**Equation 5.3** pour les trois couples de

valeurs des rapports ( $P/O$ ) énumérées ci-dessus (**Tableau 5.1 (a) (b) (c)**). Ce tableau montre que la valeur de  $V_{ATP}$  mesurée dans cette étude est en accord avec les valeurs de  $V_{ATP}$  calculées à partir des flux  $CMR_{glc}$  et  $V_{TCA}$  mesurés, et plus particulièrement avec la troisième valeur (c), qui apparaît la plus pertinente d'un point de vue biochimique ( $7.8 \pm 2.3 \mu mol.g^{-1}.min^{-1}$  vs.  $8.3 \pm 1.8 \mu mol.g^{-1}.min^{-1}$ ). Le fait que la valeur de  $V_{ATP}$  mesurée dans cette étude soit sensiblement plus faible que la valeur théorique attendue pourrait être expliqué par un découplage partiel entre la production du gradient protonique de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale et l'utilisation de cette force protomotrice pour la synthèse d'ATP à partir d'ADP et Pi. Ce découplage mitochondrial partiel, observé dans le cerveau, pourrait impliquer des protéines mitochondriales spécifiques, en particulier des protéines dites de découplages (*Uncoupling proteins* UCPs). Il a en effet été montré que, parmi ces protéines, la protéine UCP4, spécifique au cerveau, jouerait un rôle clé dans la modulation du métabolisme énergétique neuronal (Liu et al., 2006, Chan et al., 2006). A l'instar des protéines de découplage, d'autres mécanismes, liés aux fonctions physiologiques des cellules excitables que sont les neurones, pourraient également jouer un rôle dans le découplage mitochondrial partiel. Par exemple, la stimulation des récepteurs membranaires au glutamate est à l'origine de variations rapides de la concentration cytosolique en  $Ca^{2+}$ , variations à l'origine d'une recapture du  $Ca^{2+}$  par les mitochondries (Reynolds, 1999). Cette capture mitochondriale est, au moins en partie, associée à une modification du flux protonique dans la matrice mitochondriale, indépendamment de la synthèse d'ATP. Ainsi, la présence de protéines de découplage et possiblement d'autres facteurs pourraient être à l'origine d'un découplage mitochondrial partiel lui-même à l'origine d'une faible diminution de la synthèse d'ATP oxydative (Lin and Beal, 2006).

D'un autre côté, il est très intéressant de noter que, la valeur de  $V_{ATP}$  mesurée dans cette étude étant sensiblement plus faible que la valeur théorique attendue connaissant  $CMR_{glc}$  et  $V_{TCA}$ , cette étude exclut la possibilité d'une contribution glycolytique significative provenant de la synthèse réversible catalysée par GADPH/PGK dans le cerveau de primate. La mesure de  $V_{ATP}$  par la méthode de transfert de saturation est dominée par la synthèse d'ATP mitochondriale et non pas par une activité enzymatique glycolytique. Finalement, la cohérence des trois flux mesurés dans cette étude ( $CMR_{glc}$ ,  $V_{TCA}$  et  $V_{ATP}$ ) démontre que la spectroscopie RMN du  $^{31}P$  est une méthode fiable et robuste permettant

de mesurer la synthèse d'ATP dans le cerveau de primate, et ce malgré sa faible sensibilité intrinsèque.

### 5.3 Evaluation du rendement énergétique global

Ces résultats peuvent également être observés sous un autre angle : en considérant que les trois méthodes (TEP,  $^{13}\text{C}$  et  $^{31}\text{P}$ ) sont validées et que les flux correspondants sont exacts, la connaissance de ces trois flux métaboliques majeurs permet d'évaluer :

- Le rapport  $(P/O)_{total}$  caractérisé par le nombre d'ATP produit au cours de toutes les voies cataboliques par atome d'oxygène consommé ;
- Le rendement énergétique global  $r$ , c'est-à-dire le pourcentage d'énergie, contenue initialement dans chaque molécule de glucose, qui a été transformée en énergie utile (i.e. en molécules d'ATP) au cours de toutes les voies cataboliques.

Dans la chaîne respiratoire, un atome d'oxygène (i.e.  $1/2.O_2$ ) est consommé en bout de chaîne lors de la dégradation d'une molécule de  $NADH, H^+$  ou de  $FADH_2$ . Ainsi, connaissant les valeurs de  $CMR_{glc}$  et de  $V_{TCA}$ , il est tout d'abord possible d'estimer la consommation moyenne de dioxygène  $CMRO_2$  par l'équation :

$$\begin{aligned} CMRO_2 &= 2.5V_{TCA} + CMR_{glc} \\ CMRO_2 &= 1.85 \pm 0.37 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1} \end{aligned} \quad (5.3)$$

Il est alors possible d'estimer le rapport  $(P/O)_{total}$  par l'équation :

$$(P/O)_{total} = \frac{V_{ATP}}{2.CMRO_2^{TH}} \quad (5.4)$$

Dans le **Tableau 5.2** sont reportées les valeurs des rapports  $(P/O)_{total}$  et des rendements énergétiques  $r$  correspondant aux différentes valeurs de  $V_{ATP}$ . Notons que, pour tous les calculs de  $(P/O)_{total}$ , la valeur de  $CMRO_2$  a été évaluée par l'**Equation 5.4**.

La mesure des trois flux  $CMR_{glc}$ ,  $V_{TCA}$  et  $V_{ATP}$  permet d'estimer un rapport  $P/O_{global}$  de 2.12 molécules d'ATP produites par atome d'oxygène consommé. Le rendement éner-

	$V_{ATP}$	$(P/O)_{total}$	$r$ (%)
(a)	10.7	2.90	73
(b)	8.9	2.42	61
(c)	8.3	2.25	57
EXP	$7.8 \pm 2.3$	2.12	53

TAB. 5.2 – **Rapports  $(P/O)_{total}$  et rendements énergétiques  $r$**  Les rapports  $(P/O)_{total}$  et les rendements énergétiques  $r$  dérivés de la connaissance de  $CMR_{glc}$ ,  $V_{TCA}$  et  $V_{ATP}$  ont été évalués.

gétique total  $r$  peut lui être évalué à 53%, ce qui signifie que 53% de l'énergie contenue initialement dans une molécule de glucose est transformé en énergie utilisable par la cellule sous forme de molécules d'ATP. Autrement dit, l'énergie libre contenue dans une mole de glucose étant de  $2871kJ$ , la cellule conserve  $1522kJ$  sous forme de molécules d'ATP, le reste étant perdu sous forme de chaleur. Sachant de plus qu'une mole d'ATP libère en conditions physiologiques une énergie de  $\Delta G \approx -60kJ.mol^{-1}$ , il est possible d'estimer le nombre de molécules d'ATP produites par molécule de glucose dégradé à  $N_{ATP} = 2871 \times 0.53/60 \approx 25$ . La respiration cellulaire apparaît donc comme un processus hautement efficace.

En considérant que les flux mesurés dans cette étude sont exacts, il est donc possible d'obtenir une vision intégrée du métabolisme énergétique cérébral par l'évaluation du rendement énergétique et du rapport P/O.

## Partie II : Conclusion

Cette étude est le premier rapport de mesures groupées de CMR<sub>glc</sub>,  $V_{TCA}$  et  $V_{ATP}$  effectuées chez les mêmes animaux, dans la même zone cérébrale et en conditions physiologiques identiques. Ce travail permet ainsi de réaliser une validation croisée des techniques de  $^{18}\text{F}$ -FDG TEP, de spectroscopie RMN indirecte  $^1\text{H}$ - $\{^{13}\text{C}\}$  et de spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$ , démontrant leurs fiabilités respectives pour la mesure quantitative *in vivo* des flux métaboliques. Plus particulièrement, cette étude permet pour la première fois de valider *in vivo* la méthode de transfert de saturation comme une méthode robuste de mesure de la vitesse de synthèse d'ATP. Enfin, la connaissance des trois flux métaboliques permet d'évaluer directement leurs couplages et, par conséquent, d'évaluer le rendement énergétique global ainsi que le rapport (P/O) reliant la synthèse d'ATP à la consommation d'oxygène.

*Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal Proceedings of the National Academy of Science (article sous presse) et d'une communication orale au 15<sup>me</sup> congrès de l'ISMRM (Présentation N°714, ISMRM, Berlin 2007).*



## Troisième partie

# Applications à l'étude de la neurodégénérescence





## Chapitre 6

# Etude du métabolisme énergétique cérébral par RMN du $^{31}\text{P}$ dans la maladie de Huntington

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons souligné que les causes de la neuro-dégénérescence et des déficiences métaboliques sous-jacentes restaient à ce jour inconnues dans la maladie de Huntington (MH). Selon l'hypothèse la plus acceptée, la mort cellulaire serait causée par un déficit mitochondrial lui-même engendré par des altérations d'activité des enzymes de la chaîne de transport d'électrons (en particulier du complexe II). Par conséquent, selon cette hypothèse, le métabolisme énergétique cellulaire, et mitochondrial en particulier, devrait être largement perturbé dans le cerveau de patients atteints de la MH (patients HD). Dans la seconde partie de ce manuscrit, une étude de neuroimagerie multimodalités conduite chez le primate sain a permis d'obtenir la première validation croisée de la méthode de transfert de saturation par spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$ , démontrant que cette technique permettait d'accéder à une mesure quantitative et métaboliquement fiable du flux unidirectionnel de synthèse d'ATP  $V_{ATP}$ . A ce stade du travail de thèse, l'étape de validation ayant été réalisée, nous nous sommes alors intéressé à la potentielle utilité clinique de cette technique pour l'évaluation des anomalies du métabolisme énergétique cérébral chez des patients HD.

Les objectifs de cette étude s'articulent autour de deux axes : un axe méthodologique et un axe neurobiologique.

– D'un point de vue méthodologique tout d'abord, l'objectif de cette étude est de dévelop-

per une méthode d'acquisition applicable (*i*) sur un IRM clinique 3 teslas et (*ii*) en un temps d'examen raisonnable, c'est à dire environ 30 minutes. Même si la faisabilité de la mesure de  $V_{ATP}$  par transfert de saturation à 3 teslas a été démontrée dans la partie précédente de ce manuscrit, la faible sensibilité intrinsèque de cette technique rend son utilisation complexe en un temps d'examen compatible avec la clinique. Pour pallier ce manque de sensibilité, nous avons choisi de développer une méthode d'acquisition sans localisation spectroscopique, le volume de détection étant simplement déterminé par la géométrie de la sonde  $^{31}\text{P}$ . Ce choix permet d'éviter les pertes de signal dues à la relaxation T2 pendant l'acquisition, de bénéficier d'un volume de détection important et, conséquence directe de ces deux observations, d'augmenter considérablement le rapport signal sur bruit. De plus, ce choix a été motivé par le fait que la quantité de muscle squelettique situé autour de la boîte crânienne est beaucoup plus faible chez l'homme que chez le macaque.

- D'un point de vue neurobiologique, il s'agit dans un premier temps d'identifier des marqueurs potentiels de la neurodégénérescence, c'est-à-dire des variations potentielles de concentration, de pH cérébral et/ou de  $V_{ATP}$  et de déterminer leur possible corrélation avec les scores cliniques caractérisant l'évolution de la pathologie. En second lieu, l'idée directrice est de mettre à jour les mécanismes biochimiques potentiellement déficients, en particulier en caractérisant le métabolisme énergétique global par la mesure de  $V_{ATP}$ . Ainsi, une attitude exploratoire a été adoptée. Autrement dit, nous avons fait le choix de mesurer plusieurs paramètres métaboliques accessibles en spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$  afin d'obtenir une vision d'ensemble de l'apport possible de cette technique pour l'étude de la MH. Les concentrations en métabolites phosphorés, le pH cérébral et la vitesse de synthèse d'ATP  $V_{ATP}$  ont donc été évaluées.

Enfin, le plan expérimental de cette étude consiste en la mesure (*i*) des concentrations en métabolites phosphorés, (*ii*) du pH cérébral et (*iii*) de la vitesse de synthèse d'ATP dans le cerveau de patients HD, et ce en 30 minutes environ, sur un système RMN clinique 3 teslas.

## 6.1 Matériel et Méthodes

### 6.1.1 Système RMN

Les examens de spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$  ont été conduits sur le système RMN 3 T corps entier MedSpec (Bruker Biospin, Etlingen, Allemagne) précédemment décrit (**Chapitre 3**). La sonde utilisée était une sonde cylindrique birdcage en quadrature résonant à 50.7MHz (fréquence de Larmor du  $^{31}\text{P}$ , diamètre interne  $\varnothing$  27cm). Pour chaque examen, le bord inférieur de la sonde cylindrique était positionné au niveau de la commissure des lèvres, de telle sorte que le volume de détection soit limité à la partie supérieure de la tête (**Figure 6.1**)

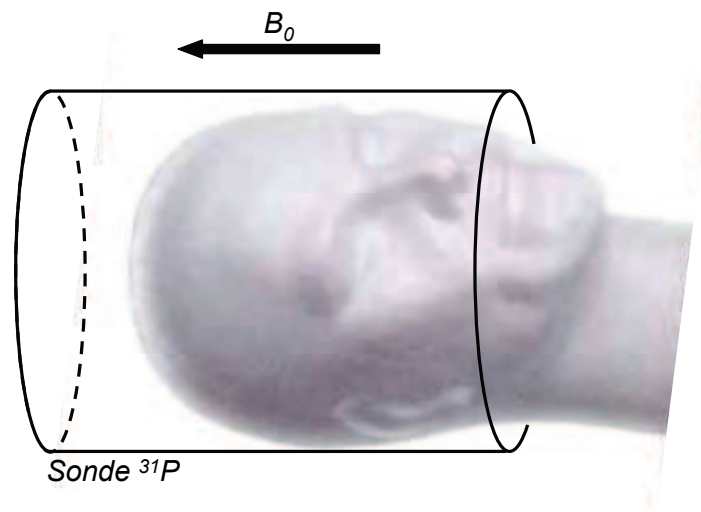


FIG. 6.1 – Représentation schématique du positionnement de la tête du sujet dans la sonde  $^{31}\text{P}$

### 6.1.2 Sujets

L'étude a été conduite sur 15 sujets : 9 patients HD présentant une atrophie cérébrale globale (6h, 3f, âge  $46\pm 9$ ) et 6 contrôles sains appariés en âge et sexe (4 h, 2 f, âge  $42\pm 8$ ). Pour chaque patient, l'année d'apparition des premiers symptômes de la MH (lorsqu'elle

est connue) et le nombre de triplets CAG présents dans le gène de la Huntingtine au moment de l'examen (2006) sont rapportés dans le **Tableau 6.1**.

N° Patient	Age	Sexe	Nombre de CAG	Année des 1 <sup>ers</sup> symptômes
HD051222	34	F	49	2000
HD060112	54	M	45	1996
HD060216	44	M	46	1999
HD060302	49	M	43	/
HD060309	33	M	54	1997
HD060316	49	M	44	2000
HD060323	41	M	47	1999
HD060406	59	F	41	2001
HD060504	48	F	43	2000

TAB. 6.1 – **Données cliniques** Pour chaque patient, l'année d'apparition des premiers symptômes de la MH et le nombre de triplets CAG présents dans le gène de la Huntingtine au moment de l'examen (2006) sont rapportés.

Pour chaque patient, six scores cliniques différents ont également été déterminés au cours d'évaluations de cohorte menées à l'Hôpital Henri Mondor (**Tableau 6.2**). Les cinq premiers scores reportés dans ce tableau sont dérivés de l'échelle UHDRS (*Unified Huntington's Disease Rating Scale*) (Group, 1996). Cette échelle est basée sur le recueil de données épidémiologiques ainsi que sur une évaluation motrice, cognitive et fonctionnelle. Elle est composée des sous-échelles suivantes :

- **Echelle motrice** : (*Notée UHDRS moteur*) Le score maximal est donné entre parenthèses. Un sujet sain a un score de 0, le score maximal étant de 128. Elle évalue l'oculomotricité (24), la dysarthrie et la protusion linguale (8), l'habileté et la planification manuelle (24), la bradykinésie (4), la dystonie et la rigidité (32), la chorée (28), la marche et l'équilibre (12).
- **Echelle cognitive** : (*Notée UHDRS cog*) Elle évalue la fluence verbale littérale (lettres PRV en français, FAS en anglais). Des test de type Symbol digit codes et Test de Stroop sont également réalisés.
- **Echelles fonctionnelles** :
  - Le Total Functional Capacity ou « Capacité Fonctionnelle totale » (*notée TFC*) teste les capacités professionnelles (scores de 0 à 4), de gestion financière (0 à 3), domestiques (0 à 2), d'activités de vie quotidienne (0 à 3) et l'environnement requis

(0 à 2).

- L'Appréciation Fonctionnelle ou Functional assessment (*notée App. Fonc.*) évalue si le sujet peut réaliser des activités quotidiennes sans aide (25 à 50).
- L'Échelle d'indépendance ou Independance Scale (*notée Echelle Ind.*) est notée de 0 à 100 : 100 quand aucune aide n'est nécessaire, 0 quand les patients sont intubés pour être nourris et que l'assistance au lit est toujours nécessaire.

Le dernier score clinique reporté dans le **Tableau 6.2**, appelé Trail Making Test A, consiste à donner au patient une feuille de papier sur laquelle est représentée une série de stimuli alphabétiques qu'il doit relier par ordre croissant (ABCD...). Le résultat est donné en secondes. Ce test permet d'évaluer les capacités psychomotrices et la charge mnésique des patients. L'ensemble de ces scores cliniques permet de quantifier l'évolution symptomatique de la pathologie et constitue une référence reconnue extrêmement utile pour l'évaluation de possibles corrélations entre symptômes et variations métaboliques mesurées par spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$ .

N° Patient	UHDRS Moteur	UHDRS Cog			App. fonc.	Echelle Ind	TFC	Trail Making Test A (s)
		Fl. (1/2)	SD	Stroop				
HD051222	37				28	80	10	
HD060112	34	35/40	22	30/74/31	28	85	11	62
HD060216	72	12/21	16	25/50/19	30	80	9	188
HD060302	33	35/49	16	38/58/20	27	100	11	36
HD060309								
HD060316	39	13/16	8	20/40/17	37	90	4	150
HD060323	67	14/17	18	32/38/19	29	80	9	90
HD060406	27	28/37	23	51/78/23	25	100	12	123
HD060504	19	42/60	30	60/79/31	26	100	13	45

TAB. 6.2 – **Scores cliniques** Les sept premiers scores cliniques rapportés dans ce tableau sont dérivés de l'échelle UHDRS (*Unified Huntington's Disease Rating Scale*) (Group, 1996) et correspondent aux sous échelles suivantes : échelle motrice (*UHDRS moteur*), échelle cognitive (*UHDRS cog*), appréciation fonctionnelle (App. fonc.), échelle d'indépendance (Echelle Ind.), capacité fonctionnelle totale (TFC). Le dernier score clinique, appelé Trail Making Test A, permet de quantifier les capacités psychomotrices et la charge mnésique des patients.

### 6.1.3 Spectroscopie du $^{31}\text{P}$

#### Mesure des concentrations métaboliques et du pH cérébral

Afin de mesurer les concentrations en métabolites et le pH cérébral, une séquence de type impulsion/acquisition simple, sans aucune localisation spectroscopique, a été utilisée (100 $\mu\text{s}$  90° hard pulse, largeur spectrale 10kHz, 1024 points, TR=7.5s, 28 répétitions). La procédure de shim a directement été réalisée sur le signal phosphore préalablement à chaque acquisition. En effet, la sonde  $^{31}\text{P}$  utilisée était une sonde simple accord ne permettant pas de régler les courants de shim sur le signal de l'eau comme il est d'usage. La largeur de raie typique obtenue était de  $\approx 15\text{Hz}$  sur la PCr.

#### Adaptation de la méthode de mesure de $V_{ATP}$ du primate à l'homme

**Séquence** Contrairement à la méthode développée pour le primate, la séquence d'acquisition est ici non localisée. La séquence de transfert de saturation progressif a été réalisée en ajoutant simplement une impulsion carrée de saturation de durée variable  $tsat$  juste avant l'impulsion de 90° de la séquence impulsion/acquisition. Le temps de répétition a également été adapté (TR=7.5s) afin de permettre à l'aimantation du Pi de relaxer quasiment complètement entre deux acquisitions. En effet, étant donné les valeurs du temps de relaxation longitudinale intrinsèque du Pi  $T_{1P_i}^{int}$  à 2 teslas, 4 teslas et 7 teslas rapportées dans la littérature chez l'homme (Lei et al., 2003b, Valette et al., 2006b) et connaissant les mesures à 3 teslas réalisées chez le primate,  $T_{1P_i}^{int}$  devait être égal à  $\approx 2\text{s}$  dans le cerveau humain à 3 teslas. Ainsi un temps de répétition de 7.5s permettait à l'aimantation du Pi de relaxer de  $\approx 98\%$  entre deux acquisitions. Même si cette adaptation augmente le temps d'acquisition et diminue le rapport signal sur bruit accessible pour un temps d'acquisition donné, elle permet de s'affranchir de la mesure de  $T_{1P_i}^{mix}$  (T1 en présence d'échange chimique) et donc de minimiser les biais sur la détermination de  $V_{ATP}$ . De plus, si une expérience d'inversion/récupération avait dû être réalisée pour déterminer le  $T_{1P_i}^{mix}$ , le temps total d'acquisition incluant l'application des séquences de transfert de saturation et d'inversion/récupération aurait été plus long que le temps nécessaire à l'acquisition selon notre méthode, et donc incompatible avec une étude sur patients HD.

Enfin, notons qu'une des limitations principales à l'utilisation d'une acquisition non localisée est son manque de spécificité tissulaire. En effet, le signal reçu issu du volume de détection de la sonde ne provient pas uniquement du cerveau mais est contaminé par les tissus musculaires situés en périphérie du crâne et dans l'appareil manducateur (muscle masséter principalement). Cependant, il faut noter que le choix d'une acquisition non localisée a été préalablement motivé par la constatation que la fraction musculaire représentait seulement un faible pourcentage du volume de détection.

**Acquisitions** Comme précédemment, la fréquence de saturation a tout d'abord été choisie égale à la fréquence de l'ATP $\gamma$  (-7.35ppm par rapport au Pi) et les spectres ont été collectés pour 4 valeurs de  $tsat$  (0.25 ; 0.5 ; 1.0 et 1.5s). Afin de corriger du RF Bleed Over, la même expérience a été réalisée en ajustant la fréquence de saturation à une fréquence symétrique par rapport au Pi (-7.35ppm par rapport au Pi). Les spectres ont été collectés pour les mêmes 4 valeurs de  $tsat$ . Là encore, les valeurs des temps de saturation ont été modifiées par rapport à la séquence précédemment décrite (0.25 ; 0.5 ; 1.0 et 1.5s *vs* 0.5 ; 1.0 ; 1.5 et 2s) afin de diminuer le temps d'acquisition. 28 répétitions seulement ont été réalisées pour chaque temps de saturation, étant donné la courte durée d'examen disponible. Le temps d'acquisition total incluant le shim, l'application des séquences d'impulsion/acquisition et de transfert de saturation progressif était de  $\approx 35$  minutes.

**Modélisation** L'écriture des équations de Bloch modifiées pour l'échange chimique est dans ce cas grandement simplifiée par rapport à l'étude primate. En effet, la séquence d'acquisition étant non localisée, il n'y a pas de relaxation de l'aimantation longitudinale du Pi pendant la localisation (*i.e.* pendant l'application des OVS). De plus, la relaxation longitudinale du Pi est quasi-complète d'une répétition à l'autre. Ainsi, la relation reliant la constante cinétique unidirectionnelle de synthèse d'ATP  $k_f$ , l'aimantation du Pi en présence de saturation de l'ATP $\gamma$   $M_{zPi}(tsat)$ , l'aimantation du Pi en présence de saturation symétrique  $M_{zPi}^{eq}$ , le temps de relaxation longitudinale intrinsèque  $T_{1Pi}^{int}$  et la durée de l'impulsion de saturation  $tsat$  peut s'écrire simplement sous la forme :

$$\frac{M_{zPi}(tsat)}{M_{zPi}^{eq}} = \frac{1}{1 + k_f T_{1Pi}^{int}} + \left(1 - \frac{1}{1 + k_f T_{1Pi}^{int}}\right) e^{-\left(k_f + \frac{1}{T_{1Pi}^{int}}\right) tsat} \quad (6.1)$$



Par conséquent, les paramètres d'intérêt  $k_f$  et  $T_{1P_i}^{int}$  peuvent être estimés simplement par ajustement itératif de l'atténuation de la résonance du Pi  $\frac{M_{zP_i}(tsat)}{M_{zP_i}^{eq}}$  en fonction de la durée de l'impulsion de saturation  $tsat$ . Le principe de détermination de  $k_f$  et  $T_{1P_i}^{int}$  est donc basé sur le même principe d'ajustement itératif que l'étude précédente, la différence fondamentale étant la relative simplicité de la relation mathématique (**Equation 6.1**) due au faible nombre de paramètres présents dans l'équation. En particulier, notons que  $T_{1P_i}^{mix}$  n'est pas présent dans l'équation, ce qui a pour conséquence de minimiser les erreurs d'estimation, ce paramètre ayant été déterminé expérimentalement, et donc soumis à une incertitude, dans une étude précédente (Valette, 2006).

### Méthode d'évaluation de la contamination musculaire

Afin d'estimer la possible contribution des muscles squelettiques, principalement du muscle masséter, au signal  $^{31}\text{P}$  collecté, une sonde mono accord  $^1\text{H}$  ayant exactement la même géométrie que la sonde  $^{31}\text{P}$  a été utilisée afin d'acquérir des images 3D haute résolution de la partie haute de la tête (écho de gradient 3D, TE/TR=6/30ms, Matrice  $192 \times 192 \times 192$ , FOV= $256 \times 192 \times 256\text{mm}^3$ , largeur spectrale 50kHz). Le positionnement de la sonde  $^1\text{H}$  était bien entendu identique à celui de la sonde  $^{31}\text{P}$  (**Figure 6.1**). Les images ont ensuite été segmentées manuellement sur la base d'un atlas anatomique de la tête humaine (Rohen and Yokochi, 1991) afin d'estimer les volumes cérébraux et musculaires. Cette procédure a été réalisée pour un volontaire sain.

#### 6.1.4 Traitement des données

**Méthode de quantification** Notons tout d'abord que cette méthode de quantification s'applique à tous les spectres  $^{31}\text{P}$ , acquis par impulsion/acquisition et par la méthode de transfert de saturation. Une procédure de *zero filling* à 2048 points a tout d'abord été appliquée à chaque spectre  $^{31}\text{P}$  puis ces derniers ont été quantifiés par la méthode AMARES sous jMRUI (Vanhamme et al., 1997) en utilisant la base de 13 métabolites décrite dans la partie précédente (**Tableau 4.3**). L'ensemble des valeurs de fréquence, de couplage et de contraintes souples ou dures appliqué dans cette étude est celui décrit dans la partie précédente. Seulement deux adaptations de la méthode de quantification

précédente ont été effectuées. En premier lieu, une correction rigide de la phase d'ordre 1, estimée à 1.5deg/ppm sur un spectre à haut rapport signal sur bruit, a été appliquée à tous les spectres.

Une seconde adaptation a été utilisée spécifiquement pour la quantification des spectres  $^{31}\text{P}$  acquis en impulsion/acquisition. Pour quantifier ces spectres, une procédure de troncature des 12 premiers points (correspondant aux 1.2 premières millisecondes d'acquisition) a été appliquée. Bien que cette procédure diminue le rapport signal sur bruit des résonances d'intérêt, elle était nécessaire afin de supprimer la large ligne de base présente sur les spectres  $^{31}\text{P}$ . Les résonances estimées ont par la suite été corrigées automatiquement en amplitude et en largeur de raie en tenant compte du signal des premiers points tronqués.

**Reproductibilité de la méthode de quantification** Afin de tester la reproductibilité de la méthode de quantification utilisée, une série de 10 spectres acquis par impulsion/acquisition a été collectée pour un des cinq volontaires sains. Ces dix acquisitions ont été réalisées en environ 1 heure, le volontaire ayant été retiré puis repositionné dans le tunnel entre chaque acquisition. L'analyse AMARES de cette série de données a permis de mettre en évidence une grande reproductibilité de quantification, en particulier sur la résonance du Pi, l'écart type relatif sur la détermination de cette concentration étant de  $\approx 3.0\%$ . Associée à une bonne sensibilité de détection à l'acquisition, la méthode de quantification développée sous AMARES permet de mesurer de façon précise et reproductible la concentration du Pi en particulier, et donc son atténuation associée au transfert de saturation.

**Détermination des concentrations métaboliques et du pH cérébral** Les concentrations métaboliques ont été dérivées directement de la quantification effectuée par la méthode AMARES sous jMRUI. Les concentrations ont tout d'abord été évaluées pour chaque patient puis moyennées pour chaque groupe (patients HD et sujets contrôles). De la même manière, le pH cérébral a été évalué pour chaque sujet en utilisant les valeurs suivantes :  $\delta_{HA}=3.23$ ,  $\delta_A=5.70$  et  $\text{pKa}=6.77$ . Les valeurs estimées de pH ont par la suite été moyennées pour chaque groupe (patients HD et sujets contrôles).

**Détermination de  $V_{ATP}$**  Pour chaque sujet et chaque temps de saturation, l'atténuation de la résonance du Pi  $\frac{M_{zPi}(tsat)}{M_{zPi}^{eq}}$  a été estimée. Ces rapports ont ensuite été moyennés pour chaque groupe (patients HD et sujets contrôles) pour chaque temps de saturation  $tsat$ . En effet, au vu du faible rapport signal sur bruit des spectres individuels, seule une étude de groupe était envisageable.

Pour chaque groupe, la courbe d'atténuation du Pi  $\frac{M_{zPi}(tsat)}{M_{zPi}^{eq}}$  en fonction du temps de saturation  $tsat$  a ensuite été ajustée selon l'équation de Bloch modifiée précédemment décrite (**Equation 6.1**). L'ajustement, effectué sous le logiciel Matlab (The MathWorks Inc., Natick, MA), a permis de dériver simultanément les paramètres d'intérêt  $k_f$  et  $T_{1Pi}^{int}$ . Afin d'éviter les divergences lors de l'ajustement, la valeur de  $T_{1Pi}^{int}$  a été contrainte dans une gamme correspondant à 50% de la valeur attendue ( $\approx 2\text{s}$ ) :  $1.5 < T_{1Pi}^{int} < 2.5$ . La précision de mesure de ces deux paramètres a été évaluée par simulation Monte Carlo (N=1000 itérations). La valeur de  $V_{ATP}$  a ensuite été dérivée de l'équation  $V_{ATP} = k_f[Pi]$ .

## 6.2 Résultats

### 6.2.1 Evaluation de la contamination musculaire au signal $^{31}\text{P}$ détecté

La **Figure 6.2** illustre la distribution des tissus musculaires et cérébraux dans le volume détecté par la sonde  $^{31}\text{P}$  cylindrique. La segmentation des images a permis d'évaluer le volume cérébral à 1.43L et le volume musculaire à 0.11L. Par conséquent, la fraction cérébrale dans le volume détecté était de 0.93. Or les concentrations en PCr, Pi et ATP rapportées dans la littérature permettent d'évaluer les rapports suivants :  $[\text{PCr}]_{\text{muscle}}/[\text{PCr}]_{\text{cerveau}} \approx 8$  et  $[\text{Pi}]_{\text{muscle}}/[\text{Pi}]_{\text{cerveau}} \approx [\text{ATP}]_{\text{muscle}}/[\text{ATP}]_{\text{cerveau}} \approx 2$  (Jensen et al., 2002, Hamilton et al., 2003b, Boska, 1994, Doyle et al., 1997, Hetherington et al., 2001, Potwarka et al., 1999). Etant donné ces rapports, le fait d'assimiler le signal de la PCr détecté par notre méthode à un signal purement cérébral induit une surestimation importante de la concentration cérébrale en PCr (surestimation de  $\approx 50\%$ ). Par contre, les erreurs sur la détermination des concentrations cérébrales en ATP et Pi sont largement plus faibles et correspondent à une surestimation maximale de  $\approx 8\%$ . Ainsi, il est important de souligner que, à cause de la contamination musculaire, les concentrations en métabolites phosphorés sont toutes plus ou moins surestimées dans cette étude. Cependant, il faut également rappeler que notre étude est une étude relative visant à comparer deux groupes de sujets (patients HD et sujets contrôles). Les conditions d'acquisition étant les mêmes pour tous les individus, ce biais n'influe pas sur la comparaison des concentrations métaboliques entre groupes de sujets.

### 6.2.2 Mesure des concentrations métaboliques

Les spectres acquis par impulsion/acquisition sont caractérisés par des résonances d'intérêt superposées à des résonances très larges ( $\approx 50\text{ppm}$  à mi-hauteur) (**Figure 6.3 (a)**). Ces dernières ont été éliminées par troncature afin de quantifier les métabolites d'intérêt de façon robuste. L'analyse effectuée par AMARES en utilisant la base de métabolites précédemment décrite est présentée en **Figure 6.3 (b-f)**. Les concentrations moyennes relatives en métabolites phosphorés ont été estimées pour chaque groupe comme le rapport

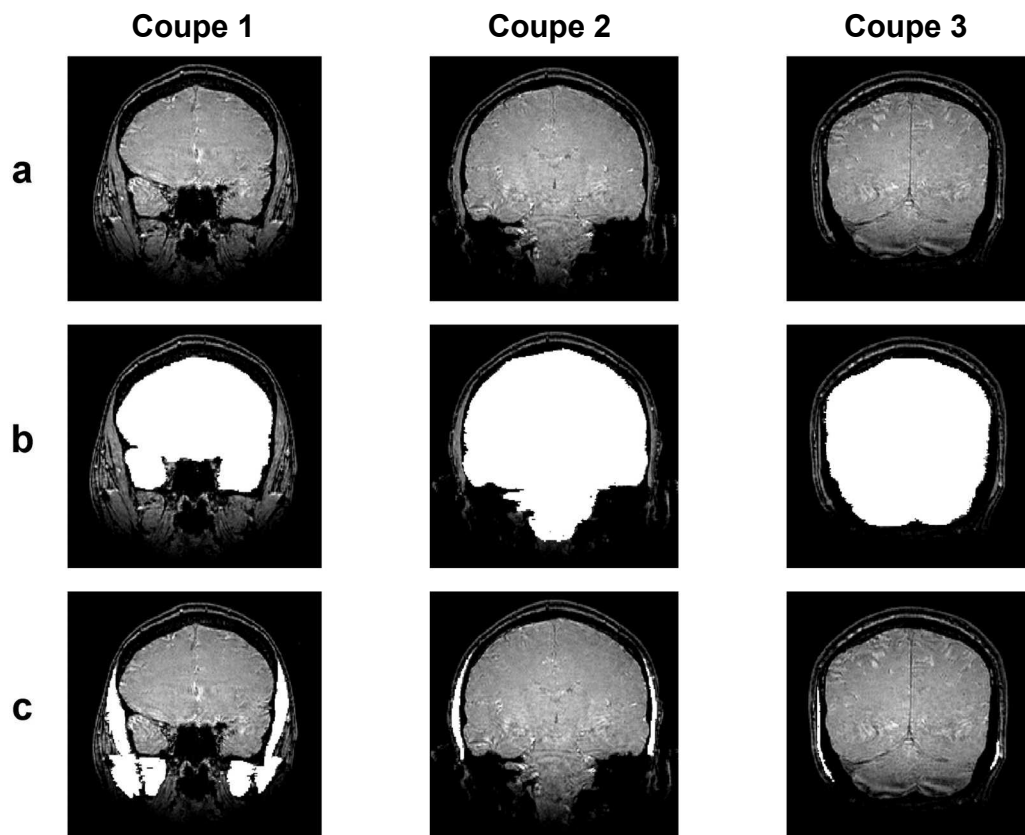


FIG. 6.2 – **Segmentation manuelle du volume détecté par la sonde  $^{31}\text{P}$**  Trois coupes coronales espacées de 5 cm sont représentées (a). La segmentation du volume détecté a permis d'estimer un volume cérébral de 1.43L (b) et un volume musculaire de 0.11L (c).

de l'aire du pic d'intérêt sur la somme totales des aires (concentration relative = aire pic / ( $\sum$  aires)) (**Tableau 6.3**).

	Concentrations relatives en métabolites (u.a.)								
	ATP $\alpha$	ATP $\beta$	ATP $\gamma$	Pi	PCr	PME	PDE	MP	DN
Contrôles (n=6)	0.127 $\pm 0.009$	0.101 $\pm 0.006$	0.108 $\pm 0.002$	0.069 $\pm 0.002$	0.160 $\pm 0.009$	0.123 $\pm 0.006$	0.138 $\pm 0.013$	0.115 $\pm 0.027$	0.035 $\pm 0.006$
Patients HD (n=9)	0.127 $\pm 0.009$	0.101 $\pm 0.006$	0.111 $\pm 0.005$	0.068 $\pm 0.002$	0.165 $\pm 0.011$	0.124 $\pm 0.007$	0.142 $\pm 0.008$	0.104 $\pm 0.006$	0.034 $\pm 0.007$

TAB. 6.3 – **Concentrations en métabolites estimées par AMARES** Les concentrations reportées dans ce tableau sont les concentrations moyennes estimées pour chaque groupe (sujets sains et patients HD). Pour chaque métabolite, la concentration relative représente le rapport de l'aire du pic d'intérêt sur la somme totales des aires. L'appellation PME inclut PE, PC, DPG et Pser. L'appellation PDE inclut GPE et GPC.

### 6.2.3 Détermination du pH cérébral

Alors que la faible sensibilité de la méthode de transfert de saturation ne permet pas d'obtenir des valeurs individuelles de  $V_{ATP}$ , la mesure du pH cérébral par mesure de déplacement chimique a pu être réalisée pour chaque sujet (contrôles et patients HD). Les valeurs individuelles sont reportées dans le **Tableau 6.4**.

Contrôles	pH cérébral	Patients HD	pH cérébral
1	7.019	HD051222	7.043
2	7.034	HD060112	7.045
3	7.034	HD060216	7.066
4	6.999	HD060302	7.054
5	7.019	HD060309	7.005
6	7.034	HD060316	7.037
Moyenne	<b>7.023</b>	HD060323	7.057
Ecart-type	<b>0.014</b>	HD060406	7.045
		HD060504	7.028
		Moyenne	<b>7.048</b>
		Ecart-type	<b>0.025</b>

TAB. 6.4 – **Valeurs de pH individuelles**

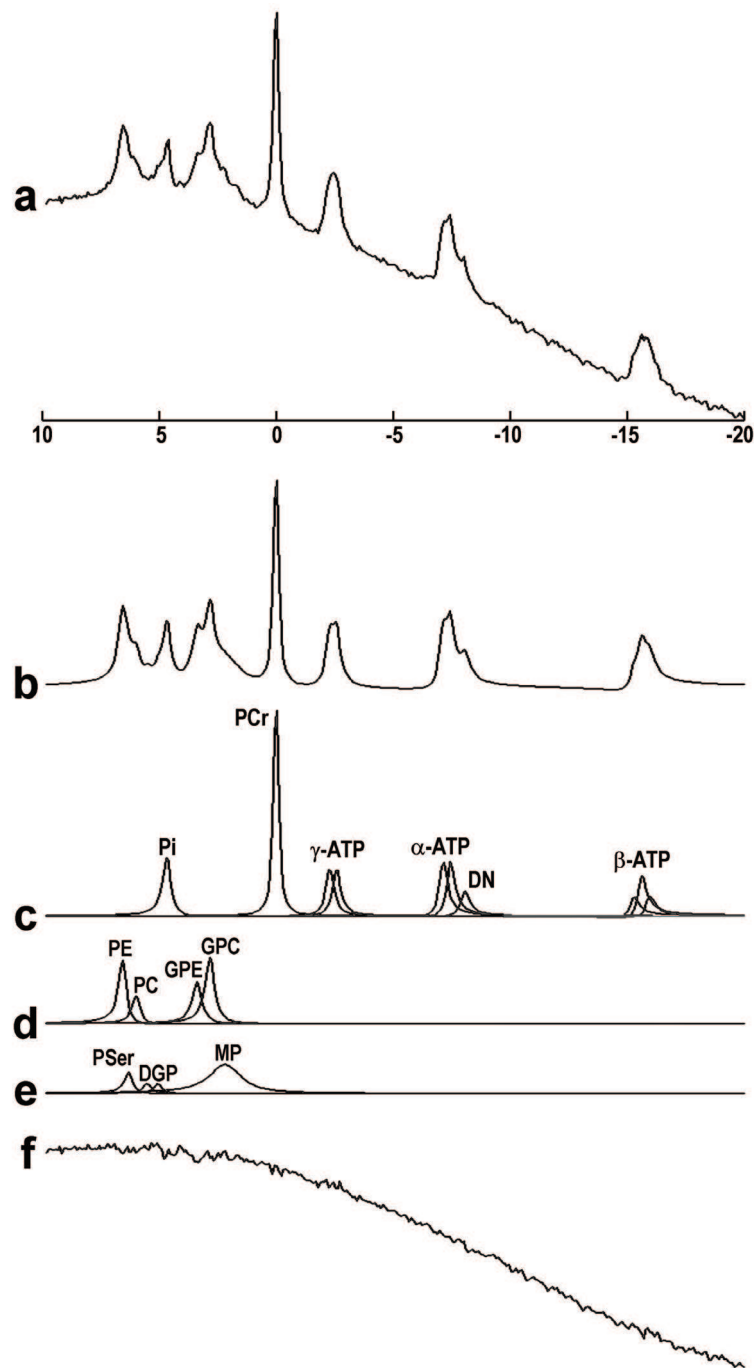


FIG. 6.3 – Analyse spectrale effectuée sous AMARES d'un spectre  $^{31}\text{P}$  acquis par la méthode d'impulsion/acquisition. (a) Spectre brut. (b) Estimation du spectre de métabolites. (c), (d) et (e) Contributions individuelles. (f) Résidus.

Pour chaque groupe, les valeurs du pH cérébral ont ensuite été moyennées, conduisant à :

$$\begin{aligned} pH (\text{Contrôles}) &= 7.023 \pm 0.014 \\ pH (\text{Patients HD}) &= 7.048 \pm 0.025 \end{aligned} \quad (6.2)$$

Le graphe présenté en **Figure 6.4** permet de visualiser la dispersion des valeurs individuelles autour des valeurs moyennes pour chaque groupe.

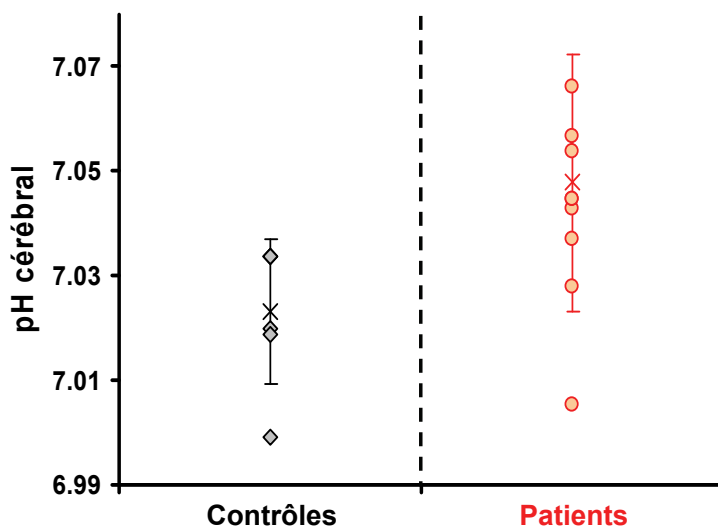


FIG. 6.4 – Les valeurs individuelles du pH cérébral (patients HD **ronds**/ sujets sains **losanges**), les valeurs moyennes et les écarts-types (patients HD **x**/ sujets sains **x**) sont ici représentées graphiquement pour les deux groupes de sujets.

Une alcalinisation de l'ordre de 0.025 unité de pH est donc mesurée dans le cerveau des patients HD relativement au groupe contrôle. Au vu du faible nombre de sujets ( $N=15$ ), un test statistique de rang (type Wilcoxon) a été réalisé sous le logiciel Datamind (LNAO, Neurospin, R Development Core Team, 2008) afin d'évaluer la significativité de l'augmentation de pH cérébral. Ce test a permis de conclure que cette augmentation était significative, la p-value obtenue étant  $p=0.02$ .



### 6.2.4 Détermination de $V_{ATP}$

La **Figure 6.5** présente les spectres, moyennés sur les 6 sujets contrôles, acquis pour un temps de saturation de  $tsat=1s$ .

Les spectres présentés en **Figure 6.6 (a)**, acquis sur un volontaire sain, montrent la diminution attendue de l'amplitude de la résonance du Pi en fonction du temps de saturation  $tsat$ . Il est également intéressant de noter une diminution conjointe des amplitudes des pics de PME et de PDE. Ces atténuations annexes se révèlent cependant plus faibles que l'atténuation du Pi et peuvent être attribuées à l'effet de RF bleed over. Les estimations de  $k_f$  et  $T_{1Pi}^{int}$  dérivées de l'ajustement itératif de  $\frac{M_{zPi}(tsat)}{M_{zPi}^{eq}}$  (**Figure 6.6 (b)**) et de la simulation Monte Carlo ont conduit aux valeurs suivantes :

$$\begin{aligned} k_f (\text{Contrôles}) &= 0.29 \pm 0.02s^{-1} \\ k_f (\text{Patients HD}) &= 0.19 \pm 0.03s^{-1} \end{aligned} \quad (6.3)$$

$$\begin{aligned} T_{1Pi}^{int} (\text{Contrôles}) &= 1.9 \pm 0.3s^{-1} \\ T_{1Pi}^{int} (\text{Patients HD}) &= 2.3 \pm 0.3s^{-1} \end{aligned} \quad (6.4)$$

La densité cérébrale ayant été fixée à 1g/mL et la concentration en [Pi] à [Pi]=1.3mM d'après la littérature (Jensen et al., 2002, Hamilton et al., 2003b, Boska, 1994, Doyle et al., 1997, Hetherington et al., 2001, Potwarka et al., 1999), la vitesse de synthèse d'ATP  $V_{ATP}$  a ensuite évaluée par l'équation  $V_{ATP} = k_f[Pi]$  :

$$\begin{aligned} V_{ATP} (\text{Contrôles}) &= 22.4 \pm 1.9\mu\text{mol}.g^{-1}.min^{-1} \\ V_{ATP} (\text{Patients HD}) &= 14.8 \pm 2.4\mu\text{mol}.g^{-1}.min^{-1} \end{aligned} \quad (6.5)$$

soit une diminution de  $\approx 35\%$  de  $V_{ATP}$  dans le groupe de patients HD relativement aux contrôles sains.

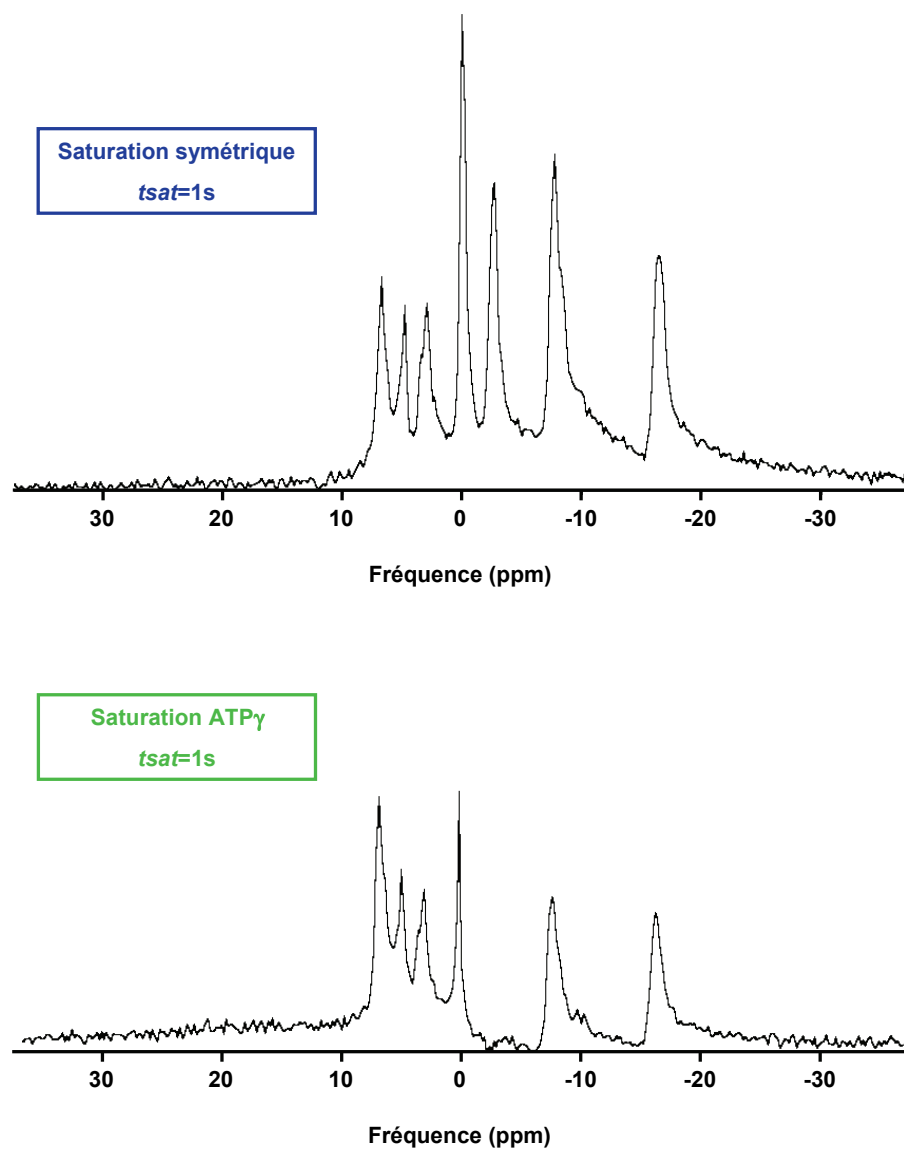


FIG. 6.5 – Spectres  $^{31}\text{P}$  Spectres moyens obtenus pour le groupe contrôle pour un temps de saturation  $t_{sat}=1s$  (lissage lorentzien 15Hz)

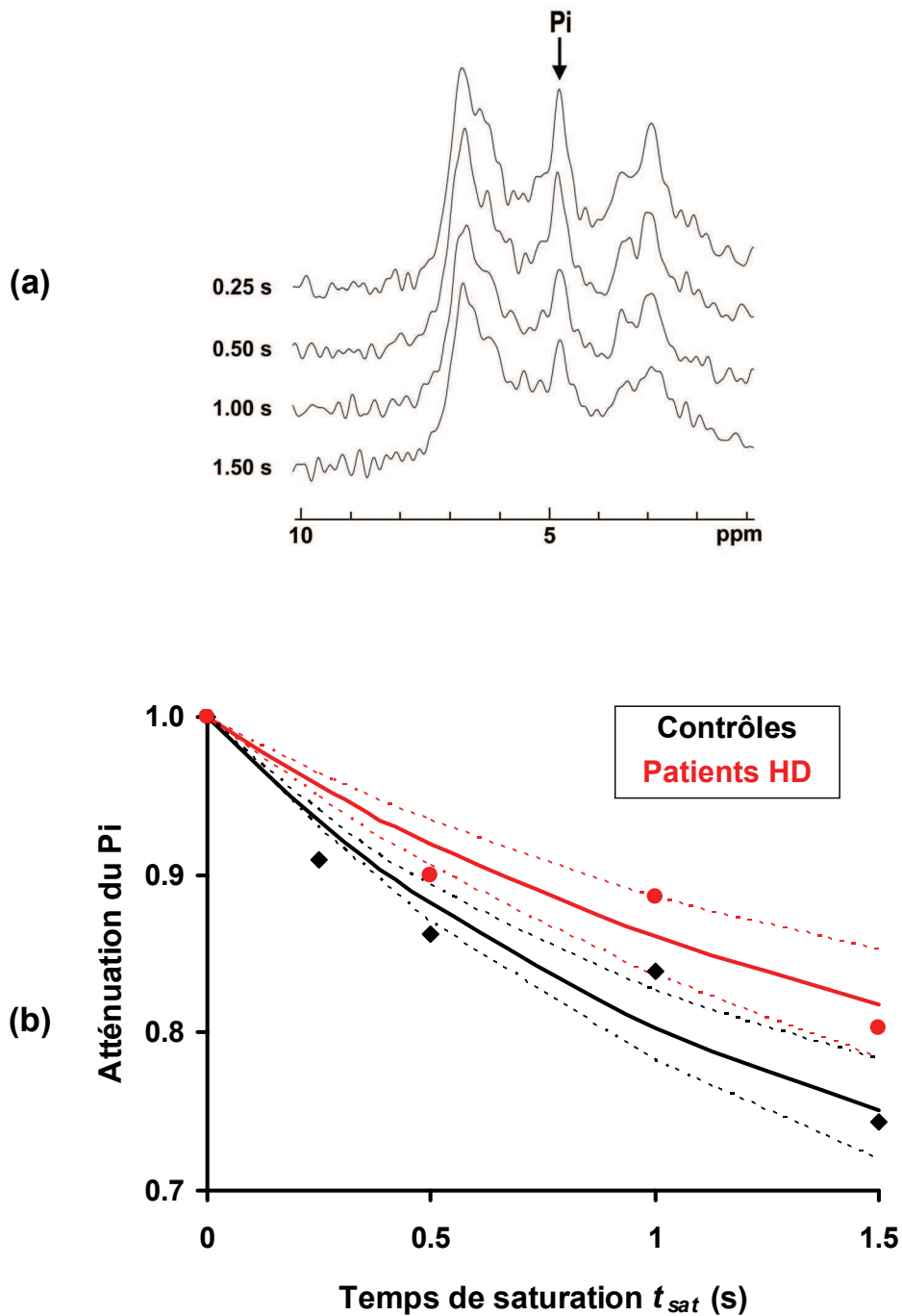


FIG. 6.6 – (a) Spectres  $^{31}\text{P}$  acquis sur un volontaire sain en présence de saturation de l'ATP $\gamma$  pour les 4 temps de saturation (0.25, 0.5, 1.0 et 1.5s). Seule la région du Pi est ici représentée, montrant une diminution de l'amplitude du Pi lorsque le temps de saturation augmente. (b) Atténuation du Pi  $\frac{M_{zPi}(t_{sat})}{M_{zPi}^{eq}}$  fonction du temps de saturation  $t_{sat}$ . Les losanges et les ronds représentent les points expérimentaux, les lignes continues les meilleurs ajustements aux données expérimentales. Les lignes pointillés représentent les limites inférieures et supérieures de l'ajustement déterminées par simulation Monte Carlo.

## 6.3 Discussion

### 6.3.1 Contamination musculaire limitée

La segmentation des images d'écho de gradient englobant le volume détecté par la sonde  $^{31}\text{P}$  a permis d'estimer la surestimation de la concentration cérébrale en Pi ( $\approx 8\%$ ) due à la contamination musculaire. Cependant, il est important de noter que cette valeur représente l'erreur maximale possible liée à la contribution musculaire. En effet, les muscles squelettiques situés autour du crâne, en particulier le muscle masséter, sont soumis à des fortes inhomogénéités de  $B_0$  car ils sont situés relativement loin de l'isocentre de l'aimant et jouxtent des interfaces air/tissus. Par conséquent, contrairement au signal  $^{31}\text{P}$  cérébral, le signal musculaire devrait présenter des résonances significativement plus larges et donc partiellement ignorées par l'ajustement lorentzien effectué sous AMARES. En pratique, la contribution musculaire au spectre  $^{31}\text{P}$  détecté apparaît plus faible que la contribution estimée sur la base de la fraction musculaire détectée par la sonde. En effet, la valeur du rapport  $[\text{PCr}]/[\text{ATP}]$  estimée dans cette étude ( $1.48 \pm 0.11$ ) est en accord avec la valeur de  $1.29 \pm 0.22$  mesurée dans le cerveau humain à 7 teslas (Lei et al., 2003b) et contraste avec les valeurs de  $\approx 4$  rapportées pour le muscle squelettique (Doyle et al., 1997, Hetherington et al., 2001, Potwarka et al., 1999). L'ensemble de ces éléments suggère que les spectres  $^{31}\text{P}$  acquis dans cette étude sont largement dominés par les résonances des métabolites cérébraux.

### 6.3.2 Stabilité des concentrations métaboliques

Le **Tableau 6.3** montre qu'aucune variation significative des concentrations relatives en métabolites n'est détectée entre les groupes de sujets. Autrement dit, la concentration des différents métabolites impliqués dans le métabolisme énergétique cérébral reste stable chez les patients HD. Ceci signifie que l'homéostasie métabolique semble maintenue chez ces patients et ce malgré la présence d'une atrophie striatale et corticale importante.

### 6.3.3 Alcalinisation cérébrale significative

Des variations de pH cérébral ont été observées dans de nombreuses pathologies : ischémie (von Hanwehr et al., 1986, Welch et al., 1992), hypoxie chronique (Hamilton et al., 2003a), tumeurs cérébrales (Wike-Hooley et al., 1984, Kallinowski and Vaupel, 1988, Gerweck and Seetharaman, 1996), troubles bipolaires (Hamakawa et al., 2004)... Cependant, à notre connaissance, aucune variation significative de pH cérébral n'a été observée à ce jour dans une maladie neurodégénérative. Cette étude est ainsi le premier rapport d'une augmentation significative de pH cérébral chez des patients neurodégénératifs.

La connaissance de huit scores cliniques différents (au maximum) pour chaque patient nous a conduit à évaluer l'existence de corrélations entre variations de pH et symptômes associés à l'évolution de la pathologie. Le seul score clinique présentant une corrélation significative avec les variations de pH mesurées dans le cerveau des patients HD est le score clinique UHDRS moteur (**Figure 6.7**). Au vu du faible nombre de sujets (score UHDRS moteur connu pour seulement 8 sujets), un test paramétrique (type Pearson) a été réalisé sous Datamind et a permis d'établir la significativité de cette corrélation ( $p=0.01$ ).

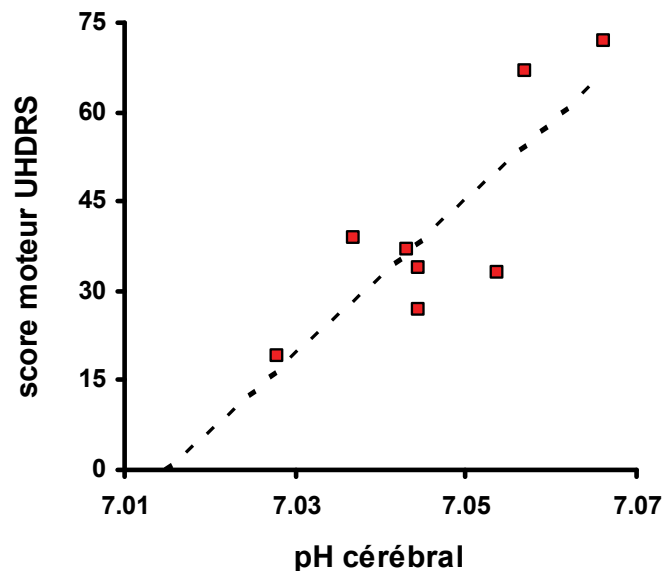


FIG. 6.7 – Corrélation entre augmentation du pH cérébral et score moteur UHDRS dans le groupe de patients HD

### 6.3.4 Limites de la mesure de $V_{ATP}$

**Précision sur la détermination de  $k_f$**  La simulation Monte Carlo montre que l'ajustement itératif réalisé permet d'obtenir une plus grande précision sur la détermination de  $k_f$  (écart-type  $\approx 8\%$ ) que celle de  $T_{1Pi}^{int}$  (écart-type  $\approx 17\%$ ) dans le groupe contrôle. Il est alors intéressant de se demander dans quelle mesure la contrainte imposée pour la détermination de  $T_{1Pi}^{int}$  peut affecter l'estimation de  $k_f$ . Lorsque  $T_{1Pi}^{int}$  est fixé à sa limite inférieure (1.5s) ou supérieure (2.5s), l'ajustement itératif monoparamétrique de l'atténuation du Pi en fonction de  $tsat$  conduit aux valeurs suivantes :  $k_f = 0.31 \pm 0.02 s^{-1}$  pour  $T_{1Pi}^{int} = 1.5s$ ,  $k_f = 0.27 \pm 0.02 s^{-1}$  pour  $T_{1Pi}^{int} = 2.5s$ . Ceci illustre le fait que la détermination de  $k_f$  est relativement insensible à la valeur de  $T_{1Pi}^{int}$  dans la gamme de  $T_{1Pi}^{int}$  [1.5s-2.5s]. Etant donné que la valeur de  $V_{ATP}$  dépend seulement du paramètre  $k_f$ , la stabilité de la détermination de ce paramètre est un atout pour la détermination de ce flux.

**Sensibilité de la mesure de  $V_{ATP}$  au champ statique  $B_0$**  Cette étude, réalisée à 3 teslas, est le second rapport d'une mesure de  $V_{ATP}$  dans le cerveau humain après celle réalisée à 7 teslas par Lei *et al.* (Lei et al., 2003a). Sans tenir compte de la plus faible sensibilité intrinsèque de la spectroscopie RMN à 3 teslas, il est intéressant de se demander dans quelle mesure la plus faible valeur du temps de relaxation  $T_{1Pi}^{int}$  à 3 teslas (2.0s vs. 3.5s à 7 teslas) affecte les valeurs d'atténuation du Pi mesurées par transfert de saturation. En effet, la sensibilité optimale de cette méthode est obtenue lorsque la valeur de  $T_{1Pi}^{int}$  est proche de  $1/k_f$ . Sous l'hypothèse que  $k_f \approx 0.2 s^{-1}$ , l'atténuation du Pi pour un temps de saturation infini  $tsat$  peut être calculée pour différentes valeurs de  $T_{1Pi}^{int}$  en utilisant l'**Equation 6.1**, conduisant à (**Figure 6.8**) :

$$\frac{M_{zPi}(tsat)}{M_{zPi}^{eq}} = 0.71 \quad (3 \text{ teslas}) \quad (6.6)$$

$$\frac{M_{zPi}(tsat)}{M_{zPi}^{eq}} = 0.59 \quad (7 \text{ teslas}) \quad (6.7)$$

$$(6.8)$$

Cette estimation démontre l'avantage intrinsèque apporté par les hauts champs magnétiques pour la méthode de transfert de saturation. Cependant, pour des temps de satu-

ration relativement courts (environ 2s), l'utilisation des hauts champs magnétiques ne présente qu'un faible avantage : pour  $t_{sat}=2\text{s}$ , l'atténuation du Pi est de 0.78 à 3 teslas contre 0.74 à 7 teslas.

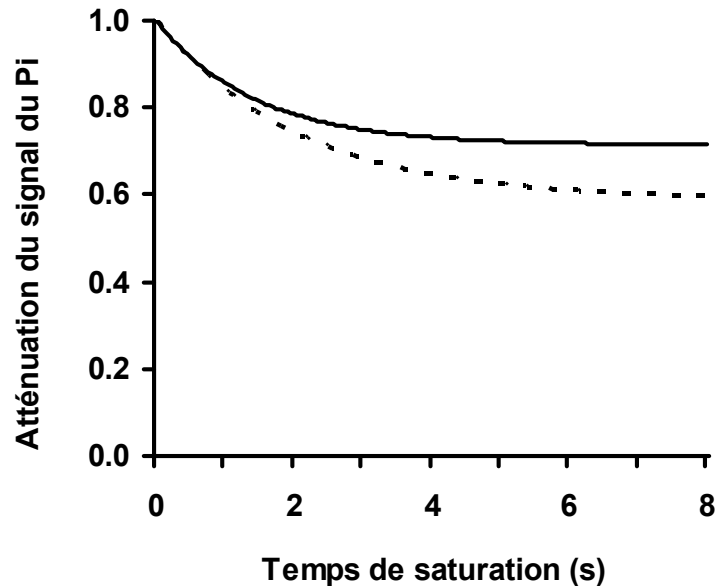


FIG. 6.8 – Sensibilité de  $V_{ATP}$  au champ statique  $B_0$  L'atténuation théorique du Pi en présence de saturation de l'ATP $\gamma$  présente une dépendance au champ statique  $B_0$ . Conséquence directe de l'allongement du temps de relaxation longitudinale, la sensibilité de la mesure de  $V_{ATP}$  augmente lorsque  $B_0$  augmente.

**Valeurs absolues de  $V_{ATP}$**  D'après la littérature, les valeurs des flux métaboliques énergétiques mesurées dans le cerveau humain par des techniques de différence artériovéineuse sont :  $CMR_{glc} = 0.31 - 0.42 \mu\text{mol}.g^{-1}.min^{-1}$  et  $CMR_{O_2}/CMR_{glu} = 5.5$  (Shulman and Rothman, 2004). En considérant que  $P/O_2 = 6$  pour une stoechiométrie complète, ces valeurs permettent d'estimer la valeur attendue de  $V_{ATP}$  à  $10 - 14 \mu\text{mol}.g^{-1}.min^{-1}$ . En basant son estimation sur des mesures de consommations métaboliques en oxygène et en glucose dans le cerveau humain, Atwell *et al.* a obtenu un  $V_{ATP}$  de  $14 \mu\text{mol}.g^{-1}.min^{-1}$  (Atwell and Laughlin, 2001). Corroborant les valeurs précédentes, l'étude de Lei *et al.* utilisant la technique de transfert de saturation pour la mesure de  $V_{ATP}$  chez l'homme a rapporté une valeur de  $V_{ATP}$  de  $12.1 \mu\text{mol}.g^{-1}.min^{-1}$  (Lei et al., 2003a).

Dans cette étude, nous trouvons une valeur de  $V_{ATP}$  beaucoup plus élevée chez les sujets sains ( $V_{ATP} (Contrôles) = 22.4 \pm 1.9 \mu mol.g^{-1}.min^{-1}$ ) que les valeurs précédemment rapportées dans la littérature. Cette surestimation de  $k_f$  et donc de  $V_{ATP}$ , pourrait être en premier lieu attribuée à une contamination musculaire. Cependant, le biais induit par cette contamination sur la valeur de  $V_{ATP}$  semble être négligeable puisque (i) le signal musculaire représente au maximum 8% du signal du Pi quantifié et que (ii) la valeur de  $k_f$  dans le muscle squelettique, incluant la synthèse réversible catalysée par GADPH et PGK, est de  $\approx 0.03s^{-1}$ , soit environ 10 fois plus faible que le  $k_f$  cérébral (Lebon et al., 2001).

**Biais de quantification** La différence fondamentale entre l'étude de transfert de saturation menée chez le primate sain (Partie II) et celle présentée dans cette partie est l'absence de localisation par OVS. Cette absence de localisation se traduit par la présence d'une ligne de base large située sous les résonances des métabolites d'intérêt, ligne de base visible sur les spectres acquis en impulsion/acquisition mais également, dans une moindre mesure, sur les spectres acquis par transfert de saturation. Cette ligne de base est composée de deux catégories de résonances provenant de deux types de molécules : l'hydroxyapatite des os crâniens et les phosphodiesteres des phospholipides membranaires partiellement mobiles (McNamara et al., 1994). La résonance d'environ 50ppm de largeur spectrale qui domine les spectres acquis par impulsion-acquisition chez l'homme (**Figure 6.3 (a)**) est absente des spectres localisés dans le cerveau de primate (**Figure 4.6**). Cette résonance peut donc être attribuée à la contribution de l'os. Les hydroxyapatites  $Ca_5(PO_4)_3(OH)$  osseuses donnent en effet naissance à une résonance similaire ( $\approx 50$ ppm de largeur à mi-hauteur) facilement détectable en RMN du  $^{31}P$ , comme cela a été montré dans les os de la main il y a déjà 20 ans (Brown et al., 1988). L'effet délétère de ces composantes larges sur la quantification des métabolites d'intérêt a été démontré (McNamara et al., 1994).

En l'absence de localisation spectroscopique, la ligne de base est modifiée de façon différente dans le cas d'une saturation de l'ATP $\gamma$  ou d'une saturation symétrique. Ces déformations étant très difficiles à prédire, la quantification des spectres acquis par transfert de saturation pourrait souffrir de biais significatifs. De plus, il est important de souligner que le traitement par AMARES n'inclut pas de ligne de base dans l'algorithme de quan-



tification, et ne peut donc pas inclure des *a priori* sur la forme de cette ligne de base. Par conséquent, il est probable que la méthode de quantification utilisée ici (adaptée de celle développée dans la partie précédente) soit à l'origine d'un biais de quantification systématique et relatif entre spectres saturés sur l'ATP $\gamma$  et spectres saturés à une fréquence symétrique.

Dans ce contexte, deux méthodes de quantification complémentaires ont été évaluées. Ces méthodes, toutes deux basées sur une quantification manuelle de l'atténuation des pics de résonance du Pi, avaient pour but de se prévaloir des variations de ligne de base.

- **Méthode N°1** : Après un lissage lorentzien de 8Hz, les spectres ont été convertis en module (et non pas en partie réelle) afin de minimiser les possibles erreurs de phase induites par des fluctuations de ligne de base. Sachant que la ligne de base large observée sur les spectres acquis par impulsion acquisition se situe entre -20 et 30ppm, nous nous sommes placés dans l'intervalle fréquentiel ne contenant pas de métabolites d'intérêt ni de composantes larges i.e. entre 30 et 50ppm. La ligne de base étant quasiment linéaire dans cet intervalle, une droite confondue avec la ligne de base a été tracée manuellement. L'amplitude de la résonance du Pi a été évaluée comme la hauteur entre le maximum du pic et la droite ainsi tracée selon une projection verticale (**Figure 6.9 (a)**).
- **Méthode N°2** : Après un lissage lorentzien de 8Hz, une droite reliant les pieds de la résonance du Pi ( $\approx 0.8\text{ppm}$  de part et d'autre du maximum du pic) a été tracée. L'amplitude de la résonance du Pi a été évaluée comme la hauteur entre le maximum du pic et la droite ainsi tracée selon une projection verticale (**Figure 6.10 (a)**).

Pour chacune des deux méthodes et pour chaque groupe de sujets, les atténuations du Pi ont été évaluées en triple aveugle sur les spectres moyennés pour chaque *tsat* et les trois valeurs ont été moyennées pour chaque spectre. Les atténuations du Pi ont ensuite été ajustées en fonction de *tsat* selon l'**Equation 6.1**. Cependant, afin de minimiser les erreurs possibles sur la détermination de  $k_f$ ,  $T_{1Pi}^{int}$  a cette fois été fixé à  $T_{1Pi}^{int}=2.1\text{s}$ , cette valeur étant la valeur moyenne des  $T_{1Pi}^{int}$  obtenus précédemment (moyennée sur les deux groupes de sujets). Pour chacune des deux méthodes, les points expérimentaux et les ajustements sont présentés en **Figures 6.9 (b)** et **6.10 (b)**. Les valeurs de  $k_f$  obtenues par ces deux méthodes sont les suivantes :

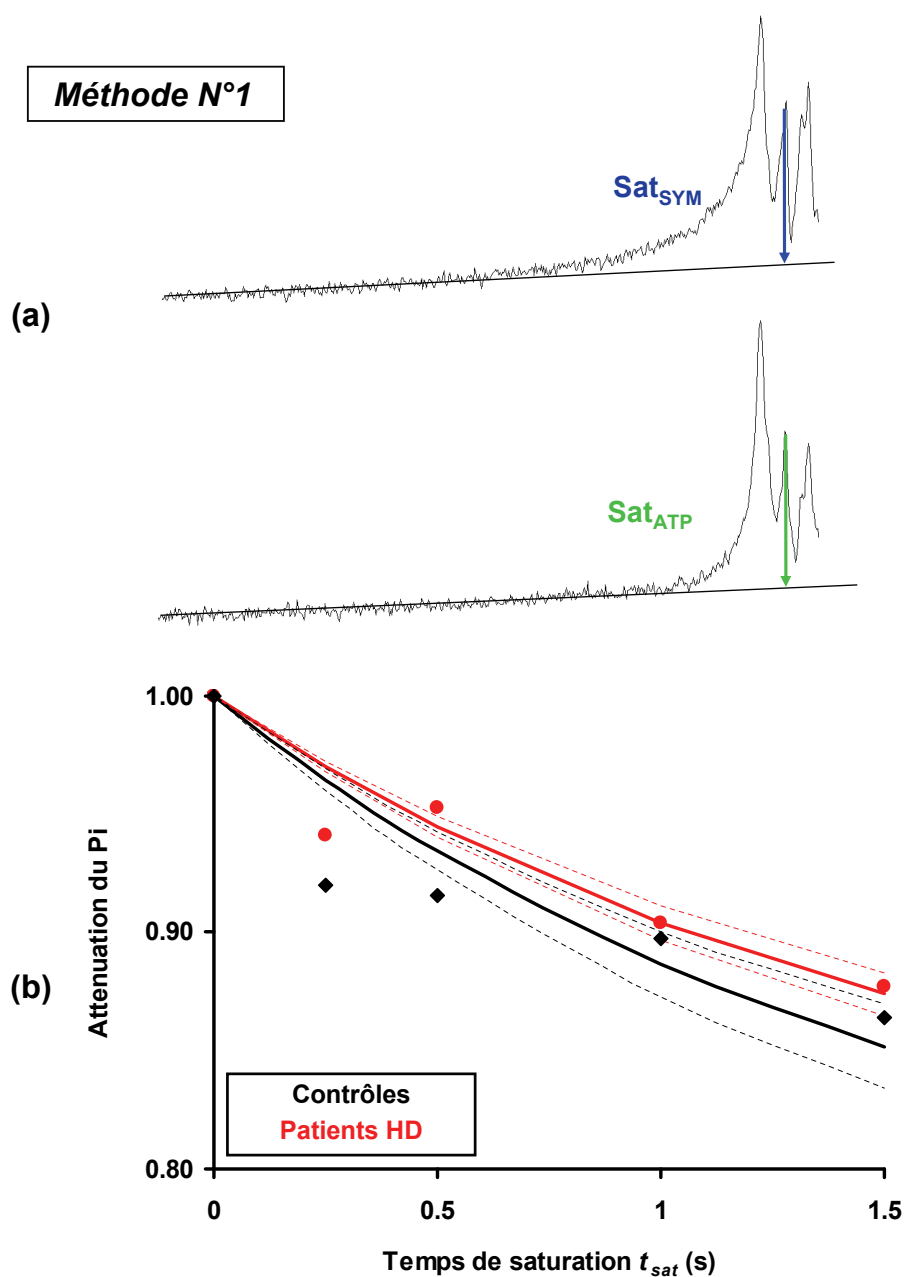


FIG. 6.9 – Méthode de quantification N°1 (a) Une droite confondue avec la ligne de base entre 30 et 50 ppm a été tracée manuellement. L'amplitude de la résonance du Pi a été évaluée comme la hauteur entre le maximum du pic et la droite ainsi tracée selon une projection verticale. (b) Atténuation du Pi  $\frac{M_{zPi}(tsat)}{M_{zPi}^{eq}}$  fonction du temps de saturation  $tsat$ . Les losanges et les ronds représentent les points expérimentaux, les lignes continues les meilleurs ajustements aux données expérimentales. Les lignes pointillées représentent les limites inférieures et supérieures de l'ajustement déterminées par simulation Monte Carlo.

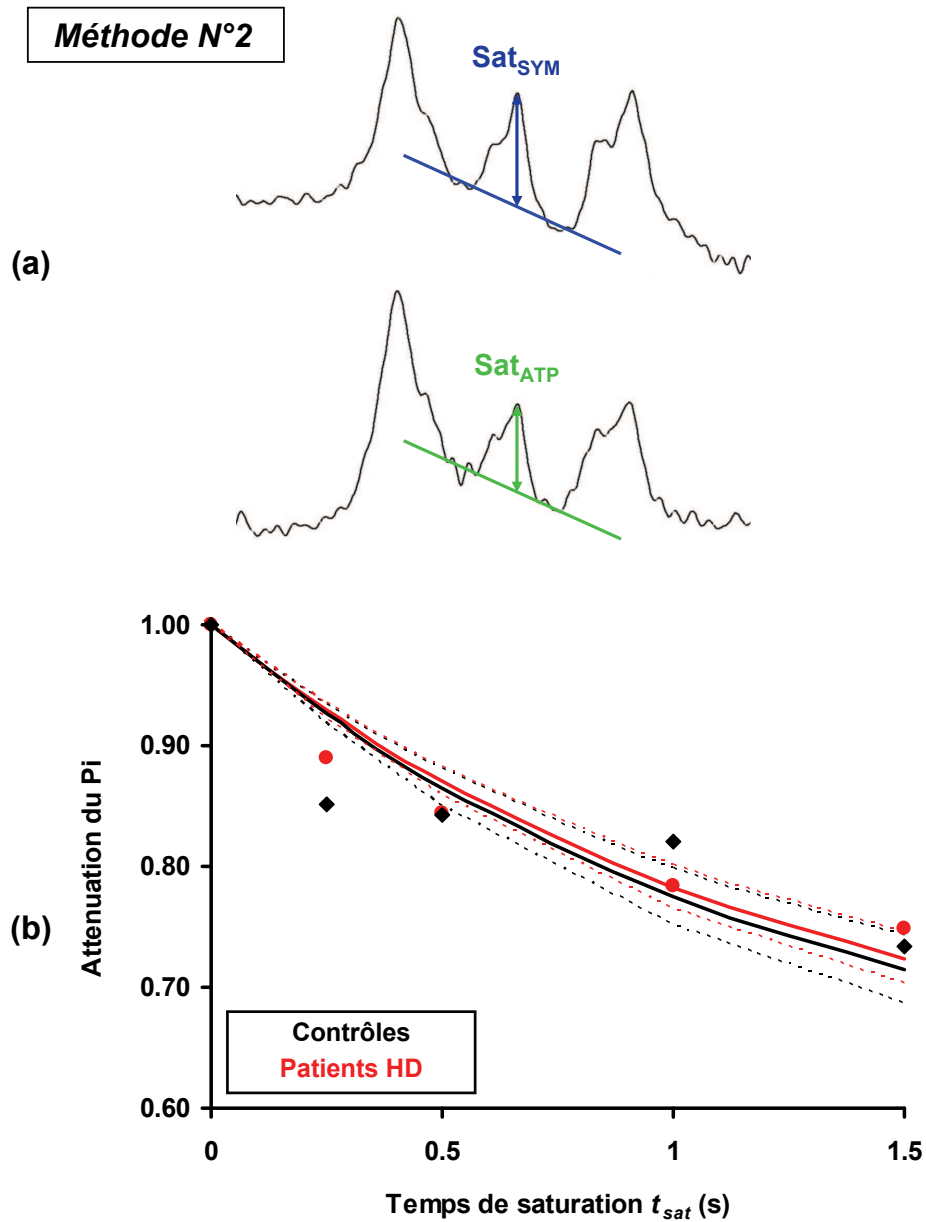


FIG. 6.10 – Méthode de quantification N°2 (a) Une droite reliant les pieds de la résonance du Pi ( $\approx 0.8\text{ppm}$  de part et d'autre du maximum du pic) a été tracée. L'amplitude de la résonance du Pi a été évaluée comme la hauteur entre le maximum du pic et la droite ainsi tracée selon une projection verticale. (b) Atténuation du Pi  $\frac{M_{zPi}(t_{sat})}{M_{zPi}^{eq}}$  fonction du temps de saturation  $t_{sat}$ . Les losanges et les ronds représentent les points expérimentaux, les lignes continues les meilleurs ajustements aux données expérimentales. Les lignes pointillées représentent les limites inférieures et supérieures de l'ajustement déterminées par simulation Monte Carlo.

**Méthode 1 :** (6.9)

$$k_f (\text{Contrôles}) = 0.15 \pm 0.02s^{-1} \quad (6.10)$$

$$k_f (\text{Patients HD}) = 0.13 \pm 0.01s^{-1}$$

**Méthode 2 :** (6.11)

$$k_f (\text{Contrôles}) = 0.33 \pm 0.04s^{-1} \quad (6.12)$$

$$k_f (\text{Patients HD}) = 0.31 \pm 0.03s^{-1}$$

(6.13)

D'où les valeurs de  $V_{ATP}$  suivantes :

**Méthode 1 :** (6.14)

$$V_{ATP} (\text{Contrôles}) = 11.9 \pm 1.5\mu\text{mol}.g^{-1}.min^{-1} \quad (6.15)$$

$$V_{ATP} (\text{Patients HD}) = 10.0 \pm 0.8\mu\text{mol}.g^{-1}.min^{-1}$$

**Méthode 2 :** (6.16)

$$V_{ATP} (\text{Contrôles}) = 25.6 \pm 3.1\mu\text{mol}.g^{-1}.min^{-1} \quad (6.17)$$

$$V_{ATP} (\text{Patients HD}) = 24.5 \pm 2.3\mu\text{mol}.g^{-1}.min^{-1}$$

Les différences importantes entre les valeurs déterminées par les deux méthodes peuvent s'expliquer par le fait que chacune de ces méthodes représente un cas extrême. En effet, dans la première méthode, la hauteur de la résonance du Pi inclut sûrement une contribution non négligeable du signal de la ligne de base. Au contraire, dans la seconde méthode, il est clair qu'aucune contribution large de la ligne de base n'est incluse dans la hauteur mesurée, et il est de plus probable que le signal mesuré ne soit pas le signal total du Pi mais seulement une partie. Par conséquent, une même atténuation de la hauteur de la résonance du Pi se traduira par une variation relative faible pour la première méthode et importante pour la seconde, ce qui explique les écarts observés. Ainsi, les valeurs de  $V_{ATP}$  déterminées par ces deux méthodes peuvent être considérées comme des valeurs extrêmes entre

lesquelles se situent les valeurs de  $V_{ATP}$  déterminées par AMARES ( $V_{ATP} (Contrôles) = 22.4 \pm 1.9 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ,  $V_{ATP} (Patients HD) = 14.8 \pm 2.4 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$

Concernant les variations entre groupes de sujets, une diminution de  $V_{ATP}$  chez les patients HD relativement aux contrôles est observée par la méthode 1 (diminution de 16%), par la méthode 2 (diminution de 4%) et par la méthode de quantification par AMARES (diminution de 35%). Par conséquent, malgré les imperfections associées à chaque technique de quantification, il existe bel et bien une tendance à la diminution de  $V_{ATP}$  dans le groupe de patients HD.

Cette étude a ainsi permis de montrer que, même si la méthode de transfert de saturation non localisée ne permet pas d'accéder à une valeur absolue de  $V_{ATP}$ , cette méthode permet de mettre en évidence une tendance à la baisse de  $V_{ATP}$  dans le cerveau des patients HD.

### 6.3.5 Séquence non localisée et interprétation des résultats

Toutes les mesures effectuées dans cette étude ( $V_{ATP}$ , pH et concentrations) sont des mesures cérébrales globales, caractérisant l'ensemble du cerveau. Or il est évident que, dans le groupe de patients HD notamment, le cerveau est loin d'être homogène. En particulier, ces patients présentent une atrophie corticale et striatale importante, conséquence de la neurodégénérescence. Ainsi, les mesures globales réalisées dans cette étude doivent être considérées comme des moyennes pondérées de mesures régionales. Il est en effet fort probable qu'il existe des aires cérébrales plus largement atteintes dans lesquelles les concentrations, le pH et/ou la vitesse de synthèse d'ATP seraient plus fortement modifiés. Il serait donc intéressant de pouvoir réaliser des mesures régionales, en particulier dans le striatum, afin de confirmer cette hypothèse. En particulier, au vu de la grande sensibilité de la mesure de pH (valeur individuelle accessible en 5min à 3 teslas), il serait intéressant d'effectuer une cartographie du pH cérébral à 7 teslas par CSI. Cette étude pourrait permettre de mettre en évidence des zones "chaudes" responsables de l'augmentation du pH cérébral global observé dans cette étude.

## 6.4 Conclusion et Perspectives

Cette étude a tout d'abord permis de mettre en évidence un maintien de l'homéostasie métabolique dans le cerveau de patients HD, et ce malgré la présence d'une atrophie cérébrale importante. Ceci confirme que la viabilité d'une cellule semble être majoritairement conditionnée par le maintien de ses concentrations métaboliques. Dans un second temps, une tendance à la baisse de la vitesse de synthèse d'ATP  $V_{ATP}$  a pu être mise en évidence dans le groupe de patients HD. Cependant, la faible sensibilité de la mesure de  $V_{ATP}$  ne permet pas d'obtenir des données individuelles et, même sur des études de groupes, cette sensibilité semble insuffisante pour obtenir des spectres facilement interprétables, tout du moins à 3 teslas. La technique de transfert de saturation apparaît ainsi difficilement applicable à des études cliniques humaines, bien qu'elle permette théoriquement d'accéder à une mesure majeure du métabolisme énergétique cérébral.

Enfin, cette étude a permis de montrer qu'une alcalinisation du pH intracérébral était détectée dans le groupe de patients HD. La sensibilité élevée de la mesure du pH par spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$  permet d'obtenir des valeurs individuelles précises en un temps d'examen court (de l'ordre de 5 minutes dans cette étude). La mesure du pH se présente ainsi comme un biomarqueur potentiellement intéressant. Cependant, les patients sur lesquels cette étude a été menée étaient tous des patients post-symptomatiques présentant donc un stade avancé de la pathologie. Il est ainsi très difficile de savoir si les variations de pH mesurées dans cette étude sont une conséquence de la modification tissulaire entraînée par la neurodégénérescence ou si elles reflètent des altérations métaboliques intracellulaires. Afin de répondre à cette question, il aurait été intéressant de poursuivre cette étude par une autre étude humaine sur une large cohorte de patients HD présymptomatiques et de patients à stade précoce. Cette étude aurait ainsi permis de savoir si le pH intracérébral pouvait être un biomarqueur prédictif de la survenue des symptômes. Cependant, les études menées sur des cohortes de patients sont des études lourdes et extrêmement longues. Par conséquent, une vérification de l'hypothèse du pH comme biomarqueur précoce se devait d'être tout d'abord menée sur un modèle animal de la MH.

*Ce travail a fait d'une communication affichée au 15<sup>me</sup> congrès de l'ISMRM (Poster N°2138, ISMRM, Berlin 2008).*



## Chapitre 7

# Mesure du pH cérébral par RMN du $^{31}\text{P}$ dans le modèle rongeur de la maladie de Huntington

L'étude clinique décrite dans le chapitre précédent a permis de mettre en évidence une augmentation significative du pH global dans le cerveau des patients HD. Cependant, ces patients présentant tous un stade avancé de la pathologie, il est difficile de savoir à quel point la variation de pH observée reflète une altération métabolique plus qu'une modification histologique macroscopique. En effet, les patients inclus dans l'étude précédente présentaient tous une atrophie corticale majeure et donc une modification des fractions cellulaire et liquidienne cérébrales. Dans ce contexte, nous avons voulu vérifier la pertinence de la mesure du pH cérébral comme biomarqueur métabolique précoce de la neurodégénérescence dans la MH. Pour ce faire, nous avons décidé de mesurer le pH cérébral dans un modèle de rat intoxiqué au 3NP de façon chronique.

*Cette étude a été réalisée au laboratoire de RMN de l'Association Institut de Myologie (AIM, Pitié Salpêtrière, Paris).*



## 7.1 Matériel et Méthodes

### 7.1.1 Système RMN

#### Imageur

Le système RMN utilisé dans cette étude est composé d'un aimant 4 teslas (Magnex, Abingdon, UK) interfacé à un spectromètre/imageur BioSpec Advance (Bruker Biospin, Ettlingen, Allemagne). Le diamètre interne de l'aimant est de 46 cm (**Figure 7.1 (a)**). Pour cette étude, un insert de gradient ( $\varnothing$  20cm,  $200\text{mT}\cdot\text{m}^{-1}$ , temps de montée  $260\mu\text{s}$ ) a été utilisé. La correction des inhomogénéités de champ  $B_0$  était simplement effectuée au premier ordre ( $x, y, z$ ) par les bobines de gradients. La commande du système s'effectuait depuis une console Linux équipée du logiciel Bruker Paravision 3.0.2 (**Figure 7.1 (b)**).

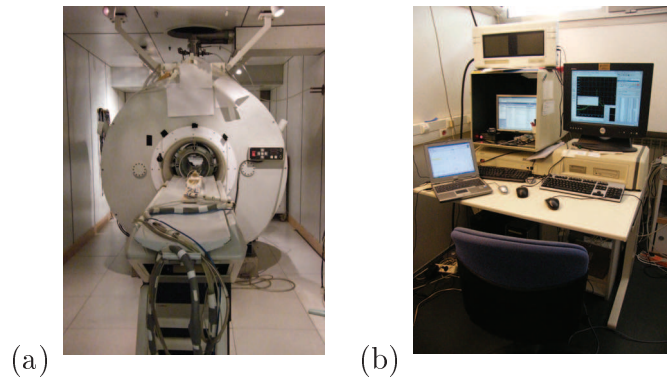


FIG. 7.1 – (a) Système RMN 4 teslas de l'AIM (b) Salle de pilotage de l'imageur 4T

#### Sondes

**Sonde  $^{31}\text{P}$**  Afin d'effectuer une mesure localisée de pH dans le cerveau de rat, nous avons décidé d'utiliser une sonde RMN surfacique simple accord résonant à la fréquence du  $^{31}\text{P}$ , soit  $68.97\text{MHz}$  à 4 teslas. En terme de rapport signal sur bruit, l'utilisation de ce type de sonde est en effet préférable, au vu du faible volume d'intérêt cérébral et de la faible profondeur de ce volume par rapport à la surface de la tête. Le cerveau du rat étant centré à une profondeur d'environ 1 cm de la surface supérieure du crâne, nous avons décidé de réaliser une sonde de diamètre  $\varnothing 2.5\text{cm}$  afin de maximiser la sensibilité

de détection de la sonde ainsi que l'homogénéité des impulsions RF émises dans le VOI. Le circuit résonant réalisé est un circuit électrique résonant simple dont le schéma est présenté en **Figure 7.2**. La boucle résonante d'inductance  $L=9.53 \times 10^{-4} \text{H}$  a été réalisée à partir de fil de cuivre creux (diamètre externe  $\varnothing 3 \text{mm}$ , diamètre interne  $\varnothing 0.7 \text{mm}$ ). Les valeurs des condensateurs variables ( $C_T$  permettant l'accord en fréquence et  $C_M$  permettant l'adaptation d'impédance du circuit) ont été dérivées des formules théoriques classiques, conduisant à :  $C_M=111\text{-}126 \text{pF}$ ,  $C_T=1\text{-}10 \text{pF}$ .

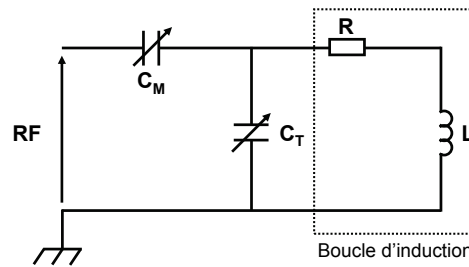


FIG. 7.2 – Schéma d'un circuit électrique résonant simple

Les facteurs de qualité de la sonde ainsi conçue (à vide  $Q_{vide}$  et chargée  $Q_{charge}$ ) ont été estimés à l'aide d'un analyseur de réseau. Les valeurs suivantes ont été obtenues :  $Q_{vide} = 120$  et  $Q_{charge} = 90$ . Pour l'émission, la sonde est raccordée par un câble coaxial d'impédance  $50 \Omega$  à un amplificateur de puissance (1kW, Dressler HF technik, Stolberg-Vicht, Allemagne). Pour la réception, elle est reliée à un étage de préamplification.

**Sonde  $^1\text{H}$**  La sonde  $^1\text{H}$  utilisée dans cette étude est une sonde de surface Bruker simple accord de diamètre 5cm ( $f_0=170.28 \text{MHz}$  à 4 teslas). Cette sonde a été utilisée afin (i) d'effectuer les procédures de shim, (ii) de réaliser les sessions d'imagerie rapide permettant le positionnement du VOI et (iii) d'obtenir des images anatomiques permettant la détection des lésions. Pour l'émission, la sonde est raccordée par un câble coaxial d'impédance  $50 \Omega$  à un amplificateur de puissance (2kW, Dressler HF technik, Stolberg-Vicht, Allemagne). Pour la réception, elle est reliée à un étage de préamplification.

### 7.1.2 Animaux et protocole d'intoxication

**Choix du protocole et du modèle animal** L'objectif principal de cette étude étant de déterminer si des variations de pH intracérébral pouvaient être détectées à un stade précoce de la MH, nous avons utilisé un protocole d'intoxication chronique au 3NP permettant le suivi des rongeurs sur cinq jours avant apparition de lésions cérébrales. Rappelons que le 3NP est une toxine mitochondriale, inhibant spécifiquement le complexe II (SDH) de la chaîne respiratoire, dont l'administration induit un phénotype ressemblant fortement au phénotype de la MH (Brouillet et al., 1995) (Chapitre 1). Nous avons choisi d'utiliser le modèle d'intoxication chronique développé et caractérisé par Bizat *et al.* au SHFJ (Blum et al., 2002b, Blum et al., 2002a, Bizat et al., 2003b, Bizat et al., 2003a, pour revue voir Brouillet et al., 2005). Dans ce modèle, une dose de  $54 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$  est injectée de façon continue par une pompe osmotique implantée en sous cutané dans le dos des animaux. Les caractéristiques principales de ce modèle sont (i) une apparition de lésions cérébrales (en particulier striatales) dans les 5 à 6 jours suivant l'implantation et (ii) une augmentation progressive d'inhibition de la SDH atteignant 50 à 60% au bout de trois jours.

Le protocole expérimental d'intoxication et de suivi par RMN est décrit dans le **Tableau 7.1**.

Jour	Intoxication	Suivi RMN
-1	Préparation de la solution de 3NP	Mesure spectroscopique du pH Imagerie haute résolution
0	Implantation des pompes osmotiques	
1		Mesure spectroscopique du pH Imagerie haute résolution
3		Mesure spectroscopique du pH Imagerie haute résolution
5		Mesure spectroscopique du pH Imagerie haute résolution

TAB. 7.1 – Protocole expérimental d'intoxication chronique et de suivi des animaux par RMN

**Animaux** L'étude a été conduite sur cinq rats Lewis (masse  $336 \pm 9\text{g}$ )(Charles River Laboratories, Wilmington, MA) âgés de 10 semaines au début du protocole d'intoxication.

L'ensemble des procédures a été conduit en accord strict avec les recommandations de la Communauté Européenne (86/609) et du Comité National Français (87/848) pour l'utilisation et le soin des animaux de laboratoire.

**Préparation des pompes osmotiques** *Tous les produits chimiques cités dans le protocole ci-dessous ont été commandés chez Sigma (L'Isle d'Abeau Chesnes, France), sauf précision contraire.*

Dans le modèle chronique que nous souhaitions utiliser, une solution de 3NP est délivrée par infusion continue à une dose de  $54 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  à l'aide de mini-pompes osmotiques implantées en position sous cutanée dans le dos des animaux (débit  $10 \mu\text{l/hr}$ , modèle 2ML1; Alzet, Palo Alto, CA)(Dautry et al., 2000, Garcia et al., 2002, Mittoux et al., 2002, Blum et al., 2002b, Blum et al., 2002a, Blum et al., 2003, Bantubungi et al., 2005, Bizat et al., 2003b, Bizat et al., 2003a, Yang et al., 2005a, Yang et al., 2005b).

Afin de réaliser une solution mère de 3NP, nous avons tout d'abord déterminé la masse du rat le plus lourd ( $M_{\text{rat max}} = 349\text{g}$ ). La concentration de la solution mère de 3NP  $C_{3NP}$  a été dérivée de cette valeur, connaissant également le débit réel du lot de pompes osmotiques utilisé dans cette étude ( $D_{\text{pompes}} = 9.87 \mu\text{L.h}^{-1}$ ) et la dose de 3NP à injecter ( $Dose = 54 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ).

$$\begin{aligned} C_{3NP} &= \frac{M_{\text{rat max}} \times Dose}{24 \times D_{\text{pompes}}} \\ C_{3NP} &= 79.56 \text{ mg.mL}^{-1} \end{aligned} \quad (7.1)$$

Afin d'obtenir une quantité suffisante de solution mère, nous avons choisi de préparer un volume final  $V_f = 30 \text{ mL}$ , ce qui correspond à la dissolution d'une masse  $M=2387 \text{ mg}$  de 3NP. La solution mère a ensuite été préparée de la façon suivante :

*Une masse  $M=2387 \text{ mg}$  de 3NP a tout d'abord été dissoute dans  $3 \text{ mL}$  d'eau injectable ( $\text{H}_2\text{O ppi}$ ) dans un bécher de  $50 \text{ mL}$ . Le dosage pHmétrique suivant a ensuite été réalisé sous agitation continue : de la soude  $\text{NaOH } 5\text{N}$  a été ajoutée goutte à goutte au mélange afin d'amener le pH à un pH proche du pH physiologique ( $\approx 7.4$ ). Afin de stabiliser le pH*

obtenu, un volume correspondant à 5% du volume final (ici 1.5mL pour un volume final de 30mL) d'une solution de tampon phosphate 1M a été ajoutée au mélange. De l'eau injectable a ensuite été ajoutée afin d'amener le mélange au volume final souhaité ( $V_f = 30\text{mL}$ ). Enfin, le mélange a été filtré sur papier Watman afin d'éliminer les impuretés.

Un volume de 2.5mL de solution de concentration adaptée est ensuite préparé pour chaque pompe (sachant que le volume d'une pompe osmotique est  $V_{pompes} = 2\text{mL}$ ). Dans le **Tableau 7.2** sont rapportées les concentrations en 3NP dans chaque pompe osmotique pour chacun des cinq rats. Ces pompes ont ensuite été placées en position sous cutanée dans le dos des animaux au cours d'une anesthésie induite par injection i.m. d'un mélange de kétamine ( $100\text{mg.kg}^{-1}$ ) et de xylazine ( $15\text{mg.kg}^{-1}$ ).

N° Rat	Masse (g)	Concentrations en 3NP dans pompes ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )	Volume final par tube (2.5mL)	
			3NP mère	$\text{H}_2\text{O}$ ppi
1	338	77.05	2.42	0.08
2	336	76.60	2.41	0.09
3	349	79.56	2.50	0.00
4	328	74.77	2.35	0.15
5	328	74.77	2.35	0.15

TAB. 7.2 – Concentrations en 3NP dans chaque pompe osmotique pour chacun des cinq rats.

### 7.1.3 Positionnement et anesthésie des rongeurs

**Positionnement des sondes** Le positionnement des sondes  $^1\text{H}$  et  $^{31}\text{P}$  est visible sur la **Figure 7.3**. Les deux boucles de surface sont positionnées de façon concentrique de part et d'autre de la tête du rongeur. Cette configuration maximise les sensibilités respectives des deux sondes par rapport au VOI. Des tests simples (évaluant l'accord en fréquence et le rapport signal sur bruit) ont également permis de montrer que les couplages induits entre les deux sondes étaient négligeables dans cette configuration.

**Anesthésie des rongeurs** L'anesthésie est tout d'abord induite par un mélange d'isoflurane à 5% dans l'air (AERane, Abbott Laboratories, N. Chicago, IL, USA )(débit  $1.5\text{mL.min}^{-1}$ ) puis maintenue par un mélange d'isoflurane à 2% dans l'air (débit  $1.5\text{mL.min}^{-1}$ ).

Le pourcentage d'isoflurane est adapté au cours des acquisitions afin de maintenir la fréquence de respiration dans la gamme physiologique (environ  $75 \text{ cycles} \cdot \text{min}^{-1}$ ).

**Positionnement des rongeurs** L'ensemble du dispositif expérimental est fixé sur un support rigide permettant un positionnement stable et reproductible dans le tunnel de l'imageur. Ce dispositif comprend (**Figure 7.3**) :

- Un système de réchauffement par circulation d'eau chaude permettant de maintenir la température corporelle des rongeurs pendant l'anesthésie.
- Un capteur de pression permettant de suivre en temps réel les cycles de respiration des rongeurs.
- Un système de circulation d'air permettant de délivrer le mélange anesthésique air/isoflurane et d'extraire l'air expiré.
- La sonde  $^1\text{H}$ , directement fixée sur le support.
- La sonde  $^{31}\text{P}$ , directement fixée sur le masque d'anesthésie.

#### 7.1.4 Acquisitions

**Imagerie anatomique pour la détection de lésions** Une séquence d'imagerie anatomique pondérée en T2 a été optimisée pour la détection de lésions cérébrales : type RARE, TE/TR=60/3000ms, matrice  $192 \times 192$ ,  $300 \mu\text{m}$  de résolution dans le plan, 11 coupes axiales de 1mm, TA=4 :30min.

**Paramétrisation d'une séquence optimisée pour la mesure du pH cérébral** La séquence utilisée pour la mesure localisée du pH cérébral est une séquence de type PRESS (Point RESolved Spectroscopy) (Bottomley, 1987). Pour rappel, cette méthode, décrite par un double écho de spin, consiste à appliquer une impulsion d'excitation spatialement sélective ( $90^\circ$ ) selon une direction puis deux impulsions de refocalisation spatialement sélectives ( $180^\circ$ ) suivant les deux directions restantes (**Figure 7.4**).

Cette méthode permet donc d'acquérir un signal localisé provenant uniquement d'un volume choisi. Dans notre étude, le voxel d'intérêt était un voxel de  $10 \times 7 \times 8 \text{mm}^3$ , soit  $560 \mu\text{L}$ , englobant la quasi totalité du cerveau (**Figure 7.7 (a)**). Les paramètres de la séquence optimisée pour la mesure de pH étaient les suivants : TE/TR=8.1/4000ms, 1024

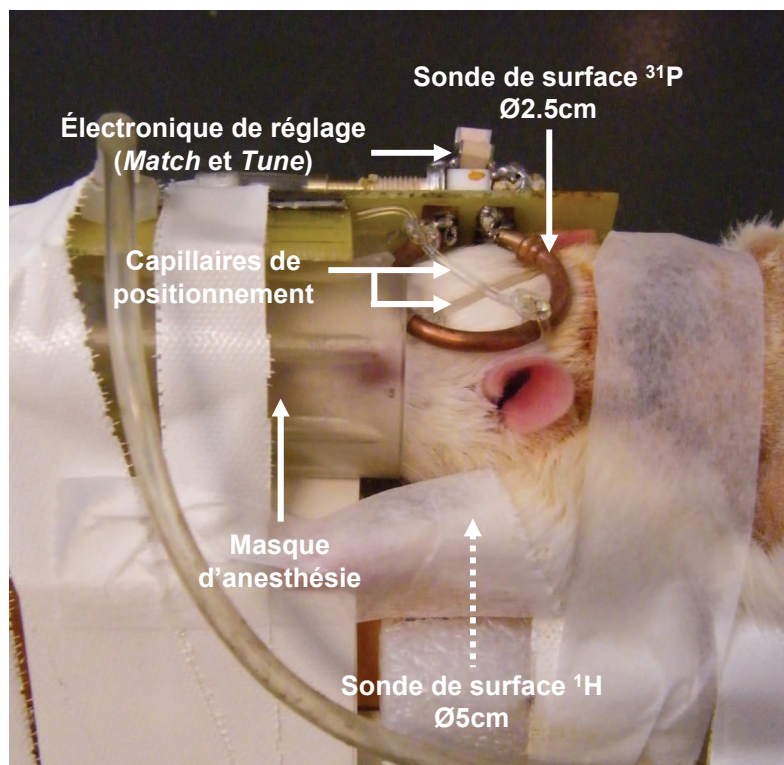
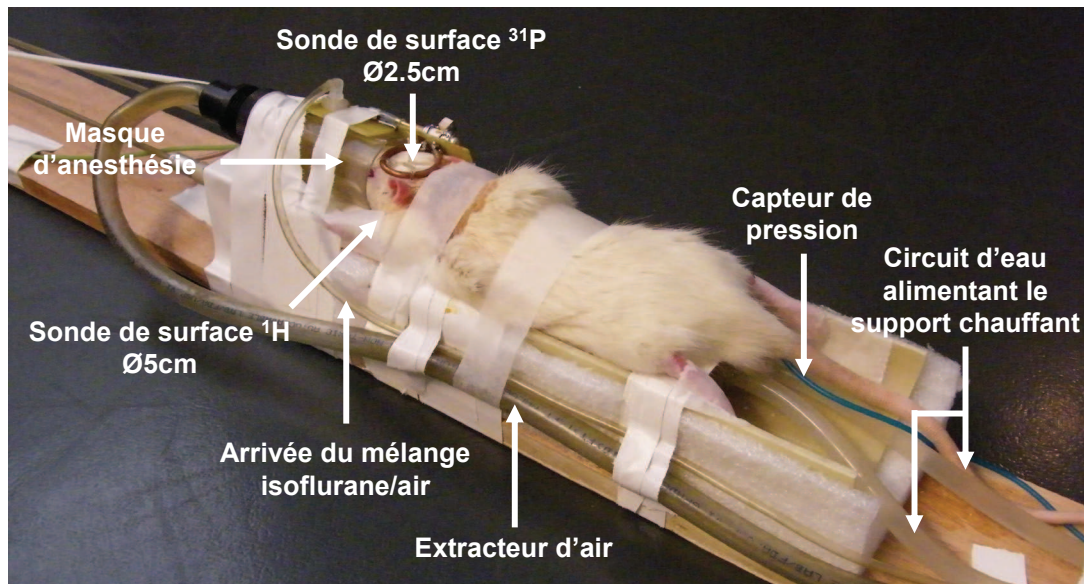


FIG. 7.3 – **Dispositif expérimental** L'ensemble du dispositif est fixé sur un support rigide permettant un positionnement stable et reproductible dans le tunnel de l'imageur. Ce dispositif comprend un système de réchauffement par circulation d'eau chaude, un capteur de pression permettant de suivre en temps réel les cycles de respiration des rongeurs, un système de circulation d'air permettant de délivrer le mélange anesthésique air/isoflurane et d'extraire l'air expiré et les deux sondes ( $^1\text{H}$  et  $^{31}\text{P}$ ).

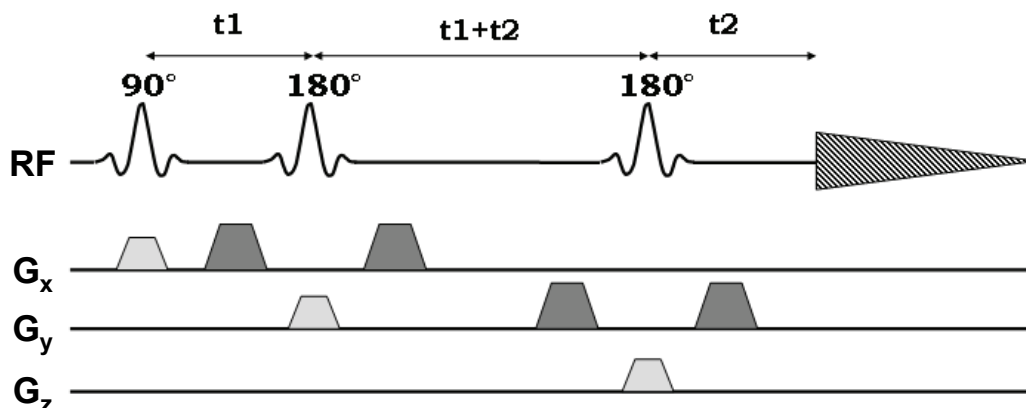


FIG. 7.4 – Séquence de type PRESS utilisée pour la mesure du pH intracérébral

points, largeur spectrale 5900Hz (86ppm). Les intensités des gradients utilisés sont de  $G_x = 2300\text{Hz.cm}^{-1}$ ,  $G_y = 3286\text{Hz.cm}^{-1}$  et  $G_z = 2879\text{Hz.cm}^{-1}$ . Les impulsions d'excitation ( $2000\mu\text{s}$ , 2300Hz) et de refocalisation ( $1240\mu\text{s}$ , 2300Hz) étaient de type Hermite. La calibration des impulsions d'excitation et de refocalisation a été réalisée au préalable sur un fantôme sphérique ( $\varnothing$  1cm) contenant une solution 1M d'acide phosphorique ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  tamponné à pH=7, 1M). Le choix de ce fantôme a été justifié par le fait que son volume était comparable à celui du VOI choisi. Le positionnement de ce fantôme lors de la calibration a été réalisé afin de reproduire au mieux le positionnement du cerveau par rapport aux deux sondes RMN.

Comme nous l'avons vu dans la seconde partie de ce manuscrit, le choix d'une séquence PRESS pour la détection du signal  $^{31}\text{P}$  cérébral n'est pas le plus optimal, en raison principalement du T2 court des métabolites phosphorés. Il aurait été plus pertinent d'utiliser une localisation par OVS telle que celle réalisée chez le primate. Cependant, le 3 teslas du SHFJ, sur lequel avaient été implémentés les modules d'OVS, n'était plus en service au moment où cette étude a été initiée. Ainsi, ce travail a été réalisé sur le système RMN 4 teslas du laboratoire de l'AIM (Pitié Salpêtrière). Pour des questions pratiques de temps et de disponibilités, il ne nous a pas été possible d'implémenter les modules d'OVS sur ce système. Nous avons donc choisi d'utiliser un type de séquence classique déjà implémenté sur le spectromètre 4 teslas. Une séquence PRESS a été choisie afin de maximiser le rapport signal sur bruit, paramètre critique dans cette étude.



**Protocole d'acquisition** Quatre sessions expérimentales ont été réalisées sur chaque animal, une session avant implantation (Ctrl), et une session à J1, J3 et J5.

Au début de chaque session, une image de repérage est acquise afin de positionner le VOI cérébral (type FLASH, TE/TR=3.4/250ms, FOV=80×80mm, matrice 128×128, 9 coupes axiales d'épaisseur 2mm) et de le shimmer ( $\approx 15\text{Hz}$  de largeur à mi-hauteur sur le pic de l'eau). Puis, au cours de chaque session, deux spectres PRESS  $^{31}\text{P}$  (1024 accumulations, TA=1h08min) sont acquis successivement. Au vu de la longue durée d'acquisition de ces spectres, une image de repérage est réalisée entre l'application des deux séquences PRESS afin de s'assurer de l'immobilité de l'animal au cours de l'expérience. En cas de faible mouvement, le VOI est repositionné et les procédures de shim réalisées à nouveau. Les deux spectres ainsi acquis sont ensuite phasés et sommés (après rephasage et recalage en fréquence si mouvement). Enfin, une image anatomique est acquise.

### 7.1.5 Traitement des données

Pour chaque jour de suivi (Ctrl, J1, J3 et J5), les spectres PRESS  $^{31}\text{P}$  acquis sur les cinq rats sont sommés. Une procédure de *zero filling* à 2048 points est appliquée à chaque spectre somme avant quantification par la méthode AMARES sous jMRUI (Vanhamme et al., 1997) en utilisant la base de 13 métabolites décrite dans la partie précédente. Les valeurs des fréquence de résonance et de largeur de raies utilisées pour la quantification sont reportées dans le **Tableau 7.3**. Les valeurs de couplage et de contraintes souples ou dures appliquées dans cette étude sont également celles décrites dans la partie précédente. Cependant, dans cette étude, aucune contrainte n'a été imposée sur la détermination des phases d'ordre zéro et d'ordre un et aucune procédure de troncature des premiers points n'a été réalisée.

Cette méthode de quantification a permis de déterminer les fréquences de résonance du Pi et de la PCr, ainsi que les écarts-types sur la détermination de ces fréquences. Le pH a ensuite été calculé à partir de la valeur de l'écart fréquentiel entre Pi et PCr en utilisant les valeurs suivantes :  $\delta_{HA}=3.23$ ,  $\delta_A=5.70$  et  $\text{pKa}=6.77$ .

Métabolite	Delta (ppm)	Delta (Hz)	LW (ppm)	LW (Hz)
PE	6.8	469.00	0.35	24.14
PSer	6.49	447.62	0.32	22.07
PC	6.2	427.61	0.35	24.14
DPG (1)	5.23	360.71	0.15	10.35
DPG (2)	5.71	393.82	0.15	10.35
Pi	4.8	331.06	0.37	25.52
GPE	3.5	241.40	0.4	27.59
GPC	2.9	200.01	0.4	27.59
MP	2.25	155.18	1.62	111.73
PCr	0	0	0.19	13.10
ATP $\gamma$ (1)	-2.38	-164.15	0.36	24.83
ATP $\gamma$ (2)	-2.68	-184.84	0.36	24.83
ATP $\alpha$ (1)	-7.33	-505.55	0.37	25.52
ATP $\alpha$ (2)	-7.71	-531.76	0.37	25.52
NAD	-8.37	-577.28	0.42	28.97
ATP $\beta$ (1)	-16.03	-1105.59	0.42	28.97
ATP $\beta$ (2)	-16.26	-1121.45	0.39	26.90
ATP $\beta$ (3)	-16.49	-1137.32	0.42	28.97

TAB. 7.3 – Les fréquences de résonance (Delta) ainsi que les largeurs de raies (LW) de chaque lorentzienne intervenant dans la base ont été calculées à partir du T2 et des constantes de couplage J données dans la littérature (Govindaraju et al., 2000).

## 7.2 Résultats

### 7.2.1 Suivi des animaux

Un suivi physiologique et comportemental des animaux a été réalisé au cours de l'étude afin de vérifier l'effet de l'intoxication au 3NP. Avant chaque session d'imagerie, les animaux ont été pesés. L'évolution du poids des animaux au cours de l'étude est présentée en **Figure 7.5**. Au bout de 5 jours post implantation, une perte de poids de  $\approx 15\%$  est mesurée. Dans le modèle étudié, il a empiriquement été déterminé que cette perte de poids pouvait être considérée comme un seuil à partir duquel des lésions striatales sont susceptibles d'apparaître.

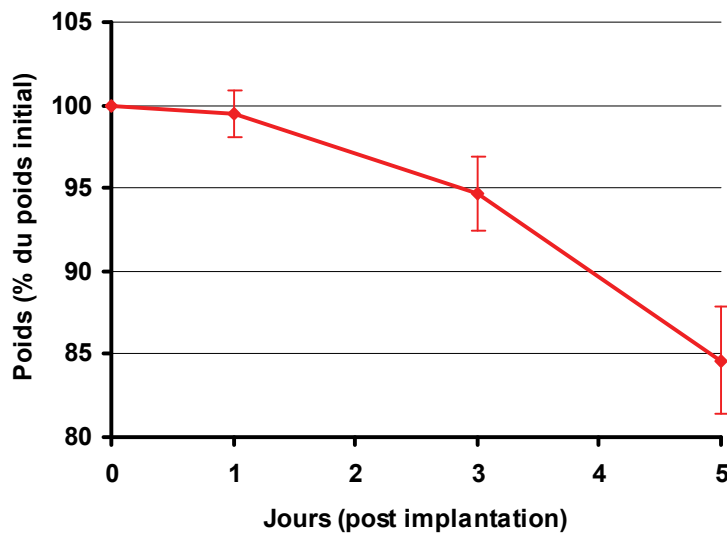


FIG. 7.5 – Evolution du poids des animaux au cours du protocole d'intoxication. Au bout de cinq jours post implantation, une perte de poids de  $\approx 15\%$  est mesurée.

Un suivi comportemental a également été réalisée au cours de l'étude. A J1, aucun changement comportemental n'était visible. A J3, une attitude de prostration associée à une perte de tonus commençait à apparaître chez tous les animaux. A J5, les animaux étaient couchés sur le flanc (*recubent*) et présentaient des mouvements stéréotypés des pattes

avants (*padding*). Une certaine rigidité musculaire était également visible.

### 7.2.2 Détections de lésions

Sur la **Figure 7.6** sont présentées les images anatomiques acquises sur un même rat pour chaque jour d'intoxication. Une sonde de surface ayant été utilisée pour l'émission RF, il n'a pas été possible d'obtenir un niveau de signal homogène sur l'ensemble du cerveau. Cependant, l'essentiel du VOI détecté en PRESS présente un signal relativement homogène. Aucune lésion corticale ou striatale n'est visible entre J0 et J3. A J5 cependant, un hypersignal T2 massif, caractéristique d'une lésion cérébrale, est visible au niveau des deux striata.

### 7.2.3 Mesure du pH cérébral

Un exemple de spectre somme acquis à J1 est présenté en **Figure 7.7 (b)**. La quantification de ce même spectre somme est présentée en **Figure 7.8**. Le **Tableau 7.4** présente les valeurs de fréquences et de pH déterminées par la méthode AMARES pour chaque jour de suivi. La **Figure 7.9** représente l'évolution du pH cérébral en fonction des jours de suivi.

Jour	$\delta\text{Pi}$	$\delta\text{PCr}$	$\delta(\text{Pi-PCr})$	pH
J0	$4.92 \pm 0.034$	$0.00 \pm 0.003$	$4.89 \pm 0.034$	$7.08 \pm 0.03$
J1	$4.96 \pm 0.028$	$0.01 \pm 0.003$	$4.93 \pm 0.028$	$7.11 \pm 0.02$
J3	$5.02 \pm 0.025$	$0.00 \pm 0.003$	$5.00 \pm 0.025$	$7.17 \pm 0.02$
J5	$4.97 \pm 0.027$	$-0.01 \pm 0.003$	$4.94 \pm 0.027$	$7.12 \pm 0.02$

TAB. 7.4 – Valeurs des fréquences de résonance du Pi ( $\delta\text{Pi}$ ), de la PCr ( $\delta\text{PCr}$ ) et du pH intracérébral (moyenne  $\pm$  écart-type) déterminées par la méthode AMARES pour chaque jour de suivi.

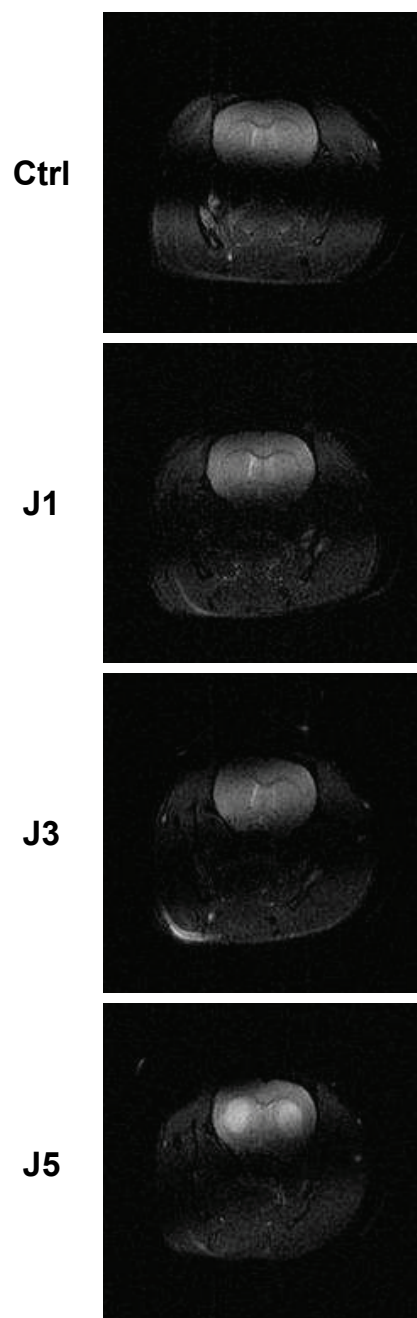


FIG. 7.6 – Images RARE 2D acquises au cours du protocole d'intoxication Une coupe axiale passant par le striatum est ici représentée. Les images contrôles (Ctrl) et acquises à J1 et J3 sont similaires. Par contre, sur l'image acquise à J5, deux hypersignaux T2 massifs, caractéristiques de lésions cérébrales, sont visibles au niveau des deux striata.

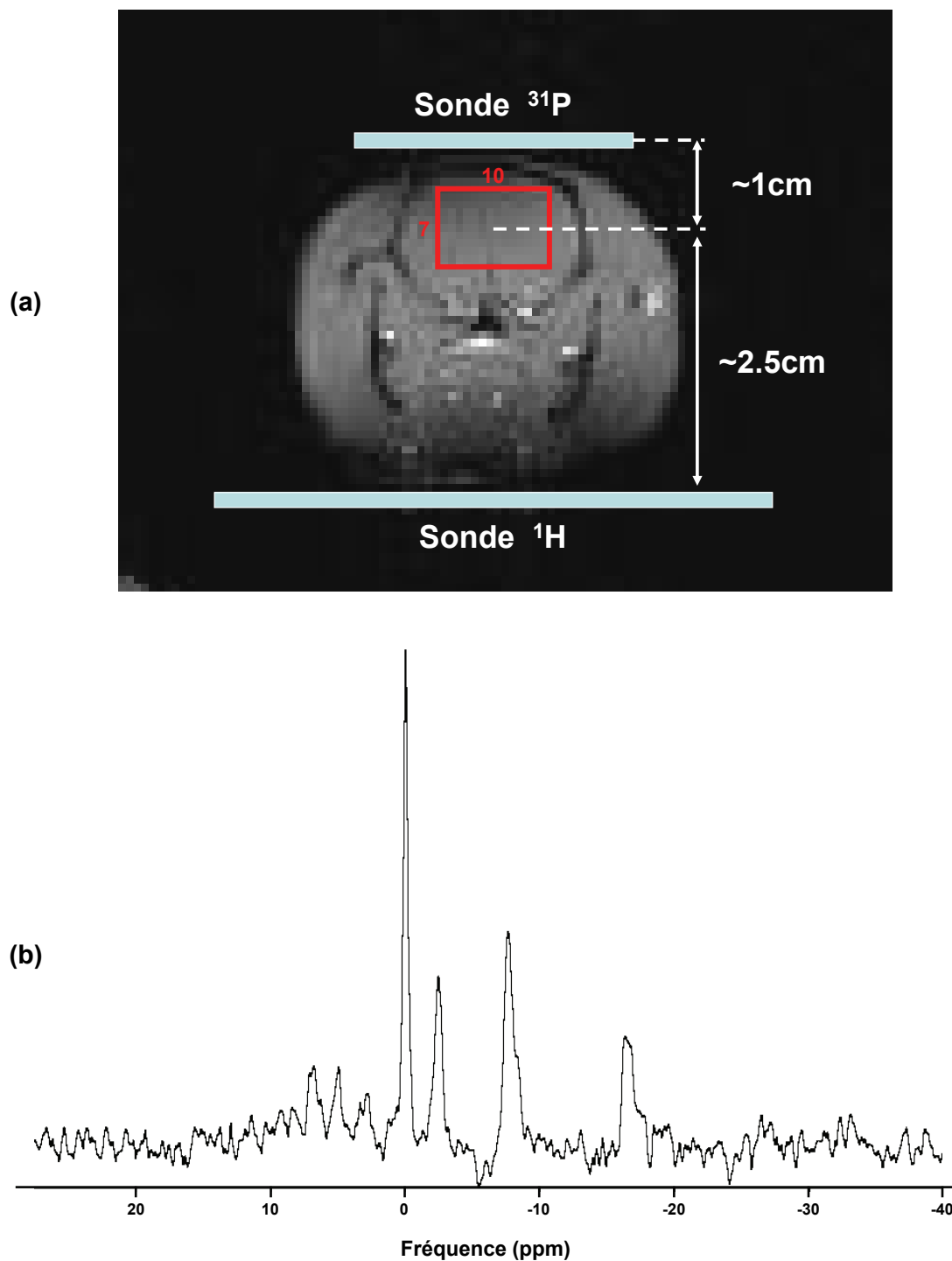


FIG. 7.7 – (a) Positionnement du VOI de  $560\mu\text{L}$  et positions respectives des sondes  $^1\text{H}$  et  $^{31}\text{P}$  (b) Spectre PRESS acquis à J1 (somme sur les cinq rats) (lissage lorentzien 35Hz).

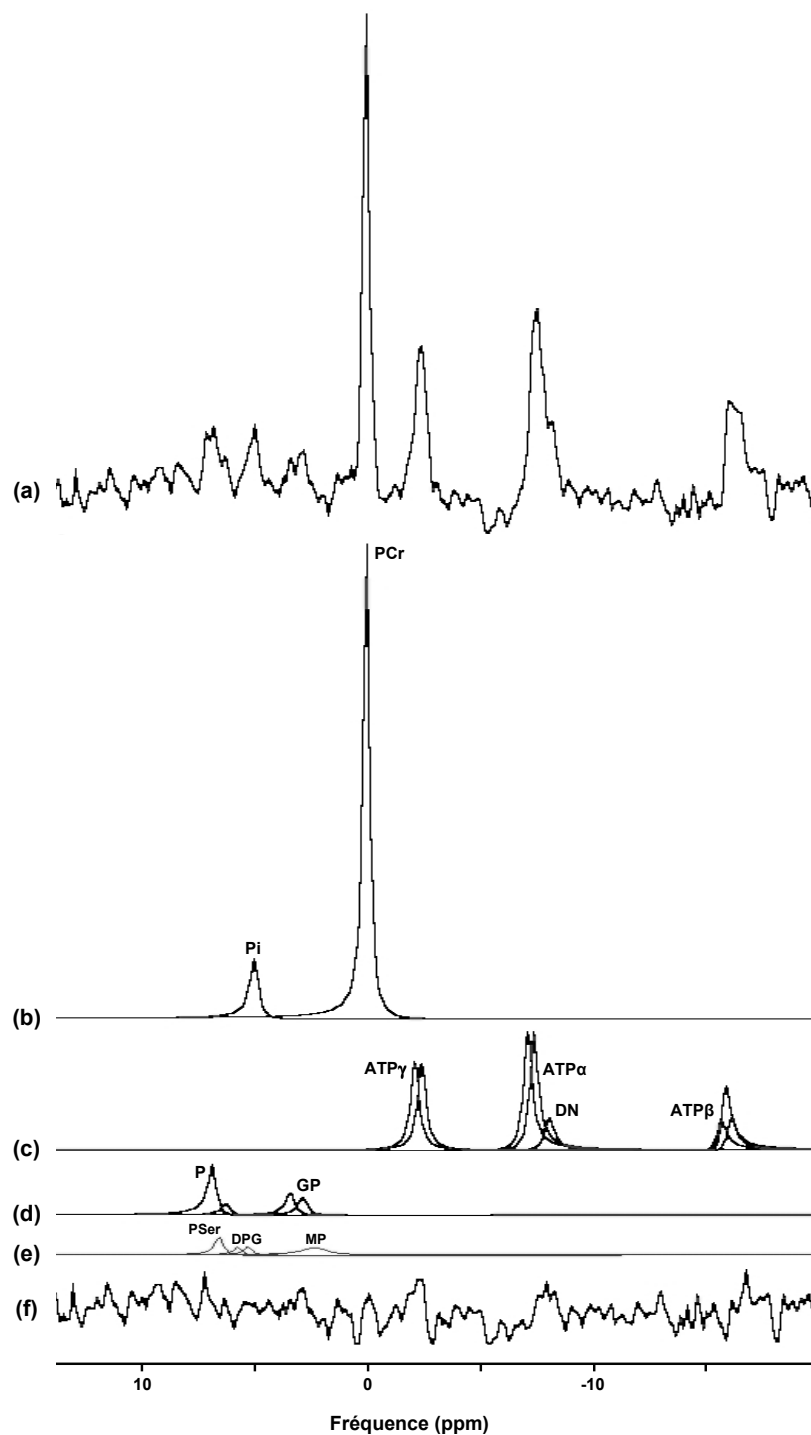


FIG. 7.8 – **Quantification par AMARES** Spectre PRESS (a) sommé sur les cinq rats au jour d'intoxication J1 (lissage lorentzien 35Hz) et décomposition utilisant la base dédiée sous AMARES : (b) Résonances du Pi et de la PCr, (c) Résonances de l'ATP et des DN, (d) Résonances des P (PE et PC) et des GP (GPE et GPC), (e) Résonances de la PSer, du DPG et des MP, (f) Résidu.

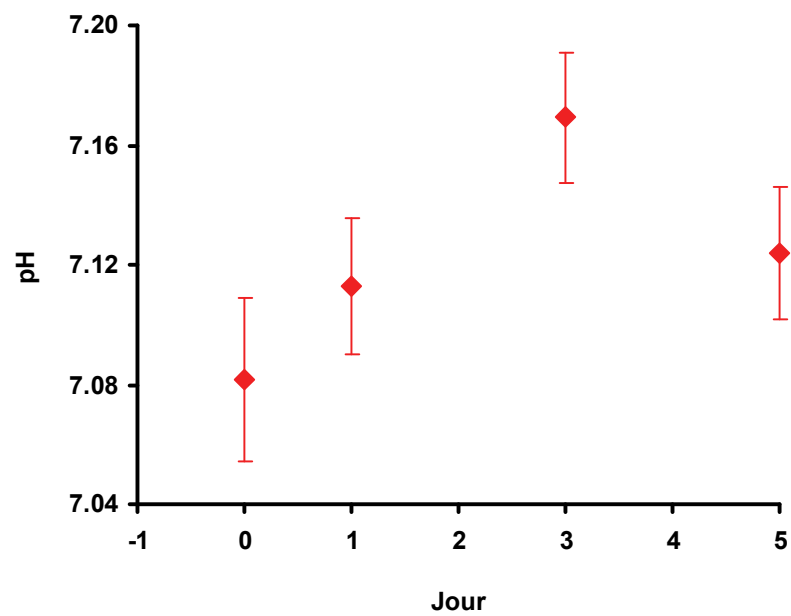


FIG. 7.9 – **Evolution du pH au cours du protocole d'intoxication** Une augmentation significative du pH intracérébral est détectée entre J0 et J3. Cette augmentation est suivie d'une faible diminution à J5, jour auquel des lésions striatales ont pu être détectées.



### 7.3 Discussion

**Augmentation significative du pH cérébral** Cette étude permet de mettre en évidence une augmentation significative du pH cérébral entre J0 et J3, suivie d'une faible diminution à J5. Ainsi, des variations de pH intracérébral peuvent être détectées avant apparition de lésions. Au vu de la significativité de cette étude de groupe, nous nous sommes alors demandé s'il était possible d'étudier les variations de pH individuelles sur chacun des cinq animaux. Les spectres individuels ont donc été quantifiés par la méthode AMARES sous jMRUI. Afin d'éliminer les spectres individuels à trop faible rapport signal sur bruit, un critère de sélection a été choisi. Ainsi, tous les spectres pour lesquels l'écart-type sur la valeur de pH était supérieure à 1% ont été écartés. Pour tous les spectres restants, les valeurs de pH sont reportées dans la **Figure 7.10**. Cette figure permet de montrer qu'une augmentation significative de pH à J3 peut être détectée pour un individu.

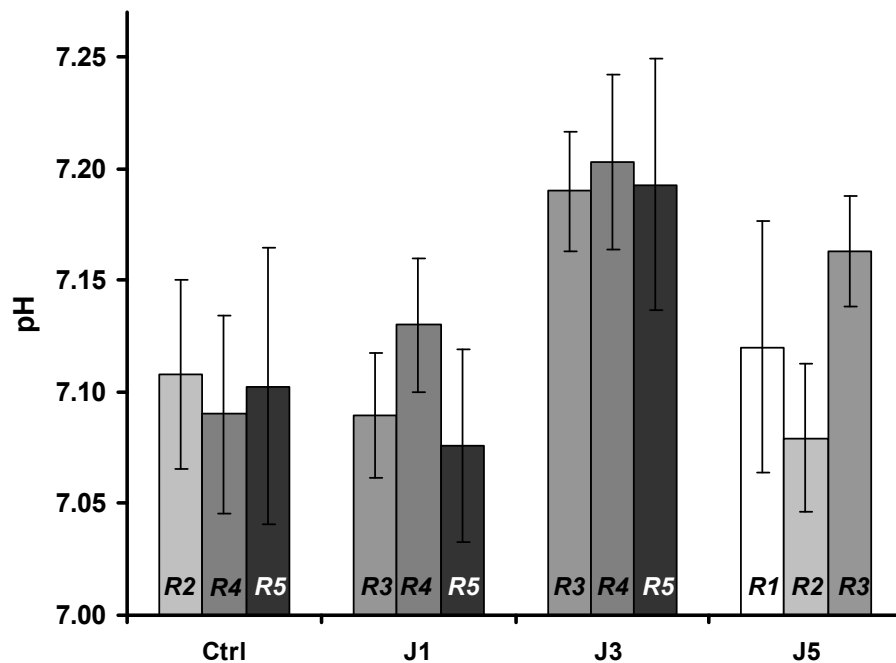


FIG. 7.10 – Valeurs individuelles du pH intracérébral Pour chaque jour de suivi, seulement trois spectres individuels présentaient un rapport signal à bruit suffisant. Le numéro de l'animal pour qui la valeur de pH a pu être déterminée est indiqué à l'intérieur de chaque barre.

**Sensibilité de mesure du pH** La largeur spectrale des spectres PRESS  $^{31}\text{P}$  étant de 5900Hz et le nombre de points acquis étant de 1024 points, la résolution digitale obtenue sur un spectre PRESS est de  $\approx 6\text{Hz}$  par point. Or la plus grande variation de pH détectée est du même ordre de grandeur que la résolution digitale puisqu'elle correspond à une variation de  $\approx 8\text{Hz}$  de la fréquence du Pi. Cependant, il faut souligner que la largeur de raie du Pi est de  $\approx 40\text{Hz}$ , ce qui correspond à environ 7 points d'échantillonnage. La détermination de la fréquence centrale de la résonance du Pi, et donc du pH, étant issue de la modélisation de la résonance totale du Pi par une raie lorentzienne, la mesure du pH est effectuée avec une bonne sensibilité, comme en atteste l'écart-type très faible sur les valeurs de pH ( $\approx 0.3\%$ ).

**Localisation du signal** Afin de minimiser l'artéfact de déplacement chimique, la fréquence de la porteuse a été centrée entre les résonances du Pi et de la PCr au cours de chaque session expérimentale, c'est-à-dire à  $\approx 165\text{ Hz}$  de chacune de ces résonances. Ainsi, sachant que les valeurs des gradients appliqués lors de la séquence PRESS sont de  $G_x = 2300\text{Hz.cm}^{-1}$ ,  $G_y = 3286\text{Hz.cm}^{-1}$  et  $G_z = 2879\text{Hz.cm}^{-1}$ , l'artéfact de localisation dû au déplacement chimique sur les résonances du Pi et de la PCr est de 0.7mm dans la direction X, 0.5mm dans la direction Y et 0.6mm dans la direction Z (**Figure 7.11**). La mesure du pH est donc effectivement une mesure cérébrale.

Cependant, il faut noter que l'artéfact de localisation dû au déplacement chimique est plus important sur les autres métabolites (environ 0.5cm dans les trois directions pour l'ATP $\beta$ , environ 0.2cm pour la PE). Ceci explique que le profil métabolique obtenu sur les spectres PRESS  $^{31}\text{P}$  ne soit pas un profil typiquement cérébral, mais un mélange de profil musculaire et cérébral. La région du Pi présente un profil majoritairement cérébral, les résonances de PE, PC, GPE et GPC ayant en effet une amplitude comparable à celle du Pi (faible artefact de déplacement chimique sur ces résonances). Cependant, les amplitudes élevées des résonances de l'ATP plaident en faveur d'une contamination musculaire dans cette région spectrale. Il faut également noter que l'amplitude de la résonance de la PCr est élevée. Une contamination musculaire au signal de la PCr n'est donc pas à exclure. Cependant, la PCr étant environ huit fois plus concentrée dans le muscle que dans le cerveau, une faible contamination musculaire suffirait à expliquer une augmentation importante de l'amplitude de la PCr (Jensen et al., 2002, Hamilton et al.,

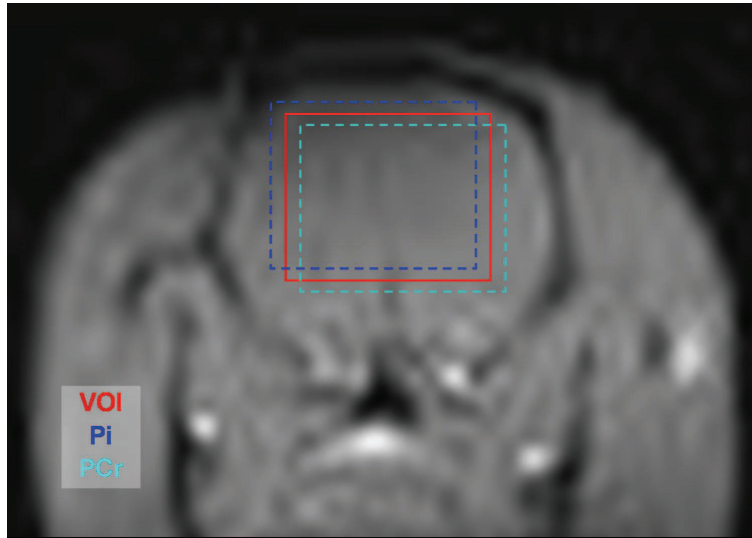


FIG. 7.11 – **Artéfact de localisation dû au déplacement chimique** La fréquence de la porteuse a été centrée entre les résonances du Pi et de la PCr, c'est-à-dire à  $\approx 165$  Hz de chacune de ces résonances. L'artéfact de localisation dû au déplacement chimique sur les résonances du Pi et de la PCr est donc de 0.7mm dans la direction X, 0.5mm dans la direction Y et 0.6mm dans la direction Z. Les positions des VOI dans lesquels le signal du Pi et de la PCr ont été effectivement acquis sont ici représentés.

2003b, Boska, 1994, Doyle et al., 1997, Hetherington et al., 2001, Potwarka et al., 1999). La fréquence de résonance de la PCr étant indépendante des variations de pH physiologique dans une large gamme ( $\text{pK}_a=4.30$ ), cette possible contamination n'a pas d'incidence sur la détermination du pH.

**Précocité des variations de pH** Aucune lésion cérébrale majeure (visible en IRM) n'a pu être détectée au cours des trois premiers jours post implantation. A J5 cependant, des lésions striatales importantes ont pu être détectées chez les cinq animaux. Ainsi, les variations de pH observées entre J0 et J3 sont antérieures à l'apparition de lésions. Le pH intracérébral apparaît donc comme un biomarqueur intéressant car permettant une mise en évidence précoce de la pathologie, avant apparition de la neurodégénérescence.

**Corrélation avec inhibition de la SDH** Le modèle animal utilisé dans cette étude présente l'avantage d'avoir été très largement caractérisé au niveau biochimique par l'équipe d'E. Brouillet au SHFJ. En particulier, une étude des modifications d'activité

du complexe II de la chaîne respiratoire (SDH), cible spécifique du 3NP, a été conduite en 2003 sur ce même modèle au cours d'intoxications chroniques identiques à celle réalisée dans cette étude, et également au cours d'intoxications aiguës (Bizat et al., 2003a, Brouillet et al., 2005). Lors de cette étude, cette équipe a montré que, pour un protocole d'intoxication donné, l'inhibition de la SDH présente une évolution reproductible dans le temps. Sachant que, dans notre étude, au jour 5 post implantation les animaux présentaient des symptômes moteurs importants et que, au même jour, des lésions striatales majeures ont pu être détectées, il est possible de dire que nous nous trouvons dans le même cas de figure. Par conséquent, les variations de pH observées dans notre étude peuvent être comparées avec l'évolution de l'inhibition de la SDH observées par Bizat *et al.* (Bizat et al., 2003a). La **Figure 7.12** présente les courbes d'inhibition de la SDH mesurées dans les modèles aigus et chroniques d'intoxication au 3NP. Dans le modèle chronique, l'inhibition de la SDH atteint  $\approx 65\%$  à J3 et reste constante par la suite (moyenne sur 6 animaux) (Bizat et al., 2003a).

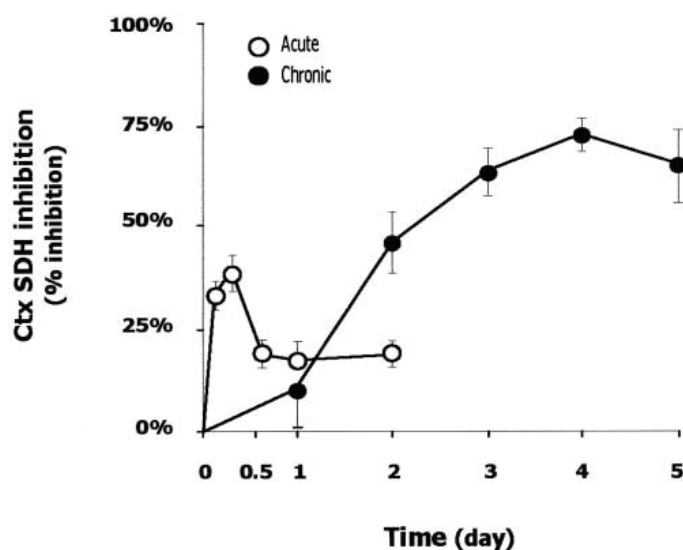


FIG. 7.12 – **Inhibition de l'activité de la SDH corticale dans les modèles aigus et chroniques.** Dans le modèle chronique, l'inhibition de la SDH atteint  $\approx 65\%$  à J3 et reste constante par la suite (moyenne sur 6 animaux). D'après Bizat et al., 2003a.

En premier lieu, il apparaît clair que les courbes d'inhibition de la SDH (**Figure 7.12**) et de variations de pH (**Figure 7.9**) présentent la même allure globale : augmentation entre J0 et J3-J4 puis tassement voire légère diminution. L'évolution de l'inhibition de la SDH semble donc être corrélée aux variations de pH intracérébral mesurées dans notre étude.

Il est alors intéressant d'essayer d'interpréter ces variations en termes biochimiques. Dans le modèle d'intoxication chronique, la cascade biochimique conduisant à la mort cellulaire (voie apoptotique), caractérisée par l'équipe de E. Brouillet, peut se résumer comme suit :

- à J2-J3, aucune lésion cérébrale n'est visible par microscopie. Une étude de la composition cellulaire réalisée par western blot a permis de montrer que le cytochrome C passe du compartiment mitochondrial au compartiment cytoplasmique à ce moment de l'intoxication.
- à J3-J4, il a été montré que la caspase 9, molécule participant à la cascade apoptotique, est activée. Ceci signifie qu'à ce moment de l'intoxication, il y a formation d'un apoptosome, c'est-à-dire d'un complexe moléculaire formé d'une molécule de cytochrome C, d'une molécule de caspase 9, d'une molécule d'Apaf1 (Apoptotic protease activating factor 1), et d'une molécule d'ATP. La concentration élevée d'apoptosome laisse penser que la concentration en ATP cytosolique doit être maintenue à ce stade de l'intoxication. A ce stade, la calpaïne est également active.
- à J5, il n'y a pas accumulation de caspase 3, molécule activée par la caspase 9 au cours de la voie apoptotique intrinsèque. Ceci signifie que la calpaïne clive le site actif de la caspase 3 et la détruit. Une autre voie apoptotique, probablement induite par des modifications de concentrations calciques, induit donc la mort cellulaire et des lésions apparaissent.

Ainsi, au moment où la variation de pH la plus significative est mesurée, les phénomènes suivants sont observés : la concentration d'ATP n'est pas modifiée, la chaîne respiratoire est inhibée, le cycle de Krebs est inhibé, le pH augmente. Il est donc très difficile d'attribuer l'augmentation de pH à un phénomène simple. Cette augmentation traduit une modification de l'état d'équilibre cellulaire dans son ensemble. Au vu des constatations énoncées ci-dessus, une hypothèse permettant d'expliquer l'augmentation de pH peut être formulée. Selon cette hypothèse, afin de maintenir le stock d'ATP nécessaire à la formation d'apoptosome, un mécanisme compensatoire ne mettant en jeu ni le glucose ni le succinate permettrait de transférer des molécules protonnées (coenzymes réduits par exemple) du compartiment cytosolique au compartiment mitochondrial. Ce transfert résulterait en une augmentation instable de la concentration mitochondriale en protons et, parallèlement, en une diminution de la concentration cytoplasmique en protons, et donc à une alcalinisation cytoplasmique visible par RMN. Cette hypothèse n'est bien entendu valable que si la résonance du Pi visible sur les spectres  $^{31}\text{P}$  provient majoritairement

---

du Pi intracellulaire. Une étude approfondie doit maintenant être réalisée afin de tenter d'interpréter au mieux les variations de pH mesurées dans cette expérience.

## 7.4 Conclusion

Dans cette étude portant sur un modèle de rat intoxiqué au 3NP, un protocole d'intoxication chronique permettant le suivi de rongeurs sur cinq jours avant apparition de lésions cérébrales a été mis en oeuvre. Afin d'effectuer une mesure localisée de pH intracérébral à 4 teslas, une méthode d'acquisition basée sur une séquence PRESS a été utilisée en un temps d'examen compatible avec l'anesthésie ( $\approx 3$  heures).

D'un point de vue neurobiologique, cette étude a permis de montrer que des variations de pH intracérébral pouvaient être détectées avant apparition de lésions dans ce modèle 3NP. Le pH intracérébral serait donc un biomarqueur métabolique, précoce et pertinent de la neurodégénérescence.

---

## Conclusion générale

L'objectif général de ce travail de thèse a été d'évaluer le potentiel de la spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$  pour l'investigation du métabolisme énergétique cérébral *in vivo*.

Au cours de la première étape de ce travail, une étude de neuroimagerie multimodalités a été conduite sur trois primates sains. Dans cette étude, la mesure de  $V_{ATP}$  par la méthode de transfert de saturation a été validée en conditions physiologiques normales par comparaison avec la mesure de la vitesse du cycle de Krebs  $V_{TCA}$  cérébrale et la mesure de consommation de glucose  $\text{CMR}_{\text{glc}}$ , respectivement obtenues par spectroscopie RMN du  $^{13}\text{C}$  et par TEP après injection de  $^{18}\text{F}$ -FDG. Ce travail présente la première mesure cérébrale de  $V_{ATP}$  utilisant une séquence spectroscopique localisée. De plus, en combinant trois techniques majeures de neuroimagerie métabolique (spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$ , spectroscopie RMN du  $^{13}\text{C}$  et  $^{18}\text{F}$ -FDG TEP), nous avons pu proposer la première validation directe de la mesure de  $V_{ATP}$  par la méthode de transfert de saturation. Enfin, la connaissance des trois flux cataboliques majeurs nous a permis de dresser un bilan énergétique de la respiration cellulaire et d'évaluer le rendement énergétique global *in vivo*. Cette étude a ainsi permis d'obtenir une vision intégrée du métabolisme énergétique cérébral et concrétise de nombreuses années de recherches menées au sein de l'UIIBP au SHFJ.

La seconde étape de ce travail de thèse a consisté à évaluer le potentiel de la spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$  pour l'étude de la neurodégénérescence dans le cas particulier de la maladie de Huntington. Lors d'une première étude exploratoire conduite sur une cohorte de patients HD, nous avons choisi de mesurer (i) les concentrations en métabolites phosphorés, (ii) le pH et (iii) la vitesse de synthèse d'ATP dans le cerveau de ces patients, et ce en 30 minutes environ, sur un système RMN clinique 3 teslas. Trois résultats principaux ont



été obtenus. En premier lieu, nous avons pu montrer que l'homéostasie métabolique en composés phosphorés est maintenue dans le cerveau des patients HD, et ce malgré le stade avancé de la pathologie caractérisé par une atrophie cérébrale importante. En second lieu, nous avons mis en évidence une augmentation significative du pH intracérébral chez les patients HD, alcalinisation qui semble être corrélée avec les scores cliniques moteurs de l'échelle UHDRS. Enfin, en dépit de nombreux efforts, nous n'avons pas pu réaliser une mesure absolue de la vitesse de synthèse d'ATP cérébrale. Le compromis entre maximisation du rapport signal sur bruit et temps d'acquisition raisonnable ne nous a en effet pas permis d'obtenir une sensibilité suffisante à la détermination absolue de  $V_{ATP}$ . De plus, la présence d'une ligne de base importante sur les spectres  $^{31}\text{P}$  a entravé les procédures de quantification. Contrairement à nos attentes, nous n'avons donc pas pu mettre en évidence une diminution significative de  $V_{ATP}$  entre les groupes de patients HD et de contrôles, même si une tendance à la baisse semble exister.

Ayant dans l'étude précédente mis en évidence des variations significatives de pH cérébral dans le groupe de patients HD, nous avons voulu vérifier si ces variations pouvaient être détectées précocement, c'est-à-dire avant apparition de lésions. Ainsi, la dernière étape de ce travail de thèse a consisté à mesurer le pH intracérébral sur un modèle rongeur de la MH (rats intoxiqués au 3NP de façon chronique). Une augmentation significative de pH a été mise en évidence avant apparition de lésions striatales, confirmant l'intérêt de la mesure du pH pour le suivi précoce de la MH.

Au vu des résultats énoncés ci-dessus, nous allons dans les paragraphes suivants proposer quelques perspectives à ce travail.

Concernant la mesure de la vitesse de synthèse d'ATP cérébrale, la méthode de transfert de saturation permet effectivement d'obtenir une mesure quantitative et métaboliquement fiable de  $V_{ATP}$  lorsqu'elle est réalisée à l'aide d'une séquence localisée (pas de contamination musculaire ni de ligne de base importante). Cependant, au vu de la faible sensibilité de cette méthode, il est nécessaire d'effectuer un nombre extrêmement important de sessions expérimentales afin d'obtenir une valeur précise à  $\approx 30\%$  (25 heures d'acquisition au total dans notre étude sur primate). Par conséquent, cette méthode, même si elle présente un intérêt majeur pour la recherche fondamentale, ne peut à ce jour pas être utilisée chez l'homme sur un système clinique, en dépit d'adaptations visant à maximiser le rapport

signal sur bruit (pas de localisation spectroscopique, acquisition sur cerveau entier). La solution future réside sûrement dans l'utilisation de systèmes RMN à haut champ magnétique (7 teslas) et de sondes multicanaux adaptées, qui permettraient d'augmenter le rapport signal sur bruit accessible. Rappelons de plus que l'augmentation du temps de relaxation longitudinal du Pi à haut champ (3.5s à 7T *vs.* 2s à 3 teslas) est un avantage supplémentaire à l'utilisation de la méthode de transfert de saturation. Il serait donc envisageable à haut champ de réaliser des mesures de  $V_{ATP}$  localisées à un voxel unique (monovoxel) ou à plusieurs voxels (imagerie spectroscopique CSI). Cependant, notons que les techniques spectroscopiques monovoxels devront faire face à certaines limitations : dépôt de puissance important dans le cas d'une localisation par OVS, relaxation T2 très rapide dans le cas de localisations spectroscopiques classiques (PRESS, STEAM...). Les techniques d'imagerie spectroscopique seraient quant à elles limitées par le faible rapport signal sur bruit, même s'il est envisageable d'utiliser des voxels de volume important. Ainsi, la mesure de  $V_{ATP}$  cérébrale n'est à ce jour pas envisageable sur un système clinique en un temps d'examen raisonnable, mais des développements futurs (haut champ, sonde multicanaux) pourraient rendre cette mesure accessible. Il serait ainsi intéressant dans une étude future de tenter de confirmer la tendance à la baisse de  $V_{ATP}$  mesurée dans le cerveau des patients HD.

La mesure de pH intracérébral par spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$  représente à nos yeux une méthode d'avenir pour l'évaluation du métabolisme énergétique cérébral. En effet, nous avons montré qu'il était possible de réaliser une mesure du pH cérébral à 3 teslas sur un individu en  $\approx 5$  minutes. De plus, les variations de pH semblent être des biomarqueurs intéressants de la neurodégénérescence dans la MH, ces variations pouvant être détectées à un temps précoce, c'est-à-dire avant apparition de lésions. Dans un futur proche, il serait intéressant de confirmer ce résultat en réalisant des mesures de pH cérébral sur une cohorte de patients HD pré-symptomatiques. Ceci pourrait permettre de vérifier si une alcalinisation cérébrale est visible avant apparition de lésions et si le degré d'alcalinisation peut permettre de prédire la date de survenue des premiers symptômes et/ou de la neurodégénérescence. Dans un tel cas, le pH cérébral serait effectivement un biomarqueur précoce permettant de déterminer le stade d'avancement de la pathologie, et la connaissance du pH cérébral pourrait représenter une aide diagnostique pertinente. Concernant les développements méthodologiques, il serait intéressant de réaliser des car-

tographies du pH cérébral à haut champ magnétique (7T). En effet, au vu de la sensibilité importante de la mesure de pH à 3 teslas (mesure individuelle en 5 minutes), il est parfaitement envisageable de réaliser une image spectroscopique 2D (CSI) puis de déterminer par quantification automatique les différences de déplacement chimique entre Pi et PCr dans chaque voxel. Une cartographie pH dérivée de la connaissance des déplacements chimiques pourrait ainsi permettre de mettre en évidence des zones "chaudes" dans lesquelles le pH serait significativement plus faible ou plus élevé que dans le reste du cerveau.

L'ensemble de ce travail de thèse a bénéficié de développements méthodologiques, et parfois même d'acquisitions, effectués par d'autres doctorants au laboratoire. Je voudrais conclure ce manuscrit en résumant le détail de mes contributions au travail présenté dans ce manuscrit :

- TEP  $^{18}\text{F}$ -FDG chez le primate : acquisition des données et traitement.
- RMN du  $^{13}\text{C}$  chez le primate : acquisition des données et traitement (mise au point de la séquence par F. Boumezbeur et J. Valette).
- RMN du  $^{31}\text{P}$  chez le primate : acquisition d'une partie des données et traitement (mise au point de la séquence par J. Valette).
- RMN du  $^{31}\text{P}$  chez l'homme : acquisition d'une partie des données et traitement (mise au point de la séquence par J. Valette et H. Bataille).
- RMN du  $^{31}\text{P}$  chez le rongeur : mise au point de la séquence, acquisition des données et traitement.

Nous espérons que l'ensemble des résultats contenus dans cette thèse pourra permettre au lecteur d'avoir une vision d'ensemble des possibilités qu'offre la spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$  pour l'étude du métabolisme énergétique cérébral. Nous espérons également que les axes de recherches étudiés au cours de cette thèse pourront être développés et approfondis dans de futures études.

---

## Annexe A : Résumé

La mesure de flux métaboliques cérébraux, en particulier de ceux participant au métabolisme énergétique, présente un intérêt majeur autant d'un point de vue fondamental, pour la compréhension des réactions biochimiques et de leur couplage, que d'un point de vue clinique, pour la mise à jour de biomarqueurs d'évolution des pathologies neurodégénératives et la détermination des mécanismes déficients sous jacents. Ainsi, au cours des dernières décennies, des techniques de neuroimagerie atraumatiques et non invasives permettant la mesure de flux métaboliques cérébraux, parmi lesquelles la tomographie par émission de positrons (TEP) et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (SRM), ont connu un développement considérable. Plus particulièrement, la SRM du  $^{31}\text{P}$  présente la caractéristique et l'avantage de permettre la mesure directe du flux cérébral de synthèse d'ATP, et ce sans injection de précurseur marqué. Cependant, cette approche apparaît encore à ce jour un défi méthodologique et des études de validation complémentaires restent nécessaires afin de démontrer la pertinence de la SRM du  $^{31}\text{P}$  pour la mesure de la synthèse énergétique cérébrale.

Dans ce contexte, une étude de neuroimagerie multimodale, basée sur l'utilisation de nouvelles techniques de neuroimagerie, a été menée afin de permettre, dans un même temps, d'obtenir une vision intégrée du métabolisme énergétique cérébral et de valider la méthode de transfert de saturation par SRM du  $^{31}\text{P}$  comme une méthode de mesure robuste et quantitative de la synthèse d'ATP cérébrale. Plus précisément, la consommation régionale de glucose CMR<sub>glc</sub>, la vitesse du cycle de Krebs ( $V_{TCA}$ ) et la vitesse de synthèse d'ATP ( $V_{ATP}$ ) ont été mesurées dans le cerveau de primate sain respectivement par PET  $^{18}\text{F}$ -FDG, SRM du  $^{13}\text{C}$  et transfert de saturation par SRM du  $^{31}\text{P}$ . Ces trois mesures complémentaires, réalisées dans une zone cérébrale définie chez les mêmes animaux en conditions physiologiques identiques, ont conduit aux résultats sui-

vants :  $\text{CMR}_{\text{glc}} = 0.27 \pm 0.07 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ,  $V_{\text{TCA}} = 0.63 \pm 0.12 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$  et  $V_{\text{ATP}} = 7.8 \pm 2.3 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ . La cohérence de ces trois flux avec les valeurs rapportées dans la littérature, mais surtout leur cohérence l'un par rapport à l'autre, a permis de valider la méthode de transfert de saturation par SMR du  $^{31}\text{P}$  pour la mesure directe de la synthèse d'ATP cérébrale.

Cette étape de validation ayant été conduite, l'intérêt de la technique de transfert de saturation a, dans un deuxième temps, été évalué en clinique sur une population de patients atteints de la maladie de Huntington (MH). Une attitude exploratoire a été adoptée, dans laquelle les concentrations en métabolites phosphorylés, le pH cérébral et la vitesse de synthèse d'ATP ont été évalués. Cette étude a permis en premier lieu de mettre en évidence un maintien de l'homéostasie métabolique chez les patients Huntington (HD), en particulier en ATP, Pi et PCr, et ce malgré une atrophie cérébrale importante. Une diminution de la vitesse de synthèse d'ATP cérébrale a également été observée chez ces patients. Cependant, au vu de la faible sensibilité de la méthode de transfert de saturation par SRM du  $^{31}\text{P}$ , la significativité de cette diminution n'a pu être établie. Enfin, une augmentation significative du pH cérébral a été mesurée chez les patients HD relativement aux contrôles. Cette alcalinisation cérébrale, pour la première fois mesurée dans la MH, présentait de plus une corrélation avec les scores cliniques moteurs évalués chez les patients HD, démontrant l'intérêt potentiel de la mesure de pH cérébral pour le suivi de la pathologie.

Au vu de ce résultat, une étude visant à évaluer la précocité des variations de pH associées à la MH a été réalisée sur un modèle rongeur au cours d'une intoxication chronique à l'acide 3-nitropropionique (3NP), neurotoxine mitochondriale. Cette étude a permis de mettre en évidence une augmentation significative du pH cérébral précédant l'apparition de lésions striatales, démontrant la potentialité du pH cérébral comme biomarqueur précoce de la MH. Au niveau biochimique, il a été montré que variations de pH et pourcentages d'inhibition de la succinate déshydrogénase (SDH), cible spécifique du 3NP, présentaient la même évolution temporelle au cours du protocole d'intoxication. Des hypothèses sur les mécanismes biochimiques sous jacents ont alors été proposées afin de tenter d'expliquer les variations de pH cérébral mesurées dans cette étude.

---

## Annexe B : Publications

Ce travail de thèse a fait l'objet des publications suivantes :

### Article

**M. Chaumeil**, J. Valette, M. Guillermier, E. Brouillet, F. Boumezbeur, A.-S. Herard, G. Bloch, P. Hantraye, V. Lebon, *Multimodal neuroimaging provides a highly consistent picture of energy metabolism, validating  $^{31}\text{P}$  MRS for measuring brain ATP synthesis*, Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS), article sous presse.

### Communication orales et affichées

**M. Chaumeil**, J. Valette, M. Guillermier, A. S. Hérard, G. Bloch, P. Hantraye, et V. Lebon, *Combination of  $^{18}\text{F}$  FDG-PET,  $^{13}\text{C}$  MRS and  $^{31}\text{P}$  MRS provides a highly consistent picture of brain energy metabolism, from glucose breakdown up to ATP synthesis*, in Proceedings 15<sup>th</sup> ISMRM Scientific Meeting and Exhibitions, Berlin, 2007. Communication orale.

**M. Chaumeil**, H. Bataille, J. Valette, E. Brouillet, V. Gaura, A. C. Bachoud-Levi, P. Krystkowiak, C. Verny, P. Damier, A. Rialland, G. Bloch, P. Hantraye, P. Remy, et V. Lebon,  *$^{31}\text{P}$  MRS of the brain supports the mitochondrial hypothesis for Huntington disease, revealing altered ATP synthesis, pH increase and stable ATP level*, in Proceedings 15<sup>th</sup> ISMRM Scientific Meeting and Exhibitions, Berlin, 2007. Communication affichée.

J. Valette, **M. Chaumeil**, H. Bataille, P. Hantraye, et V. Lebon, *Pulse-acquire  $^{31}\text{P}$  MRS*

*allows to measure brain ATP synthesis in humans at 3 Tesla*, in Proceedings 15<sup>th</sup> ISMRM Scientific Meeting and Exhibitions, Berlin, 2007. Communication orale.

**M. Chaumeil**, H. Bataille, J. Valette, E. Brouillet, V. Gaura, A. Rialland, A.-C. Bachoud-Levi, P. Krystkowiak, C. Verny, P. Damier, G. Bloch, P. Hantraye, P. Remy et V. Lebon, *La spectroscopie RMN du  $^{31}\text{P}$  étaye l'hypothèse d'un déficit énergétique mitochondrial dans la maladie de Huntington*, in Proceedings 12<sup>ème</sup> congrès GRAMM, Lyon, 2008. Communication orale.

---

## Bibliographie

- Alger, J. R., Shulman, R. G., Feb 1984. Nmr studies of enzymatic rates in vitro and in vivo by magnetization transfer. *Q Rev Biophys* 17 (1), 83–124.
- Ardenkjaer-Larsen, J. H., Fridlund, B., Gram, A., Hansson, G., Hansson, L., Lerche, M. H., Servin, R., Thaning, M., Golman, K., Sep 2003. Increase in signal-to-noise ratio of > 10,000 times in liquid-state nmr. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (18), 10158–10163.
- Attwell, D., Laughlin, S., Oct. 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 21 (10), 1133–1145.
- Aylward, E. H., Brandt, J., Codori, A. M., Mangus, R. S., Barta, P. E., Harris, G. J., May 1994. Reduced basal ganglia volume associated with the gene for huntington's disease in asymptomatic at-risk persons. *Neurology* 44 (5), 823–828.
- Bachelard, H. S., Cox, D. W., Morris, P. G., 1987. Nuclear magnetic resonance as a tool to study brain metabolism. *Gerontology* 33 (3-4), 235–246.
- Bae, B.-I., Xu, H., Igarashi, S., Fujimuro, M., Agrawal, N., Taya, Y., Hayward, S. D., Moran, T. H., Montell, C., Ross, C. A., Snyder, S. H., Sawa, A., Jul 2005. p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in huntington's disease. *Neuron* 47 (1), 29–41.
- Bantubungi, K., Jacquard, C., Greco, A., Pintor, A., Chtarto, A., Tai, K., Galas, M.-C., Tenenbaum, L., Déglon, N., Popoli, P., Minghetti, L., Brouillet, E., Brotchi, J., Levivier, M., Schiffmann, S. N., Blum, D., Feb 2005. Minocycline in phenotypic models of huntington's disease. *Neurobiol Dis* 18 (1), 206–217.
- Barantin, L., Pape, A. L., Akoka, S., Aug 1997. A new method for absolute quantitation of mrs metabolites. *Magn Reson Med* 38 (2), 179–182.



- Beal, M. F., Feb 1992. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol* 31 (2), 119–130.
- Beal, M. F., Jul 2000. Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 23 (7), 298–304.
- Beal, M. F., Oct 2005. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol* 58 (4), 495–505.
- Beckmann, N., Turkalj, I., Seelig, J., Keller, U., Jul 1991.  $^{13}\text{C}$  nmr for the assessment of human brain glucose metabolism in vivo. *Biochemistry* 30 (26), 6362–6366.
- Behar, K. L., Petroff, O. A., Prichard, J. W., Alger, J. R., Shulman, R. G., Dec 1986. Detection of metabolites in rabbit brain by  $^{13}\text{C}$  nmr spectroscopy following administration of [1- $^{13}\text{C}$ ]glucose. *Magn Reson Med* 3 (6), 911–920.
- Benchoua, A., Trioulier, Y., Zala, D., Gaillard, M.-C., Lefort, N., Dufour, N., Saudou, F., Elalouf, J.-M., Hirsch, E., Hantraye, P., Déglon, N., Brouillet, E., Apr 2006. Involvement of mitochondrial complex ii defects in neuronal death produced by n-terminus fragment of mutated huntingtin. *Mol Biol Cell* 17 (4), 1652–1663.
- Bessman, S. P., Geiger, P. J., Jan 1981. Transport of energy in muscle : the phosphoryl-creatine shuttle. *Science* 211 (4481), 448–452.
- Bittar, P. G., Charnay, Y., Pellerin, L., Bouras, C., Magistretti, P. J., Nov 1996. Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 16 (6), 1079–1089.
- Bizat, N., Hermel, J.-M., Boyer, F., Jacquard, C., Créminon, C., Ouary, S., Escartin, C., Hantraye, P., Kajewski, S., Brouillet, E., Jun 2003a. Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate : implications for huntington's disease. *J Neurosci* 23 (12), 5020–5030.
- Bizat, N., Hermel, J.-M., Humbert, S., Jacquard, C., Créminon, C., Escartin, C., Saudou, F., Krajewski, S., Hantraye, P., Brouillet, E., Oct 2003b. In vivo calpain/caspase cross-talk during 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration : implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3. *J Biol Chem* 278 (44), 43245–43253.

- Blüml, S., Moreno-Torres, A., Ross, B. D., Jun 2001. [1-13c]glucose mrs in chronic hepatic encephalopathy in man. *Magn Reson Med* 45 (6), 981–993.
- Blüml, S., Moreno-Torres, A., Shic, F., Nguy, C.-H., Ross, B. D., Feb 2002. Tricarboxylic acid cycle of glia in the in vivo human brain. *NMR Biomed* 15 (1), 1–5.
- Blum, D., Galas, M.-C., Gall, D., Cuvelier, L., Schiffmann, S. N., Aug 2002a. Striatal and cortical neurochemical changes induced by chronic metabolic compromise in the 3-nitropropionic model of huntington's disease. *Neurobiol Dis* 10 (3), 410–426.
- Blum, D., Gall, D., Galas, M.-C., d'Alcantara, P., Bantubungi, K., Schiffmann, S. N., Oct 2002b. The adenosine a1 receptor agonist adenosine amine congener exerts a neuroprotective effect against the development of striatal lesions and motor impairments in the 3-nitropropionic acid model of neurotoxicity. *J Neurosci* 22 (20), 9122–9133.
- Blum, D., Hourez, R., Galas, M.-C., Popoli, P., Schiffmann, S. N., Jun 2003. Adenosine receptors and huntington's disease : implications for pathogenesis and therapeutics. *Lancet Neurol* 2 (6), 366–374.
- Bolster, J. M., Vaalburg, W., Paans, A. M., van Dijk, T. H., Elsinga, P. H., Zijlstra, J. B., Piers, D. A., Mulder, N. H., Woldring, M. G., Wynberg, H., 1986. Carbon-11 labelled tyrosine to study tumor metabolism by positron emission tomography (pet). *Eur J Nucl Med* 12 (7), 321–324.
- Boska, M., Jul. 1994. Atp production rates as a function of force level in the human gastrocnemius/soleus using 31p mrs. *Magn Reson.Med.* 32 (1), 1–10.
- Bottomley, P. A., 1987. Spatial localization in nmr spectroscopy in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 508, 333–348.
- Boumezbeur, F., 2005. Evaluation de la spectroscopie rmn in vivo pour l'exploration de processus neurodégénératifs : suivi longitudinal de l'atteinte striatale dans le modèle 3np de la maladie de huntington chez le primate. Ph.D. thesis, Université Paris XI.
- Boumezbeur, F., Besret, L., Valette, J., Gregoire, M., Delzescaux, T., Maroy, R., Vaufrey, F., Gervais, P., Hantraye, P., Bloch, G., Lebon, V., Nov. 2005. Glycolysis versus tca cycle in the primate brain as measured by combining 18f-fdg pet and 13c-nmr. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 25 (11), 1418–1423.

- Boumezbeur, F., Besret, L., Valette, J., Vaufrey, F., Henry, P., Slavov, V., Giacomini, E., Hantraye, P., Bloch, G., Lebon, V., Jul. 2004. Nmr measurement of brain oxidative metabolism in monkeys using  $^{13}\text{C}$ -labeled glucose without a  $^{13}\text{C}$  radiofrequency channel. *Magn Reson.Med.* 52 (1), 33–40.
- Bourgeron, T., Rustin, P., Chretien, D., Birch-Machin, M., Bourgeois, M., Viegas-Péquignot, E., Munnich, A., Rötig, A., Oct 1995. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet* 11 (2), 144–149.
- Braunová, Z., Kasparová, S., Mlynárik, V., Mierisová, S., Liptaj, T., Tkáč, I., Gvozdjaková, A., Dec 2000. Metabolic changes in rat brain after prolonged ethanol consumption measured by  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  mrs experiments. *Cell Mol Neurobiol* 20 (6), 703–715.
- Brennan, W. A., Bird, E. D., Aprille, J. R., Jun 1985. Regional mitochondrial respiratory activity in huntington's disease brain. *J Neurochem* 44 (6), 1948–1950.
- Brindle, K. M., Radda, G. K., Apr 1987.  $^{31}\text{P}$ -nmr saturation transfer measurements of exchange between pi and atp in the reactions catalysed by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and phosphoglycerate kinase in vitro. *Biochim Biophys Acta* 928 (1), 45–55.
- Brouillet, E., Condé, F., Beal, M. F., Hantraye, P., Dec 1999. Replicating huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 59 (5), 427–468.
- Brouillet, E., Guyot, M. C., Mittoux, V., Altairac, S., Condé, F., Palfi, S., Hantraye, P., Feb 1998. Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J Neurochem* 70 (2), 794–805.
- Brouillet, E., Hantraye, P., Ferrante, R. J., Dolan, R., Leroy-Willig, A., Kowall, N. W., Beal, M. F., Jul 1995. Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (15), 7105–7109.
- Brouillet, E., Jacquard, C., Bizat, N., Blum, D., Dec 2005. 3-nitropropionic acid : a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in huntington's disease. *J Neurochem* 95 (6), 1521–1540.

- Brown, A. M., Ransom, B. R., Sep 2007. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55 (12), 1263–1271.
- Brown, C. E., Battocletti, J. H., Srinivasan, R., Allaway, J. R., Moore, J., Sigmann, P., Jul 1988. In vivo 31p nuclear magnetic resonance spectroscopy of bone mineral for evaluation of osteoporosis. *Clin Chem* 34 (7), 1431–1438.
- Burger, C., Buck, A., Nov. 1997. Requirements and implementation of a flexible kinetic modeling tool. *J.Nucl.Med.* 38 (11), 1818–1823.
- Chan, S. L., Liu, D., Kyriazis, G. A., Bagsiyao, P., Ouyang, X., Mattson, M. P., Dec 2006. Mitochondrial uncoupling protein-4 regulates calcium homeostasis and sensitivity to store depletion-induced apoptosis in neural cells. *J Biol Chem* 281 (49), 37391–37403.
- Chen, W., Zhu, X., Gruetter, R., Seaquist, E., Adriany, G., Ugurbil, K., Mar. 2001. Study of tricarboxylic acid cycle flux changes in human visual cortex during hemifield visual stimulation using (1)h-[(13)c] mrs and fmri. *Magn Reson.Med.* 45 (3), 349–355.
- Chhina, N., Kuestermann, E., Halliday, J., Simpson, L., Macdonald, I., Bachelard, H., Morris, P., Dec. 2001. Measurement of human tricarboxylic acid cycle rates during visual activation by (13)c magnetic resonance spectroscopy. *J.Neurosci.Res.* 66 (5), 737–746.
- Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M., Green, D. R., Feb 2004. Direct activation of bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303 (5660), 1010–1014.
- Choi, I. Y., Tkác, I., Ugurbil, K., Gruetter, R., Sep 1999. Noninvasive measurements of [1-(13)c]glycogen concentrations and metabolism in rat brain in vivo. *J Neurochem* 73 (3), 1300–1308.
- Choo, Y. S., Johnson, G. V. W., MacDonald, M., Detloff, P. J., Lesort, M., Jul 2004. Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Hum Mol Genet* 13 (14), 1407–1420.
- Clarke, D. D., Sokoloff, L., 1994. Circulation and energy metabolism of the brain. In *Basic Neurochemistry*. New York : Raven Press.

- Coleman, R. E., Nov 2005. Positron emission tomography diagnosis of alzheimer's disease. *Neuroimaging Clin N Am* 15 (4), 837–46, x.
- Corbett, R. J., Laptook, A. R., Nov 1994. Age-related changes in swine brain creatine kinase-catalyzed 31p exchange measured in vivo using 31p nmr magnetization transfer. *J Cereb Blood Flow Metab* 14 (6), 1070–1077.
- Cruz, N. F., Dienel, G. A., Dec 2002. High glycogen levels in brains of rats with minimal environmental stimuli : implications for metabolic contributions of working astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab* 22 (12), 1476–1489.
- Cui, L., Jeong, H., Borovecki, F., Parkhurst, C. N., Tanese, N., Krainc, D., Oct 2006. Transcriptional repression of pgc-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* 127 (1), 59–69.
- Dautry, C., Vaufrey, F., Brouillet, E., Bizat, N., Henry, P. G., Condé, F., Bloch, G., Hantraye, P., May 2000. Early n-acetylaspartate depletion is a marker of neuronal dysfunction in rats and primates chronically treated with the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Cereb Blood Flow Metab* 20 (5), 789–799.
- de Graaf, R., 1998. In vivo NMR spectroscopy.
- de Graaf, R., Luo, Y., Garwood, M., Nicolay, K., Oct. 1996. B1-insensitive, single-shot localization and water suppression. *J.Magn Reson.B* 113 (1), 35–45.
- Degani, H., Alger, J. R., Shulman, R. G., Petroff, O. A., Prichard, J. W., Jul 1987. 31p magnetization transfer studies of creatine kinase kinetics in living rabbit brain. *Magn Reson Med* 5 (1), 1–12.
- Doyle, V., Payne, G., Collins, D., Verrill, M., Leach, M., Apr. 1997. Quantification of phosphorus metabolites in human calf muscle and soft-tissue tumours from localized mr spectra acquired using surface coils. *Phys.Med.Biol.* 42 (4), 691–706.
- Du, F., Zhu, X.-H., Qiao, H., Zhang, X., Chen, W., Jan 2007. Efficient in vivo 31p magnetization transfer approach for noninvasively determining multiple kinetic parameters and metabolic fluxes of atp metabolism in the human brain. *Magn Reson Med* 57 (1), 103–114.

- Dzeja, P. P., Zeleznikar, R. J., Goldberg, N. D., Jul 1998. Adenylate kinase : kinetic behavior in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes. *Mol Cell Biochem* 184 (1-2), 169–182.
- Ebert, D., Haller, R. G., Walton, M. E., Jul 2003. Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by <sup>13</sup>c nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosci* 23 (13), 5928–5935.
- Elston, T., Wang, H., Oster, G., Jan 1998. Energy transduction in atp synthase. *Nature* 391 (6666), 510–513.
- Erecinska, M., Silver, I., Feb. 1989. Atp and brain function. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 9 (1), 2–19.
- Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Beal, M. F., Martin, J. B., Bird, E. D., Richardson, E. P., Jan 1987. Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 46 (1), 12–27.
- Fujiwara, T., Matsuzawa, T., Kubota, K., Abe, Y., Itoh, M., Fukuda, H., Hatazawa, J., Yoshioka, S., Yamaguchi, K., Ito, K., Jan 1989. Relationship between histologic type of primary lung cancer and carbon-11-l-methionine uptake with positron emission tomography. *J Nucl Med* 30 (1), 33–37.
- Gafni, J., Ellerby, L. M., Jun 2002. Calpain activation in huntington's disease. *J Neurosci* 22 (12), 4842–4849.
- Gallagher, F. A., Kettunen, M. I., Day, S. E., Hu, D.-E., Ardenkjaer-Larsen, J. H., in 't Zandt, R., Jensen, P. R., Karlsson, M., Golman, K., Lerche, M. H., Brindle, K. M., Jun 2008. Magnetic resonance imaging of ph in vivo using hyperpolarized <sup>13</sup>c-labelled bicarbonate. *Nature* 453 (7197), 940–943.
- García-Martín, M. L., Hérigault, G., Rémy, C., Farion, R., Ballesteros, P., Coles, J. A., Cerdán, S., Ziegler, A., Sep 2001. Mapping extracellular ph in rat brain gliomas in vivo by <sup>1</sup>h magnetic resonance spectroscopic imaging : comparison with maps of metabolites. *Cancer Res* 61 (17), 6524–6531.

- Garcia, M., Vanhoutte, P., Pages, C., Besson, M.-J., Brouillet, E., Caboche, J., Mar 2002. The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces striatal neurodegeneration via a c-jun n-terminal kinase/c-jun module. *J Neurosci* 22 (6), 2174–2184.
- Gerweck, L. E., Seetharaman, K., Mar 1996. Cellular ph gradient in tumor versus normal tissue : potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res* 56 (6), 1194–1198.
- Govindaraju, V., Young, K., Maudsley, A., May 2000. Proton nmr chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed.* 13 (3), 129–153.
- Group, H. S., Mar 1996. Unified huntington's disease rating scale : reliability and consistency. *Mov Disord* 11 (2), 136–142.
- Gruetter, R., Jun. 1993. Automatic, localized in vivo adjustment of all first- and second-order shim coils. *Magn Reson.Med.* 29 (6), 804–811.
- Gruetter, R., Oct 2003. Glycogen : the forgotten cerebral energy store. *J Neurosci Res* 74 (2), 179–183.
- Gruetter, R., Novotny, E. J., Boulware, S. D., Mason, G. F., Rothman, D. L., Shulman, G. I., Prichard, J. W., Shulman, R. G., Oct 1994. Localized  $^{13}\text{C}$  nmr spectroscopy in the human brain of amino acid labeling from d-[1- $^{13}\text{C}$ ]glucose. *J Neurochem* 63 (4), 1377–1385.
- Gruetter, R., Seaquist, E., Ugurbil, K., Jul. 2001. A mathematical model of compartmentalized neurotransmitter metabolism in the human brain. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 281 (1), E100–E112.
- Gu, M., Gash, M. T., Mann, V. M., Javoy-Agid, F., Cooper, J. M., Schapira, A. H., Mar 1996. Mitochondrial defect in huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol* 39 (3), 385–389.
- Guyot, M. C., Hantraye, P., Dolan, R., Palfi, S., Mazière, M., Brouillet, E., Jul 1997. Quantifiable bradykinesia, gait abnormalities and huntington's disease-like striatal lesions in rats chronically treated with 3-nitropropionic acid. *Neuroscience* 79 (1), 45–56.
- Hamakawa, H., Murashita, J., Yamada, N., Inubushi, T., Kato, N., Kato, T., Feb 2004. Reduced intracellular ph in the basal ganglia and whole brain measured by  $^{31}\text{P}$ -mrs in bipolar disorder. *Psychiatry Clin Neurosci* 58 (1), 82–88.

- Hamilton, G., Mathur, R., Allsop, J. M., Forton, D. M., Dhanjal, N. S., Shaw, R. J., Taylor-Robinson, S. D., Mar 2003a. Changes in brain intracellular pH and membrane phospholipids on oxygen therapy in hypoxic patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Metab Brain Dis* 18 (1), 95–109.
- Hamilton, G., Patel, N., Forton, D., Hajnal, J., Taylor-Robinson, S., May 2003b. Prior knowledge for time domain quantification of in vivo brain or liver  $^{31}\text{P}$  mrs spectra. *NMR Biomed.* 16 (3), 168–176.
- Harper, P., 1991. Huntington's disease. Saunders, London.
- HDCRG, Mar 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on huntington's disease chromosomes. the huntington's disease collaborative research group. *Cell* 72 (6), 971–983.
- Hemmer, W., Wallimann, T., 1993. Functional aspects of creatine kinase in brain. *Dev Neurosci* 15 (3-5), 249–260.
- Henry, P., Lebon, V., Vaufrey, F., Brouillet, E., Hantraye, P., Bloch, G., Aug. 2002. Decreased tca cycle rate in the rat brain after acute 3-np treatment measured by in vivo  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  nmr spectroscopy. *J.Neurochem.* 82 (4), 857–866.
- Henry, P.-G., Oz, G., Provencher, S., Gruetter, R., 2003a. Toward dynamic isotopomer analysis in the rat brain in vivo : automatic quantitation of  $^{13}\text{C}$  nmr spectra using lmodel. *NMR Biomed* 16 (6-7), 400–412.
- Henry, P.-G., Tkác, I., Gruetter, R., Oct 2003b.  $^1\text{H}$ -localized broadband  $^{13}\text{C}$  nmr spectroscopy of the rat brain in vivo at 9.4 t. *Magn Reson Med* 50 (4), 684–692.
- Hetherington, H., Spencer, D., Vaughan, J., Pan, J., Jan. 2001. Quantitative  $(^{31}\text{P})$  spectroscopic imaging of human brain at 4 tesla : assessment of gray and white matter differences of phosphocreatine and atp. *Magn Reson.Med.* 45 (1), 46–52.
- Hinkle, P. C., Jan 2005. P/o ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1706 (1-2), 1–11.
- Hochachka, P. W., Oct 1999. The metabolic implications of intracellular circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (22), 12233–12239.



- Hochachka, P. W., 2000. Oxygen, homeostasis, and metabolic regulation. *Adv Exp Med Biol* 475, 311–335.
- Holtzman, D., McFarland, E., Moerland, T., Koutcher, J., Kushmerick, M. J., Neuringer, L. J., Mar 1989. Brain creatine phosphate and creatine kinase in mice fed an analogue of creatine. *Brain Res* 483 (1), 68–77.
- Holtzman, D., Mulkern, R., Tsuji, M., Cook, C., Meyers, R., 1996. Phosphocreatine and creatine kinase in piglet cerebral gray and white matter in situ. *Dev Neurosci* 18 (5-6), 535–541.
- Hyder, F., Chase, J. R., Behar, K. L., Mason, G. F., Siddeek, M., Rothman, D. L., Shulman, R. G., Jul 1996. Increased tricarboxylic acid cycle flux in rat brain during forepaw stimulation detected with  $^1\text{H}[^{13}\text{C}]$ nmr. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (15), 7612–7617.
- Ishiwata, K., Ido, T., Kawamura, M., Kubota, K., Ichihashi, M., Mishima, Y., 1991. 4-borono-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro-d,l-phenylalanine as a target compound for boron neutron capture therapy : tumor imaging potential with positron emission tomography. *Int J Rad Appl Instrum B* 18 (7), 745–751.
- Ishiwata, K., Vaalburg, W., Elsinga, P. H., Paans, A. M., Woldring, M. G., Apr 1988. Metabolic studies with l-[ $^{14}\text{C}$ ]tyrosine for the investigation of a kinetic model to measure protein synthesis rates with pet. *J Nucl Med* 29 (4), 524–529.
- Jacquard, C., Trioulier, Y., Cosker, F., Escartin, C., Bizat, N., Hantraye, P., Cancela, J. M., Bonvento, G., Brouillet, E., May 2006. Brain mitochondrial defects amplify intracellular  $[\text{Ca}^{2+}]$  rise and neurodegeneration but not  $\text{Ca}^{2+}$  entry during nmda receptor activation. *FASEB J* 20 (7), 1021–1023.
- Jenkins, B. G., Koroshetz, W. J., Beal, M. F., Rosen, B. R., Dec 1993. Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in huntington's disease using localized  $^1\text{H}$  nmr spectroscopy. *Neurology* 43 (12), 2689–2695.
- Jenkins, B. G., Rosas, H. D., Chen, Y. C., Makabe, T., Myers, R., MacDonald, M., Rosen, B. R., Beal, M. F., Koroshetz, W. J., May 1998.  $^1\text{H}$  nmr spectroscopy studies

- of huntington's disease : correlations with cag repeat numbers. *Neurology* 50 (5), 1357–1365.
- Jensen, J., Drost, D., Menon, R., Williamson, P., Aug. 2002. In vivo brain (31)p-mrs : measuring the phospholipid resonances at 4 tesla from small voxels. *NMR Biomed.* 15 (5), 338–347.
- Jucker, B. M., Dufour, S., Ren, J., Cao, X., Previs, S. F., Underhill, B., Cadman, K. S., Shulman, G. I., Jun 2000. Assessment of mitochondrial energy coupling in vivo by  $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$  nmr. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (12), 6880–6884.
- Kallinowski, F., Vaupel, P., Sep 1988. ph distributions in spontaneous and isografted rat tumours. *Br J Cancer* 58 (3), 314–321.
- Kasichke, K. A., Vishwasrao, H. D., Fisher, P. J., Zipfel, W. R., Webb, W. W., Jul 2004. Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis. *Science* 305 (5680), 99–103.
- Kingsley-Hickman, P., Sako, E., Mohanakrishnan, P., Robitaille, P., From, A., Foker, J., Ugurbil, K., Nov. 1987.  $^{31}\text{P}$  nmr studies of atp synthesis and hydrolysis kinetics in the intact myocardium. *Biochemistry* 26 (23), 7501–7510.
- Kohler, S. J., Yen, Y., Wolber, J., Chen, A. P., Albers, M. J., Bok, R., Zhang, V., Tropp, J., Nelson, S., Vigneron, D. B., Kurhanewicz, J., Hurd, R. E., Jul 2007. In vivo  $^{13}\text{C}$  carbon metabolic imaging at 3t with hyperpolarized  $^{13}\text{C}$ -1-pyruvate. *Magn Reson Med* 58 (1), 65–69.
- Krebs, H. A., Mar 1940a. The citric acid cycle : A reply to the criticisms of f. l. breusch and of j. thomas. *Biochem J* 34 (3), 460–463.
- Krebs, H. A., May 1940b. The citric acid cycle and the szent-györgyi cycle in pigeon breast muscle. *Biochem J* 34 (5), 775–779.
- Kuhl, D. E., Phelps, M. E., Markham, C. H., Metter, E. J., Riege, W. H., Winter, J., Nov 1982. Cerebral metabolism and atrophy in huntington's disease determined by  $^{18}\text{F}$  and computed tomographic scan. *Ann Neurol* 12 (5), 425–434.

- Lebon, V., Dufour, S., Petersen, K., Ren, J., Jucker, B., Slezak, L., Cline, G., Rothman, D., Shulman, G., Sep. 2001. Effect of triiodothyronine on mitochondrial energy coupling in human skeletal muscle. *J.Clin.Invest* 108 (5), 733–737.
- Lebon, V., Petersen, K., Cline, G., Shen, J., Mason, G., Dufour, S., Behar, K., Shulman, G., Rothman, D., Mar. 2002. Astroglial contribution to brain energy metabolism in humans revealed by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy : elucidation of the dominant pathway for neurotransmitter glutamate repletion and measurement of astrocytic oxidative metabolism. *J.Neurosci.* 22 (5), 1523–1531.
- Lei, H., Ugurbil, K., Chen, W., Nov. 2003a. Measurement of unidirectional pi to atp flux in human visual cortex at 7 t by using in vivo  $^{31}\text{P}$  magnetic resonance spectroscopy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 (24), 14409–14414.
- Lei, H., Zhu, X., Zhang, X., Ugurbil, K., Chen, W., Feb. 2003b. In vivo  $^{31}\text{P}$  magnetic resonance spectroscopy of human brain at 7 t : an initial experience. *Magn Reson.Med.* 49 (2), 199–205.
- Lin, J., Wu, P.-H., Tarr, P. T., Lindenberg, K. S., St-Pierre, J., Zhang, C.-Y., Mootha, V. K., Jäger, S., Vianna, C. R., Reznick, R. M., Cui, L., Manieri, M., Donovan, M. X., Wu, Z., Cooper, M. P., Fan, M. C., Rohas, L. M., Zavacki, A. M., Cinti, S., Shulman, G. I., Lowell, B. B., Krainc, D., Spiegelman, B. M., Oct 2004. Defects in adaptive energy metabolism with cns-linked hyperactivity in *pgc-1alpha* null mice. *Cell* 119 (1), 121–135.
- Lin, M. T., Beal, M. F., Oct 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443 (7113), 787–795.
- Liu, D., Chan, S. L., de Souza-Pinto, N. C., Slevin, J. R., Wersto, R. P., Zhan, M., Mustafa, K., de Cabo, R., Mattson, M. P., 2006. Mitochondrial *ucp4* mediates an adaptive shift in energy metabolism and increases the resistance of neurons to metabolic and oxidative stress. *Neuromolecular Med* 8 (3), 389–414.
- Loaiza, A., Porras, O. H., Barros, L. F., Aug 2003. Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. *J Neurosci* 23 (19), 7337–7342.

- Lodi, R., Schapira, A. H., Manners, D., Styles, P., Wood, N. W., Taylor, D. J., Warner, T. T., Jul 2000. Abnormal in vivo skeletal muscle energy metabolism in huntington's disease and dentatorubropallidolusian atrophy. *Ann Neurol* 48 (1), 72–76.
- Luthi-Carter, R., Strand, A., Peters, N. L., Solano, S. M., Hollingsworth, Z. R., Menon, A. S., Frey, A. S., Spektor, B. S., Penney, E. B., Schilling, G., Ross, C. A., Borchelt, D. R., Tapscott, S. J., Young, A. B., Cha, J. H., Olson, J. M., May 2000. Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of huntington's disease. *Hum Mol Genet* 9 (9), 1259–1271.
- Magistretti, P. J., Allaman, I., Nov 2007. Glycogen : a trojan horse for neurons. *Nat Neurosci* 10 (11), 1341–1342.
- Magistretti, P. J., Pellerin, L., Rothman, D. L., Shulman, R. G., Jan 1999. Energy on demand. *Science* 283 (5401), 496–497.
- Maier, T., Jenni, S., Ban, N., Mar 2006. Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 a resolution. *Science* 311 (5765), 1258–1262.
- Mangin, J. F., Frouin, V., Bloch, I., Bendriem, B., Lopez-Krahe, J., Sep 1994. Fast non-supervised 3d registration of pet and mr images of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 14 (5), 749–762.
- Mann, V. M., Cooper, J. M., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Jenner, P., Schapira, A. H., Sep 1990. Mitochondrial function and parental sex effect in huntington's disease. *Lancet* 336 (8717), 749.
- Martin, W. R., Powers, W. J., Raichle, M. E., Aug 1987. Cerebral blood volume measured with inhaled c15o and positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* 7 (4), 421–426.
- Mason, G., Pan, J., Chu, W., Newcomer, B., Zhang, Y., Orr, R., Hetherington, H., Nov. 1999. Measurement of the tricarboxylic acid cycle rate in human grey and white matter in vivo by 1h-[13c] magnetic resonance spectroscopy at 4.1t. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 19 (11), 1179–1188.

- Mason, G., Rothman, D., Behar, K., Shulman, R., May 1992. Nmr determination of the tca cycle rate and alpha-ketoglutarate/glutamate exchange rate in rat brain. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 12 (3), 434–447.
- Mason, G. F., Gruetter, R., Rothman, D. L., Behar, K. L., Shulman, R. G., Novotny, E. J., Jan 1995. Simultaneous determination of the rates of the tca cycle, glucose utilization, alpha-ketoglutarate/glutamate exchange, and glutamine synthesis in human brain by nmr. *J Cereb Blood Flow Metab* 15 (1), 12–25.
- McNamara, R., Arias-Mendoza, F., Brown, T. R., Aug 1994. Investigation of broad resonances in 31p nmr spectra of the human brain in vivo. *NMR Biomed* 7 (5), 237–242.
- Milakovic, T., Johnson, G. V. W., Sep 2005. Mitochondrial respiration and atp production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *J Biol Chem* 280 (35), 30773–30782.
- Mintun, M. A., Raichle, M. E., Martin, W. R., Herscovitch, P., Feb 1984. Brain oxygen utilization measured with o-15 radiotracers and positron emission tomography. *J Nucl Med* 25 (2), 177–187.
- Mittoux, V., Ouary, S., Monville, C., Lisvoski, F., Poyot, T., Conde, F., Escartin, C., Robichon, R., Brouillet, E., Peschanski, M., Hantraye, P., Jun 2002. Corticostriatopallidal neuroprotection by adenovirus-mediated ciliary neurotrophic factor gene transfer in a rat model of progressive striatal degeneration. *J Neurosci* 22 (11), 4478–4486.
- Monoi, H., Futaki, S., Kugimiya, S., Minakata, H., Yoshihara, K., Jun 2000. Poly-l-glutamine forms cation channels : relevance to the pathogenesis of the polyglutamine diseases. *Biophys J* 78 (6), 2892–2899.
- Mora, B., Narasimhan, P. T., Ross, B. D., Allman, J., Barker, P. B., Oct 1991. 31p saturation transfer and phosphocreatine imaging in the monkey brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (19), 8372–8376.
- Mora, B. N., Narasimhan, P. T., Ross, B. D., Jul 1992. 31p magnetization transfer studies in the monkey brain. *Magn Reson Med* 26 (1), 100–115.

- Morris, P. G., Feeney, J., Cox, D. W., Bachelard, H. S., May 1985. 31p-saturation-transfer nuclear-magnetic-resonance measurements of phosphocreatine turnover in guinea-pig brain slices. *Biochem J* 227 (3), 777–782.
- Noda, A., Ohba, H., Kakiuchi, T., Futatsubashi, M., Tsukada, H., Nishimura, S., May 2002. Age-related changes in cerebral blood flow and glucose metabolism in conscious rhesus monkeys. *Brain Res.* 936 (1-2), 76–81.
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., Kinoshita, K., Mar 1997. Direct observation of the rotation of f1-atpase. *Nature* 386 (6622), 299–302.
- Ogawa, S., Lee, T. M., Glynn, P., Jul 1986. Energy metabolism in rat brain in vivo studied by 31p nuclear magnetic resonance : changes during postnatal development. *Arch Biochem Biophys* 248 (1), 43–52.
- Palfi, S., Ferrante, R. J., Brouillet, E., Beal, M. F., Dolan, R., Guyot, M. C., Peschanski, M., Hantraye, P., May 1996. Chronic 3-nitropropionic acid treatment in baboons replicates the cognitive and motor deficits of huntington's disease. *J Neurosci* 16 (9), 3019–3025.
- Panov, A. V., Gutekunst, C.-A., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Burke, J. R., Strittmatter, W. J., Greenamyre, J. T., Aug 2002. Early mitochondrial calcium defects in huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci* 5 (8), 731–736.
- Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.-K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., Magistretti, P. J., Sep 2007. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes : an update. *Glia* 55 (12), 1251–1262.
- Pellerin, L., Magistretti, P. J., Oct 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis : a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (22), 10625–10629.
- Pellerin, L., Magistretti, P. J., Jan 2003. How to balance the brain energy budget while spending glucose differently. *J Physiol* 546 (Pt 2), 325.
- Pellerin, L., Magistretti, P. J., Nov 2004. Empiricism and rationalism : two paths toward the same goal. *J Cereb Blood Flow Metab* 24 (11), 1240–1241.

- Pellerin, L., Pellegrini, G., Bittar, P. G., Charnay, Y., Bouras, C., Martin, J. L., Stella, N., Magistretti, P. J., 1998. Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev Neurosci* 20 (4-5), 291–299.
- Penney, J. B., Vonsattel, J. P., MacDonald, M. E., Gusella, J. F., Myers, R. H., May 1997. Cag repeat number governs the development rate of pathology in huntington's disease. *Ann Neurol* 41 (5), 689–692.
- Pfeuffer, J., Tkáč, I., Gruetter, R., Apr 2000. Extracellular-intracellular distribution of glucose and lactate in the rat brain assessed noninvasively by diffusion-weighted 1h nuclear magnetic resonance spectroscopy in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 20 (4), 736–746.
- Phelps, M., Huang, S., Hoffman, E., Selin, C., Sokoloff, L., Kuhl, D., Nov. 1979. Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (f-18)2-fluoro-2-deoxy-d-glucose : validation of method. *Ann.Neurol.* 6 (5), 371–388.
- Posse, S., Cuenod, C. A., Bihan, D. L., Sep 1993. Human brain : proton diffusion mr spectroscopy. *Radiology* 188 (3), 719–725.
- Potwarka, J., Drost, D., Williamson, P., Feb. 1999. Quantifying 1h decoupled in vivo 31p brain spectra. *NMR Biomed.* 12 (1), 8–14.
- Powers, W. J., Videen, T. O., Markham, J., McGee-Minnich, L., Antenor-Dorsey, J. V., Hershey, T., Perlmutter, J. S., Feb 2007. Selective defect of in vivo glycolysis in early huntington's disease striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (8), 2945–2949.
- Provent, P., 2006. Imagerie spectroscopique et spectroscopie localisée par rmn du proton in vivo : Application à l'étude de la physiopathologie tumorale par cartographie des métabolites et du ph extracellulaire dans un modèle expérimental de gliomes c6. Ph.D. thesis, Université Joseph Fourier - Grenoble I.
- R Development Core Team, 2008. R : A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0.
- Raichle, M. E., Martin, W. R., Herscovitch, P., Mintun, M. A., Markham, J., Sep 1983. Brain blood flow measured with intravenous h<sub>2</sub>(15)o. ii. implementation and validation. *J Nucl Med* 24 (9), 790–798.

- Rastogi, V. K., Girvin, M. E., Nov 1999. Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the atp synthase. *Nature* 402 (6759), 263–268.
- Rathke-Hartlieb, S., Schlomann, U., Heimann, P., Meisler, M. H., Jockusch, H., Bartsch, J. W., May 2002. Progressive loss of striatal neurons causes motor dysfunction in *mnd2* mutant mice and is not prevented by *bcl-2*. *Exp Neurol* 175 (1), 87–97.
- Ratiney, H., Coenradie, Y., Cavassila, S., van Ormondt, D., Graveron-Demilly, D., May 2004. Time-domain quantitation of 1h short echo-time signals : background accommodation. *MAGMA*. 16 (6), 284–296.
- Reynolds, I. J., 1999. Mitochondrial membrane potential and the permeability transition in excitotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 893, 33–41.
- Rohen, J. W., Yokochi, C., 1991. Atlas photographique d'Anatomie systématique et topographique 2ème édition. VIGOT Paris.
- Ronnett, G. V., Kleman, A. M., Kim, E.-K., Landree, L. E., Tu, Y., Aug 2006. Fatty acid metabolism, the central nervous system, and feeding. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5, 201S–207S.
- Rothman, D. L., Behar, K. L., Hetherington, H. P., den Hollander, J. A., Bendall, M. R., Petroff, O. A., Shulman, R. G., Mar 1985. 1h-observe/<sup>13</sup>c-decouple spectroscopic measurements of lactate and glutamate in the rat brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (6), 1633–1637.
- Saks, V. A., Khuchua, Z. A., Vasilyeva, E. V., OYu, B., Kuznetsov, A. V., 1994. Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration—a synthesis. *Mol Cell Biochem* 133-134, 155–192.
- Sauter, A., Rudin, M., Jun 1993. Determination of creatine kinase kinetic parameters in rat brain by nmr magnetization transfer. correlation with brain function. *J Biol Chem* 268 (18), 13166–13171.
- Sawa, A., Wiegand, G. W., Cooper, J., Margolis, R. L., Sharp, A. H., Lawler, J. F., Greenamyre, J. T., Snyder, S. H., Ross, C. A., Oct 1999. Increased apoptosis of hun-



- tington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization. *Nat Med* 5 (10), 1194–1198.
- Schlattner, U., Dolder, M., Wallimann, T., Tokarska-Schlattner, M., Dec 2001. Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show a direct interaction that is modulated by calcium. *J Biol Chem* 276 (51), 48027–48030.
- Schlattner, U., Tokarska-Schlattner, M., Wallimann, T., Feb 2006. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1762 (2), 164–180.
- Schlattner, U., Wallimann, T., Jun 2000. Octamers of mitochondrial creatine kinase isoenzymes differ in stability and membrane binding. *J Biol Chem* 275 (23), 17314–17320.
- Schmidt, K., Mies, G., Sokoloff, L., Jan 1991. Model of kinetic behavior of deoxyglucose in heterogeneous tissues in brain : a reinterpretation of the significance of parameters fitted to homogeneous tissue models. *J Cereb Blood Flow Metab* 11 (1), 10–24.
- Schweizer, S., De Zanche, N., Mens, G., Henning, A., Boesiger, P., 2008. Advances in the eretic method for the quantification of in-vivo  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  spectra. In : *Proceedings of The International Society of Magnetic Resonance in Medicine*.
- Serres, S., Bezancon, E., Franconi, J.-M., Merle, M., Nov 2004. Ex vivo analysis of lactate and glucose metabolism in the rat brain under different states of depressed activity. *J Biol Chem* 279 (46), 47881–47889.
- Shen, J., Petersen, K., Behar, K., Brown, P., Nixon, T., Mason, G., Petroff, O., Shulman, G., Shulman, R., Rothman, D., Jul. 1999. Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by in vivo  $^{13}\text{C}$  nmr. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (14), 8235–8240.
- Shoubridge, E. A., Briggs, R. W., Radda, G. K., Apr 1982.  $^{31}\text{P}$  nmr saturation transfer measurements of the steady state rates of creatine kinase and atp synthetase in the rat brain. *FEBS Lett* 140 (2), 289–292.
- Shulman, R., Rothman, D., 2004. *Brain Energetic and Neuronal Activity*. John Wiley and Sons Ltd.

- Shulman, R., Rothman, D., Behar, K., Hyder, F., Aug. 2004. Energetic basis of brain activity : implications for neuroimaging. *Trends Neurosci.* 27 (8), 489–495.
- Sibson, N. R., Dhankhar, A., Mason, G. F., Behar, K. L., Rothman, D. L., Shulman, R. G., Mar 1997. In vivo  $^{13}\text{C}$  nmr measurements of cerebral glutamine synthesis as evidence for glutamate-glutamine cycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (6), 2699–2704.
- Smith, C. D., Landrum, W., Carney, J. M., Landfield, P. W., Avison, M. J., 1997. Brain creatine kinase with aging in f-344 rats : analysis by saturation transfer magnetic resonance spectroscopy. *Neurobiol Aging* 18 (6), 617–622.
- Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Rosiers, M. H. D., Patlak, C. S., Pettigrew, K. D., Sakurada, O., Shinohara, M., May 1977. The  $[^{14}\text{C}]$ deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization : theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* 28 (5), 897–916.
- Sonnewald, U., Gribbestad, I. S., Westergaard, N., Nilsen, G., Unsgård, G., Schousboe, A., Petersen, S. B., 1994. Nuclear magnetic resonance spectroscopy : biochemical evaluation of brain function in vivo and in vitro. *Neurotoxicology* 15 (3), 579–590.
- Stock, D., Leslie, A. G., Walker, J. E., Nov 1999. Molecular architecture of the rotary motor in atp synthase. *Science* 286 (5445), 1700–1705.
- Sugars, K. L., Rubinsztein, D. C., May 2003. Transcriptional abnormalities in huntington disease. *Trends Genet* 19 (5), 233–238.
- Tabrizi, S. J., Cleeter, M. W., Xuereb, J., Taanman, J. W., Cooper, J. M., Schapira, A. H., Jan 1999. Biochemical abnormalities and excitotoxicity in huntington's disease brain. *Ann Neurol* 45 (1), 25–32.
- Tkac, I., Starcuk, Z., Choi, I., Gruetter, R., Apr. 1999. In vivo  $^1\text{H}$  nmr spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. *Magn Reson.Med.* 41 (4), 649–656.
- Vaalburg, W., Coenen, H. H., Crouzel, C., Elsinga, P. H., Långström, B., Lemaire, C., Meyer, G. J., Feb 1992. Amino acids for the measurement of protein synthesis in vivo by pet. *Int J Rad Appl Instrum B* 19 (2), 227–237.

- Valette, J., 2006. Spectroscopie rmn in vivo et métabolisme énergétique cérébral : apport de la pondération en diffusion et de la détection 31p pour l'évaluation du statut énergétique chez le primate. Ph.D. thesis, Université Paris 6.
- Valette, J., Chaumeil, M., Bloch, M. G. G., Hantraye, P., Lebon, V., 2008. Compartmentation of glutamate molecular diffusion parallels metabolic compartmentation in the brain, as shown by simultaneous diffusion-weighted and dynamic 13c nmr spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*.
- Valette, J., Guillermier, M., Besret, L., Hantraye, P., Bloch, G., Lebon, V., Mar 2007. Isoflurane strongly affects the diffusion of intracellular metabolites, as shown by 1h nuclear magnetic resonance spectroscopy of the monkey brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 27 (3), 588–596.
- Valette, J., Guillermier, M., Boumezbeur, F., Poupon, C., Amadon, A., Hantraye, P., Lebon, V., Mar. 2006a. B(0) homogeneity throughout the monkey brain is strongly improved in the sphinx position as compared to the supine position. *J.Magn Reson.Imaging* 23 (3), 408–412.
- Valette, J., Guillermier, M., Hantraye, P., Lebon, V., 2006b. Ovs-localized 31p nmr spectroscopy in the primate brain. In : *Proceedings of the ISMRM meeting*.
- Vandesteene, A., Trempont, V., Engelman, E., Deloof, T., Focroul, M., Schoutens, A., de Rood, M., Mar 1988. Effect of propofol on cerebral blood flow and metabolism in man. *Anaesthesia* 43 Suppl, 42–43.
- Vanhamme, L., van den, B. A., Van Huffel, S., Nov. 1997. Improved method for accurate and efficient quantification of mrs data with use of prior knowledge. *J.Magn Reson.* 129 (1), 35–43.
- Ventura-Clapier, R., Kuznetsov, A., Veksler, V., Boehm, E., Anflous, K., Jul 1998. Functional coupling of creatine kinases in muscles : species and tissue specificity. *Mol Cell Biochem* 184 (1-2), 231–247.
- Véga, C., Martiel, J.-L., Drouhault, D., Burckhart, M.-F., Coles, J. A., Jan 2003. Uptake of locally applied deoxyglucose, glucose and lactate by axons and schwann cells of rat vagus nerve. *J Physiol* 546 (Pt 2), 551–564.

- Vinogradov, E., Grant, A. K., Jun 2008. Hyperpolarized long-lived states in solution nmr : Three-spin case study in low field. *J Magn Reson.*
- von Hanwehr, R., Smith, M. L., Siesjö, B. K., Feb 1986. Extra- and intracellular ph during near-complete forebrain ischemia in the rat. *J Neurochem* 46 (2), 331–339.
- Wallimann, T., Dolder, M., Schlattner, U., Eder, M., Hornemann, T., O’Gorman, E., Rück, A., Brdiczka, D., 1998. Some new aspects of creatine kinase (ck) : compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology. *Biofactors* 8 (3-4), 229–234.
- Wallimann, T., Hemmer, W., 1994. Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol Cell Biochem* 133-134, 193–220.
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., Eppenberger, H. M., Jan 1992. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands : the ‘phosphocreatine circuit’ for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 281 ( Pt 1), 21–40.
- Welch, K. M., Levine, S. R., Martin, G., Ordidge, R., Linde, A. M. V., Helpert, J. A., Feb 1992. Magnetic resonance spectroscopy in cerebral ischemia. *Neurol Clin* 10 (1), 1–29.
- Wexler, N. S., Lorimer, J., Porter, J., Gomez, F., Moskowitz, C., Shackell, E., Marder, K., Penchaszadeh, G., Roberts, S. A., Gayán, J., Brocklebank, D., Cherny, S. S., Cardon, L. R., Gray, J., Dlouhy, S. R., Wiktorski, S., Hodes, M. E., Conneally, P. M., Penney, J. B., Gusella, J., Cha, J.-H., Irizarry, M., Rosas, D., Hersch, S., Hollingsworth, Z., MacDonald, M., Young, A. B., Andresen, J. M., Housman, D. E., Young, M. M. D., Bonilla, E., Stillings, T., Negrette, A., Snodgrass, S. R., Martinez-Jaurrieta, M. D., Ramos-Arroyo, M. A., Bickham, J., Ramos, J. S., Marshall, F., Shoulson, I., Rey, G. J., Feigin, A., Arnheim, N., Acevedo-Cruz, A., Acosta, L., Alvir, J., Fischbeck, K., Thompson, L. M., Young, A., Dure, L., O’Brien, C. J., Paulsen, J., Brickman, A., Krch, D., Peery, S., Hogarth, P., Higgins, D. S., Landwehrmeyer, B., Project, U.-V. C. R., Mar 2004. Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate huntington’s disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (10), 3498–3503.
- Wike-Hooley, J. L., Haveman, J., Reinhold, H. S., Dec 1984. The relevance of tumour ph to the treatment of malignant disease. *Radiother Oncol* 2 (4), 343–366.

- Xu, S., Yang, J., Shen, J., Feb 2007. In vivo  $^{13}\text{C}$  saturation transfer effect of the lactate dehydrogenase reaction. *Magn Reson Med* 57 (2), 258–264.
- Yang, J., Singh, S., Shen, J., Mar 2008.  $^{13}\text{C}$  saturation transfer effect of carbon dioxide-bicarbonate exchange catalyzed by carbonic anhydrase in vivo. *Magn Reson Med* 59 (3), 492–498.
- Yang, L., Calingasan, N. Y., Chen, J., Ley, J. J., Becker, D. A., Beal, M. F., Jan 2005a. A novel azulenyl nitron antioxidant protects against mptp and 3-nitropropionic acid neurotoxicities. *Exp Neurol* 191 (1), 86–93.
- Yang, Y., Gehrke, S., Haque, M. E., Imai, Y., Kosek, J., Yang, L., Beal, M. F., Nishimura, I., Wakamatsu, K., Ito, S., Takahashi, R., Lu, B., Sep 2005b. Inactivation of drosophila dj-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/akt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (38), 13670–13675.
- Zeleznikar, R. J., Dzeja, P. P., Goldberg, N. D., Mar 1995. Adenylate kinase-catalyzed phosphoryl transfer couples atp utilization with its generation by glycolysis in intact muscle. *J Biol Chem* 270 (13), 7311–7319.
- Zhang, N., Zhu, X.-H., Lei, H., Ugurbil, K., Chen, W., Aug 2004. Simplified methods for calculating cerebral metabolic rate of oxygen based on  $^{17}\text{O}$  magnetic resonance spectroscopic imaging measurement during a short  $^{17}\text{O}_2$  inhalation. *J Cereb Blood Flow Metab* 24 (8), 840–848.
- Zhu, X.-H., Zhang, N., Zhang, Y., Zhang, X., Ugurbil, K., Chen, W., Apr 2005. In vivo  $^{17}\text{O}$  nmr approaches for brain study at high field. *NMR Biomed* 18 (2), 83–103.